

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



USO DE ISÓTOPOS ESTABLES PARA MEDIR LA RETENCIÓN
PROTEICA UTILIZANDO HARINA DE SUBPRODUCTO DE AVE EN
DIETAS PARA ORGANISMOS MARINOS

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DANIEL BADILLO ZAPATA

ENSENADA BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, Marzo 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

USO DE ISÓTOPOS ESTABLES PARA MEDIR LA RETENCIÓN
PROTEICA UTILIZANDO HARINA DE SUBPRODUCTO DE AVE EN
DIETAS PARA ORGANISMOS MARINOS

TESIS


QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

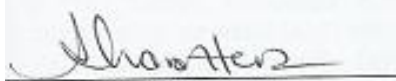
PRESENTA

DANIEL BADILLO ZAPATA

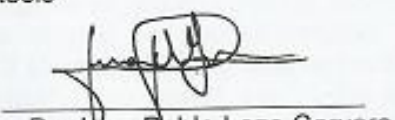
Aprobada por:



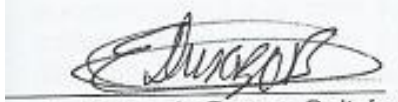
Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dra. Sharon Z. Herzka
Sinodal



Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal



Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal

RESUMEN de la tesis de Daniel Badillo Zapata, presenta como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA. Ensenada, Baja California, México. Marzo 2015.

Aprobado por _____

Uso de Isótopos estables para medir la retención proteica utilizando harina de subproducto de ave en dietas para organismos marinos

Con el propósito de aportar un mayor conocimiento sobre la retención diferencial de nitrógeno entre dos fuentes distintas de proteína, se utilizó la técnica de isótopos estables para discernir si se podía o no substituir la harina de pescado por harina de subproducto de ave en dietas para organismos marinos. El estudio comprendió experimentos en el laboratorio con cinco especies de peces distintas. Con los resultados obtenidos se generaron 2 artículos científicos (dos publicados). En general, todos los experimentos en el laboratorio se realizaron bajo el mismo diseño experimental, en donde las dietas se formularon para contener los requerimientos óptimos de cada especie con 4 niveles de substitución (0, 33, 67 y 100%) de la harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA) con dietas isoproteicas, isolipídicas y con un contenido similar de energía entre ellas. En los casos en donde los peces alcanzaron el equilibrio isotópico con su dieta, determinado mediante el factor de discriminación isotópica obtenido en los tratamientos 33 y 67% HA, se calculó el porcentaje de nitrógeno retenido a travez de modelos isotópicos de mezcla. En ambos resultados se observó que las harinas (HP y HA) fueron retenidas a niveles cercanos al que se habían incluido, como claramente se estableció en los artículos 1 y 2 (Capítulos II y III, respectivamente). En el primer experimento (**ARTICULO 1; Capítulo II**) se evaluó a la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) durante un periodo de 80 días, en donde se obtuvo una ganancia en peso similar entre los tratamientos, por lo que se concluye que la HP puede ser substituida por completo por la HA. Sin embargo hay que considerar que el experimento fue de corta duración y quizás a largo plazo la acumulación de ciertos ácidos grasos esenciales de cadena larga podrían ser una limitante para un desarrollo óptimo. En el segundo experimento (**ARTICULO 2; Capítulo III**) se evaluaron juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) durante 86 días, en donde al analizar el perfil de aminoácidos de las dietas y del tejido del músculo se observaron perfiles similares. En este Experimento, la dieta 67HA resultó con el mayor

crecimiento casi al doble que el tratamiento que incluía tan sólo HP, mientras que el menor crecimiento se observó con el tratamiento 100HA. De acuerdo a los análisis de ácidos grasos de las dietas y músculo se observó una gran disminución en EPA y DHA en el músculo de los peces alimentados con la dieta 100HA como reflejo de su bajo contenido en la dieta. Con ésto se concluye que la totoaba a diferencia de la trucha tiene mayores requerimientos de ácidos grasos, mientras que al aplicar un modelo isotópico de mezcla entre los tratamientos 33 y 67HA se observó que la HA es fácilmente retenida dando lugar a un crecimiento mayor que el obtenido con HP. No se midió el consumo del alimento por lo que el crecimiento de los peces del tratamiento 67HA con totoaba no se descarta que se haya debido a un mayor consumo aunque se consideró que siendo las dietas isoenergéticas el consumo debería ser similar. Así mismo se realizaron tres experimentos en el laboratorio curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*), lobina rayada (*Morone saxatilis*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*), el crecimiento obtenido con estas especies no fue el adecuado ya que no alcanzaron como mínimo un 400% en ganancia en peso durante el tiempo en el que cada uno de los experimentos se realizó (136, 197 y 120 días respectivamente para cada especie), por lo que se determinó no incluir dichos resultados en esta tesis. Se concluye que los isótopos estables son una buena herramienta para elegir una fuente proteica ya sea para combinar o substituir. La harina de subproductos de ave es una excelente fuente de proteína que al menos en totoaba fue capaz de generar un mayor crecimiento siempre y cuando la cantidad de ácidos grasos esenciales EPA y DHA estén presentes en un 7.92% del total de ácidos grasos. La implementación de esta técnica dentro de la nutrición de organismos acuáticos será de gran ayuda, y de aplicarse cambiará las estrategias en el protocolo del estudio de requerimientos esenciales que nos podrá llevar a la formulación bajo el esquema de proteína ideal.

Palabras clave: Harina de subproducto de ave, nutrición, isótopos estables, retención de nitrógeno, enriquecimiento isotópico, trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

DEDICATORIA

Con todo mi cariño a mis padres

Arnulfo Badillo Ramírez

Eva Zapata Téllez

A mis Hermanos

Rubén, Rafael, Arnulfo y Eduardo

*Esto es gracias a ustedes que me han impulsado en cada momento de
mi vida y siempre están en mi corazón.*

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

A la **Universidad Autónoma de Baja California** por todos estos años haberme dado una excelente formación y por brindarme la oportunidad de ser todo un Cimarrón.

A la **Facultad de Ciencias Marinas** por ayudarme a seguir creciendo profesional y personalmente.

A mi directora de tesis, la **Dra. María Teresa Viana Castrillón** por todo el conocimiento transmitido, por su apoyo, confianza, amistad y por impulsarme a ser un mejor investigador y un ejemplo a seguir.

Al **Dr. Juan Gabriel Correa Reyes** por brindarme su confianza y sobre todo un apoyo incondicional durante todo este tiempo de conocernos.

Al **Dr. Juan Pablo Lazo Corvera** por su apoyo en cada uno de los pasos para la realización de esta tesis.

|

A la **Dra. Sharon Herzka Liona** por brindarnos su apoyo y sus conocimientos en la realización de cada experimento.

Al **Dr. Albert Tacon** por brindarme su amistad y ayuda en la realización de este trabajo.

Al **Dr. Eduardo Durazo Beltrán** por ayudarme en la realización de esta tesis y por sus consejos en el laboratorio para realizar todos nuestros análisis.

A la **M.C. Griselda Pares Sierra** por su amistad y por toda la ayuda prestada durante mi estancia en el laboratorio.

A la **Oc. Alma Edith Carpio** por toda la ayuda en cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo.

A mis amigos que han estado durante esta travesía y muchas otras travesías **Fernando, Ceres, Roger, Yoli, Pedro, Gaby, Augusto.**

Muy especialmente a la **Biol. Selene Herrera** por ayudarme y apoyarme en todo momento inclusive en los momentos difíciles de mí estar por el doctorado.

|

A todos los integrantes del **laboratorio de Nutrición y Fisiología de Organismos Acuáticos** que estuvieron presentes durante todo este tiempo (**Ariana, Emmanuel, Jaime, Servando, Perez Julio, Fernando Maurith**).

A la empresa **Pacifico Aquaculture S de R.L de C.V** por el apoyo con la donación de organismo para experimentación y llevar a cabo un experimento dentro de sus instalaciones.

GRACIAS A TODOS.....

Í N D I C E

	Página
CAPÍTULO I Introducción general a la tesis	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
1.4 DISCUSIÓN GENERAL.	34
1.5 CONCLUSIONES GENERALES	44
1.6 REFERENCIAS	45
CAPÍTULO II	
2.1 Experimento 1: Protein assimilation assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) diets using stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers. PlosONE, 9(9):e107523.	52
CAPÍTULO III	
3.1 Experimento 2. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for <i>Totoaba macdonaldi</i> juveniles. Aquaculture Research, 2014 1-12.	81

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
<i>Cuadro 1</i>	Ingredientes (g 100 g ⁻¹ peso seco) de cuatro dietas experimentales con cuatro niveles de substitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de pescado para cada especie	23
<i>Cuadro 2</i>	Composición proximal promedio (%) en base seca de las dietas experimentales para las especies bajo estudio	24

|

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación formulada ha demostrado tener importancia dentro de la nutrición animal para conseguir un mejor desempeño general, menor desperdicio del alimento, mayor digestibilidad y por lo tanto un índice de aprovechamiento mejor de los distintos ingredientes que son utilizado en la formulación de dietas. Hecho que no excluye a las especies de organismos marinos con los que se ha venido trabajando en sistemas de cultivo.

En la nutrición acuícola así como en la producción de alimentos formulados, las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales son los distintos grupos de nutrientes y micronutrientes que el organismo necesita digerir, absorber, retener y canalizar al metabolismo para crecer y producir la energía necesaria para llevar a cabo un sin número de procesos y actividades fisiológicas. En términos de energía, las proteínas, carbohidratos y lípidos tienen en promedio valores en calorías en el orden de 5.65, 4.15 y 9.45 kilocalorías por gramo (Kcal/g) respectivamente (Tacon, 1989). Estos valores de energía son obtenidos de la oxidación metabólica total de los nutrientes y son medidos como el calor generado por la combustión de los mismos en una bomba adiabática conocida como bomba calorimétrica.

Dentro de estos grupos, las proteínas son biopolímeros (macromoléculas orgánicas) de elevado peso molecular constituidas principalmente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N), aunque pueden contener también azufre

|

(S) y fósforo (P), y en menor proporción hierro (Fe), Cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (Y), entre otros. Lehninger (1989) clasifica a las proteínas en dinámicas y estructurales; las dinámicas corresponden al grupo que realizan un control metabólico (hormonas), de transporte (hemoglobinas), para transformaciones químicas (enzimas) y contracciones (miosina y actina); mientras que las de función estructural como músculo y están presentes en el desarrollo del tejido conjuntivo y huesos (colágeno y elastina). Por lo anterior, se estima que el grupo de las proteínas constituyen el de mayor importancia en los tejidos de los peces y de la mayoría de los organismos, constituyendo el 65–75% del total de la materia seca (Wilson, 2002).

Los peces en la naturaleza para abastecerse de proteína y sus unidades funcionales (aminoácidos; AA), se alimentan de otros organismos formando cadenas tróficas. La proteína deberá ser hidrolizada mediante un proceso enzimático (digestión) por el cual se liberan péptidos (agrupaciones de AA que se mantienen solubles) y amino ácidos libres, los cuales se absorben a través del tracto intestinal y son distribuidos por la sangre al resto de los órganos y tejidos. La conformación y función de las proteínas está determinada por la composición y secuencia de los AA que forman las cadenas polipeptídicas (Wilson, 2002). Cada AA tiene un carbono central (denominado el carbono alfa) con cuatro grupos; uno básico que es el amino (-NH₂), el carboxilo que es el ácido (-COOH), un átomo de hidrógeno y un grupo radical de la cadena, o grupo -R, el cual hace diferente a cada AA. Los átomos de carbono de la cadena son denominados como beta, gama, delta y épsilon,

(Lehninger, 1989). De acuerdo a su capacidad o velocidad de síntesis dentro de los organismos, los AA se han clasificado en aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE). Se sabe que un desbalance entre los AAE y los AANE, ya sea en exceso o restricción se podría manifestar algún tipo de deficiencia que podría afectar la tasa de ingestión, transporte y catabolismo de los nutrientes y la tasa de síntesis de proteína (Lopera-Barrero y Poveda-Parra, 2009) y por ende, el crecimiento. Los peces requieren de un consumo de proteína o AA constante ya que son utilizados continuamente para construir proteínas nuevas (durante el crecimiento y/o reproducción) o bien, para substituir proteínas ya existentes (mantenimiento). El valor nutricional de una fuente proteica está en función de la digestibilidad principalmente y del perfil de AAE. Aquellos AA que se encuentren en exceso serán descartados después de su posible utilización como fuente de energía, con una repercusión en la tasa de conversión proteica y por ende del costo del alimento. Esto quiere decir que no deberán existir AA en exceso o en deficiencia, lo que se conoce como "proteína ideal" por lo que el llegar a este balance de AA ayudará a reducir el uso de AA como fuente de energía (efecto de ahorro proteico) y disminuir la excreción de nitrógeno.

A pesar de que altos niveles de proteína en la dieta son requeridos por la mayoría de los peces, los requerimientos individuales de AA pueden no ser correspondidos ya que el pez usa una porción de la proteína ingerida como fuente de energía (Lopera-Barrero y Poveda-Parra, 2009). Los peces son el grupo de organismos que requieren de mayores cantidades de proteína dietética que otros

|
animales no rumiantes entre 24 a 50% de proteína bruta a diferencia de aves (18 a 23% aproximadamente) y cerdos (14 a 16%) (NRC, 1993). Esto se explica también debido a que los peces no gastan energía para mantener la temperatura corporal, además de permanecer flotando a diferencia del trabajo desarrollado para moverse en los terrestres, lo que los hace ser más eficientes.

Entre las distintas especies de peces que se explotan en la actualidad podría decirse que de las que se conoce más sobre su nutrición y requerimientos nutricios son el salmón, trucha y tilapia, principalmente. Grandes avances se han logrado en estas especies, principalmente debido a los salmónidos ya que podríamos decir que son el organismo modelo en cual se han desarrollado un sin número de investigaciones debido a su facilidad de obtención y crecimiento, además de presentar una ontogenia directa sin requerir alimento vivo durante su desarrollo (NRC, 2011).

La industria acuícola y las instituciones de investigación dedicadas a la producción de organismos acuícolas han desarrollado estudios enfocados a la solución de producir alimentos formulados con base a la proteína ideal, dando lugar a la formulación de un alimento que contenga la cantidad adecuada de AA necesarios con un mínimo de pérdida. Aparte de esto, existe también el problema de poder sustentar una producción creciente en acuicultura con la elaboración de alimentos ricos en proteína, producidos con materias primas que no compitan directamente con la producción. Esto da lugar no sólo a la búsqueda de fuentes alternativas a la harina de pescado (considerada como el ingrediente indispensable),

|

sino también el optimizar al máximo su utilización minimizando su uso como fuente energética, sobre todo para dietas de peces marinos. La harina de pescado presenta características difíciles de igualar ya que poseen un alto contenido de proteína (mayor al 67%), con un balance casi perfecto de AAE, un contenido en grasa de aproximadamente un 10%, con altos % de ácidos grasos (EPA y DHA), además de no contener factores antinutricionales (Sealey *et al.*, 2011). La harina de pescado también presenta en los organismos ciertas factores como lo son buena palatabilidad, excelente digestibilidad y promueve un buen crecimiento (Hardy, 1998). Sin embargo, la tendencia comercial histórica para especies productivas nos indica que el conocimiento general sobre los requerimientos nutricionales de una especie dada, permite encontrar fuentes alternativas a la harina de pescado. Así fue como la alimentación de cerdos y aves fueron eliminando su consumo paulatinamente hasta que hoy en día su uso es limitado (CONAFAB, 2012). En organismos acuáticos deberá ocurrir lo mismo para permitir el crecimiento de la producción.

Algunas de las limitantes que se presentan en el uso de fuentes alternativas a la harina de pescado se relacionan con la calidad que presentan en términos de digestibilidad; cantidad y biodisponibilidad de los AAE y con la presencia de factores antinutricionales para su correcto aprovechamiento.

Los estudios que se han llevado a cabo tratando de encontrar una respuesta a esta problemática consisten en su mayoría en experimentaciones realizadas mediante un esquema de dosis-respuesta, (substitución de harina de pescado por

|
algún otro ingrediente) y observar el efecto en el crecimiento y la digestibilidad de los nutrientes. Sin embargo, se ha demostrado que existen grandes exigencias en el perfil de AAE debido a que cada especie presenta distintos requerimientos en cada una de las etapas de cultivo, además de otros factores como: temperatura, hábitos alimenticios, peso, edad, sexo, entre mucho otros; los cuales influyen directamente en los resultados obtenidos en este tipo de experimentación de dosis-respuesta.

Aparte de este tipo de experimentación de dosis-respuesta, también se practican pruebas *in vitro*. Entre las cuales está la técnica del pH-Stat (Pedersen y Eggum, 1983), que si bien es muy útil para predecir el potencial digestivo de una dieta en un organismo determinado (Esquerria *et al.*, 1997; Cheng y Hardy, 2002), en realidad describe la calidad de una proteína con referencia a otra, sin dejar de ser una predicción; ya que esta técnica no indica sobre qué tanto de esos productos que son digeridos podrán ser absorbidos e incorporados para maximizar el crecimiento de cada especie en particular. Mientras que las técnicas *in vivo*, se basan en medir directamente el aprovechamiento de los ingredientes o de las dietas que son hidrolizados en el aparato digestivo y convertidos en sustancias útiles (péptidos y aminoácidos) para coadyuvar en el crecimiento de los organismos, sin conocer como los nutrientes son aprovechados. En la actualidad las investigaciones que utilizan las técnica *in vivo* van encaminadas a encontrar substitutos de la HP, por lo que los subproductos de plantas y animales podrían llegar a ser una buena opción para sustituirla. Gatlin *et al.*, (2007) mencionan que dentro de los ingredientes más importantes de origen vegetal está la harina de soya, por su contenido de proteína y

|

perfil de aminoácidos esenciales. Sin embargo, presenta limitaciones en el contenido de metionina, lisina y cisteína, que si bien hay algunas harinas que han resuelto este problema con la sustitución de AA, se ha demostrado que existen otros problemas que no se han podido esclarecer del todo pero que resulta en un bajo aprovechamiento de la misma. También se menciona que hoy en día se han hecho un gran número de esfuerzos para mejorar la calidad de la soya, ya sea con el uso de fitasas para incrementar la bio-disponibilidad de la metionina así como mejorar su cultivo genéticamente para incrementar el contenido de ciertos AAE. De Aguilar *et al.*, (2011) evaluaron el efecto de la inclusión de harina de girasol en dietas para tilapia en etapa de juveniles, los cuales concluyen que la harina de girasol puede ser incluida hasta en un 14% en la dieta. De igual forma un gran número de productos y subproductos agrícolas como el café, cacao, germen de trigo, solubles de maíz, granos secos y cítricos has sido utilizados como substitutos parciales de la harina de pescado en diversas proporciones (González-Salas *et al.*, 2014). En la literatura científica se han publicado numerosos estudios sobre el valor nutritivo de los ingredientes para peces provenientes del procesamiento de los subproductos de proteína animal. Dichos estudios indican que las proteínas recicladas de origen animal pueden ser ingredientes con un excelente valor nutritivo para los peces ya que son fuentes ricas en proteína, energía y numerosos nutrientes esenciales, como los aminoácidos, ácidos grasos, fósforo y microminerales (Sealey *et al.*, 2011).

Dentro de las fuentes de proteína elaboradas con subproductos de origen animal encontramos desde los subproductos de pescado, hasta harinas de

|

subproductos animales (carne, ave, hueso, sangre, etc.). La harina de subproducto de ave (HA) se ha venido utilizando desde la década de los 80's aunque en un principio los resultados no fueron muy buenos. En el NRC (2011) se hace referencia de que la harina de subproducto de ave podría ser también una de las principales fuentes de proteína que podría llegar a reemplazar la HP ya que presenta un alto contenido proteico y muchos de los AAE que necesitan los peces. Esto debido a que hoy en día se ha dado una mejora tecnológica en la separación de grasa y el secado, además de poder mantener una calidad constante; factores importantes que están logrando actualmente que se utilice con mucha confianza en algunas especies (Sealey *et al.*, 2011), aspecto importante de lograr cuando un formulador requiere contar con la disponibilidad de muchas toneladas de ingredientes con un nivel de calidad constante. Esto hace que la estimación de la calidad de la proteína sea un aspecto de mucha importancia para los productores de alimentos así como los acuicultores para que los alimentos se traduzcan en un crecimiento sostenido y a un costo beneficio esperado.

Si bien los análisis detallados de las harinas (composición proximal, perfil de aminoácidos, ácidos grasos, microscopía de los alimentos y digestibilidad *in vivo* e *in Vitro*) no han resuelto el reemplazo a través de asemejar el perfil de AA del organismo a alimentar, ya que no se cuenta con la información de aquellos nutrientes que son necesarios para cubrir las demandas metabólicas.

Las pruebas de digestibilidad aparente se basan en medir el efecto en la concentración de un marcador inerte no digestible (entre el alimento y las heces)

|
utilizado en el alimento, para determinar la eficiencia en la digestión vs. absorción. Si bien es una técnica directa que nos da el aprovechamiento de la dieta existe hay información que se desconoce y sobre todo que es lo que pasa con los nutrientes que son absorbidos y asimilados, ya que éstos podrán ser redirigidos a un enrutamiento metabólico en donde no necesariamente indique que todo lo absorbido y asimilado logrará ser retenido para generar un crecimiento sostenido.

La estimación de la eficiencia de retención y absorción de los nutrientes podría proveer información valiosa acerca del destino y razón de recambio de un componente específico de una dieta lo cual podríamos medirlo mediante la utilización de la técnica de isótopos estables.

Uso de isótopos estables

Los isótopos estables son átomos de un elemento que contienen el mismo número de protones y electrones, pero difieren en el número de neutrones (Fry, 2006). Entiéndase como “átomo” a la partícula o unidad material más pequeña capaz de entrar en combinación con otra u otras análogas para formar un compuesto químico. (Lehninger, 1989).

Todo elemento en la naturaleza, posee una cierta cantidad de átomos que posee un neutrón extra dando lugar a una masa mayor (peso atómico), a lo que se les llama isótopos estables. Estos no se alteran a lo largo del tiempo, aunque sí son acumulados en la materia que los componen. Dentro de la materia orgánica los principales elementos que la conforman están el carbono, hidrógeno, oxígeno y

|
nitrógeno (C, H, O y N). Estos elementos llegan a formar compuestos, gracias a que existen dos tipos de enlaces (covalentes e iónicos) los cuales presentan fuerzas de atracción electrostática permitiendo que se mantengan unidos a los átomos de dos o más elementos. Aparte de los isótopos estables están los radioactivos que a diferencia de los primeros poseen un mayor número de neutrones lo que los hace contener una masa mayor provocando que sean inestables y se descompongan rápidamente, por lo que son llamados radioactivos.

Como se mencionó con anterioridad, los isótopos estables difieren en el número de neutrones que generan diferencias en las masas, en donde los isótopos pesados se encuentran en cantidades mínimas. Los isótopos estables se diferencian con la connotación de su masa, como lo es el caso del carbono y nitrógeno (^{12}C y el ^{13}C , ^{14}N y el ^{15}N , respectivamente). Con abundancias que van entre 98.9 y 1.1% para el ^{12}C y el ^{13}C ;) y entre 99.63 y 0.37% para el ^{14}N y el ^{15}N (Fry, 2006; Sulzman, 2007). Debido a su baja abundancia, los valores de los isótopos estables se expresan en partes por mil a partir de un estándar de referencia. Como estándares se usan los establecidos por normas internacionales y dados por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). Y los valores se reportan de acuerdo al cociente entre los valores de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ y son denominados con la connotación δ como valores isotópicos para el carbono y nitrógeno o de cualquier elemento que se trate. Para los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se utilizan VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) y para el estándar de $\delta^{15}\text{N}$ se utilizan los valores de nitrógeno atmosférico. Es generalmente aceptado que los valores $\delta^{13}\text{C}$ en un

animal son similares a los de su dieta con un cambio ligero (1‰) para estar en equilibrio. En el caso de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ suelen ser más elevados que los de su dieta (en promedio de 3–4‰), lo que significa en cierta forma, que se concentran en el organismo con relación a la dieta, lo que se conoce como **factor de discriminación** (Δ) y que representa la diferencia isotópica que existe entre el tejido y su dieta como se expresa en la siguiente ecuación:

$$\Delta_{\text{tejido- dieta}} = \delta X_{\text{tejido}} - \delta X_{\text{dieta}} \text{ (Fry, 2006).}$$

Muchos autores utilizan el $\delta^{13}\text{C}$ y el $\delta^{15}\text{N}$ como trazadores naturales para conocer las relaciones tróficas entre organismos. Hoy en día se sabe que los distintos tejidos de los organismos muestran una capacidad variable en la retención como consecuencia de su actividad metabólica y nivel trófico (Caut *et al.*, 2009). El tejido hepático y sanguíneo son entre los tejidos en donde se observa una mayor tasa de recambio metabólica, mientras que el tejido muscular está en un término medio, el tejido conjuntivo y óseo son los que presentan una menor tasa (Carleton y Martínez del Río, 2010).

Uso de trazadores

En ecología se han venido utilizando los isótopos estables como trazadores (relación presa/consumidor), ya que al ingerir el alimento, los individuos están reteniendo las proporciones isotópicas del ambiente donde se está alimentando (firma isotópica del ambiente) (Torres *et al.*, 2006). El análisis de isótopos estables es una herramienta que se ha popularizado en la última década (Martínez del Río *et*

|
al., 2009), debido a que la técnica es más accesible tanto en precio como en equipos disponibles. Si bien esta técnica ha sido ampliamente utilizada dentro de la ecología su uso con otros propósitos es hoy en día aceptable (Post, 2002).

Como se refirió anteriormente, dentro de la nutrición para peces marinos, a pesar de que se han llevado a cabo un gran número de investigaciones sobre los requerimientos nutricionales de larvas y juveniles, aún no se cuenta con toda la información sobre la relación entre el alimento ingerido y lo que de éste es incorporado en el organismo y eventualmente utilizado para distintos procesos metabólicos dentro del organismo (enrutamiento). Lo que nos lleva a buscar otras técnicas más precisas que nos ayuden a discernir de una mejor manera lo que pasa dentro del organismo y nos ayude a monitorear el destino de los componentes específicos de una dieta.

Uno de los primeros investigadores en utilizar un método para medir la retención y el flujo de nutrientes en acuicultura fue el Dr. Schroeder en 1983 el cual introducía el uso de radioisótopos o isótopos radioactivos. Estos a diferencia de los estables y como su nombre lo indica son descompuestos rápidamente, pero al mismo tiempo son fácilmente cuantificables, pero al ser radioactivos también hace que su uso esté muy limitado y controlado por cuestiones de seguridad y salud. El uso de isótopos radioactivos (^{14}C , ^3H) fueron utilizados y aplicados satisfactoriamente como trazadores nutricionales primeramente en estudios de nutrición de larvas de crustáceos para evaluar la incorporación de nutrientes (lípidos) en el metabolismo (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a).

Los isótopos radioactivos también muestran un enriquecimiento isotópico y en su momento han mostrado ser unos de los trazadores más confiables para determinar la tasa de ingesta, asimilación y retención de los nutrientes (Le Vay y Gamboa Delgado, 2010). Sin embargo, como se mencionó, la utilización del marcaje con radioactividad produce un daño perjudicial para los usuarios, para los animales experimentales y para el ambiente (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a). Por esta razón es que se ha comenzado a utilizar la técnica de isótopos estables en acuicultura con un gran número de investigaciones y en varias de especies marinas y dulce acuícolas (Gaye-Siessegger *et al.*, 2004a; Focken, 2005; Gamboa-Delgado *et al.*, 2008; Gamboa-Delgado *et al.*, 2013).

En acuicultura al igual que en otras especies, se han utilizado principalmente los isótopos estables de carbono y nitrógeno por encontrarse presentes en una mayor proporción en el tejidos de los organismos consumidores además de estar directamente relacionados con lo que contienen en su dieta (De Niro y Epstein, 1978; Fry, 2006). Al obtener los valores de discriminación isotópica para cada uno de los nutriente por separado se puede estimar mediante proyecciones matemáticas lo que debería ser retenido cuando se utilizan distintas fuentes mezcladas y así poder suponer cual de ellas es favorecida y así determinar cual fuente proteica presente mayor retención que otra.

Modelo de mezcla

|

La utilización de modelos de mezcla ya se ha llevado a cabo desde hace muchos años en ecología tratando de entender y cuantificar la dietas complejas de las especies. En muchos casos incluso, sin sacrificar a los animales y llevar a cabo la laboriosa tarea de identificar el contenido estomacal, que en principio dependerá de la hora de la toma de muestra y abundancia de alimento para el grado de digestión en el estómago de los individuos, lo cual pone en una situación incierta este tipo de análisis. Dentro de los modelos de mezcla como el IsoCons (Phillips y Koch, 2002), se basan en la contribución potencial de las diferentes fuentes y presas y del factor de discriminación de cada dieta.

Los modelos isotópicos de mezcla se han vuelto una herramienta competente, con un alto nivel de resolución y precisión para estimar la contribución isotópica de las distintas fuentes nutrimentales que presentan valores isotópicamente distintos (Lochman y Phillips, 1996; Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009a; Martínez del Río *et al.*, 2009). El uso de estos modelos necesita de que ciertos requisitos sean satisfechos en el diseño experimental, tales como: a) que todas las fuentes de alimentos sean introducidas en el análisis, b) que el consumidor esté en equilibrio isotópico con su dieta, es decir, que ambas señales isotópicas tanto la del consumidor como la de su dieta sean similares, c) en el caso del consumidor que por haber estado ingiriendo el alimento durante un tiempo definido, que se asuma que el nutriente asimilado se encuentre completamente homogeneizado en el cuerpo del consumidor, d) de que el nitrógeno incorporado no se vaya hacia procesos metabólicos (enrutamiento isotópico) (Martínez del Río *et al.*, 2009).

Sin embargo, se sabe que existe algún efecto en el organismos que a pesar de que el alimento haya sido ingerido durante un lapso de tiempo, existe la posibilidad de una dilución isotópica. En donde el producto de la nueva dieta aún no refleje su señal, por lo tanto el organismo pudiera no estar en equilibrio isotópico con su alimento (Gannes *et al.*, 1997).

Estos modelos de mezcla consisten en modelos matemáticos lineales simples o bayesianos que expliquen el balance de masas entre las dietas y el tejido. Estos modelos de mezcla usan n número de isótopos y pueden calcular la proporción de las dietas para $n+1$ de diferentes fuentes de alimento.

Enrutamiento isotópico

En el medio natural los animales consumen una dieta variada, en la cual podría existir la posibilidad de tener una combinación de dos o más ingredientes que constituyen el total de su dieta, los cuales no sólo difieren en la cantidad, tipo de macronutriente por el cual están constituidos (proporción relativa de carbohidratos, proteínas y grasas) sino que también pueden contener valores isotópicos distintos, como lo hemos venido explicando en secciones anteriores. Después de la ingestión estos substratos podrán ser enrutados o dirigidos a diferentes destinos en el organismo, ya sea retenidos o utilizados para otras funciones. Es así que, los carbohidratos son utilizados preferentemente como combustible para el metabolismo energético y en el caso de las proteínas y los lípidos si no son utilizados como

|
fuente de energía y son retenidos en órganos a través de un proceso de síntesis (Voigt *et al.*, 2008). El periodo de integración requerido para un ingrediente de la dieta en un organismo, depende de varios factores como el tipo de tejido y la tasa de recambio, ésta última como reflejo de la actividad metabólica.

En experimentación controlada es posible el estudio de la retención a través de la manipulación con distintas fuentes proteicas con un valor isotópico claramente distinto y así poder estudiar dichos procesos, ya sea de retención, enrutamiento y tasa de recambio de los distintos tejidos. Los peces son un modelo ideal para hacer este tipo de estudios, aparte de que su estudio nos permitirá conocer sus requerimientos nutricionales y así incluso, nos permitirá disminuir o eliminar el uso de harina de pescado en su dieta, considerada como la fuente de proteína más adecuada para el desarrollo de los peces; no sólo por su perfil óptimo de aminoácidos, sino también por presentar una alta digestibilidad y un desempeño adecuado. Es así que diversos estudios han demostrado que en peces marinos, las fuentes de proteína vegetal no presentan un desempeño similar al de la harina de pescado aún cuando se tengan perfiles de aminoácidos similares y estén cubiertos otros requisitos como taurina, ácidos grasos, entre otros (NRC, 2011).

Por otro lado, las harinas de subproducto de ave han demostrado contener un alto nivel de digestibilidad y su proceso actual permite una producción homogénea del producto con una calidad sostenida en cuanto a su perfil de aminoácidos y cantidad de grasa cruda. Además, hoy en día la cantidad generada de éstos

|
subproductos es considerable, lo que permite a los formuladores integrarla de forma adecuada a nivel industrial (Sealey *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista isotópico, estas harinas de ave son también ideales para este tipo de estudios ya que las aves tienen una alimentación vegetal lo que hace que su registro isotópico sea totalmente distinto a un carnívoro acuático (Gamboa-Delgado *et al.*, 2013).

Es por esto que el presente trabajo tuvo como propósito el evaluar el nivel de retención entre la harina de pescado y de subproducto de ave en distintas especies de peces con el fin de poder substituir la harina de pescado.

|

1.1 HIPÓTESIS

El uso de isótopos estables en dietas formuladas con cuatro niveles de sustitución de la harina de pescado por subproducto de ave (0, 33, 67 y 100%) nos permitirá encontrar el nivel de retención y fraccionamiento isotópico de cada fuente.

1.2 OBJETIVOS:

Objetivo General

Evaluar el crecimiento y retención proteica en trucha y cuatro especies de peces marinos a partir de dietas formuladas con la sustitución de harina de pescado por harina de subproducto de ave para generar nuevas formulaciones con este ingredientes proteico, utilizando la técnica de isótopos estables como herramienta.

Objetivos Particulares:

1. Determinar el efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de subproducto de ave en el crecimiento, sobrevivencia y desempeño bajo condiciones controladas de laboratorio en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion othonopterus*), lobina rayada (*Morone saxatilis*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

2. Determinar el porcentaje relativo de la retención del N utilizando la técnica de isótopos estables en ensayos de alimentación

3. Comparar el valor de fraccionamiento isotópico obtenido en músculo e hígado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*), lobina rayada (*Morone saxatilis*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*) en ensayos de alimentación con dietas formuladas con cuatro niveles de sustitución de la harina de pescado por harina de subproducto de ave (0, 33, 67 y 100

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de un diseño experimental común bajo condiciones controladas de laboratorio se utilizaron 5 especies; Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Totoaba (*Totoaba macdonaldi*), Curvina Golfina (*Cynoscion Othonopterus*), Lobina Rayada (*Morone saxatilis*) y Lenguado de California (*Paralichthys californicus*) para el estudio de la retención de N a partir de dos fuentes proteicas. Con este fin se formularon las dietas con base a los requerimientos óptimos de proteína y grasa para cada una de las especies (NRC, 2011; Rueda-López, 2011). Entre estas especies, todas ellas carnívoras, se encuentra una de agua dulce, tres netamente marinas y una que es anádromo con reproducción en agua dulce y habita en un ambiente marino.

El diseño experimental consistió en 4 tratamientos con tres repeticiones utilizando un sistema aleatorizado con 12 estanques conectados a un filtro biológico en un sistema de recirculación. Las dietas fueron formuladas con cuatro niveles de sustitución proporcional de la fuente proteica de 0 a 100 de la harina de pescado (HP) por harina de subproducto de ave (HA). La dieta 0HA constituida por 100% harina de pescado, la dieta 33HA, 33% harina de ave (HA) y 67% de harina de pescado (HP), la dieta 67HA, por 67 y 33% de HA y HP respectivamente y la dieta 100HA, con el 100% de HA (Cuadro I). Las dietas se formularon de acuerdo a los requerimientos de cada especie y para cada experimento éstas fueron isoproteicas e isoenergéticas (Cuadro II). Antes de la elaboración de las dietas experimentales se

|

realizó un análisis isotópico de la harina de pescado y de la harina de subproducto de ave como principales fuentes de proteína en la dieta.

1 Cuadro I. Ingredientes (g 100 g⁻¹ peso seco) de cuatro dietas experimentales con
 2 cuatro niveles de sustitución de harina de ave (0, 33, 67 y 100 %) por harina de
 3 pescado para cada 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 ave	0.0	0.5	1.7	3.5
	Aceite de Pescado	7.2	5.2	2.8	0.0
	Almidón de maíz	9.1	13.1	16.6	20.1
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 pescado	2.9	1.9	0.9	0.0
	Almidón de maíz	16.7	16.9	17.6	17.9
curvina golfina (<i>Cynoscion Othonopterus</i>)	Harina de ave ^a	0.0	22.5	45.0	66.0
	Harina de pescado ^b	65.0	43.0	21.5	0.0
	Aceite de pescado	2.9	1.9	0.9	0.0
	Almidón de maíz	16.5	16.9	17.5	17.1
lobina rayada (<i>Morone saxatilis</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 ave	0.0	3.2	6.7	10.5
	Aceite de pescado	12.9	8.8	4.4	0.0
	Almidón de maíz	8.7	9.2	9.2	10.3
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 pescado	2.9	2.0	1.0	0.0
	Almidón de maíz	18.8	19.2	19.6	20.7

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

6 ^a "Pet food grade" procedente de los Estados Unidos y donada por la "National Renderers
 7 Association"

8 ^b Harina de pescado de Proteínas Marinas y Agropecuarios de Guadalajara Jalisco, México.

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

11

12 Cuadro II. Composición proximal promedio (%) en base seca de las dietas experimentales para las especies bajo
 13 estudio.

14

Especie	Composición Proximal (%)			
	Proteína cruda	Grasa Cruda	Cenizas	ELN*
trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	43.5±0.3	12.5±0.1	14.0±4.7	30.0±4.6
totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>)	51.4±0.3	8.0±0.1	11.3±2.1	29.4±2.0
curvina golfina (<i>Cynoscion Othonopterus</i>)	51.3±0.3	9.1±0.1	11.3±2.4	28.3±2.5
lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>)	51.4±0.2	18.6±0.3	12.1±2.3	17.9±2.6
lenguado de California (<i>Paralichthys californicus</i>)	50.3±0.2	9.3±0.3	12.2±2.2	28.2±2.1

15 * ELN= 100 – (% Proteína cruda + %Grasa cruda + %Cenizas)

Condiciones de cultivo

En todos los casos, juveniles de cada una 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 de agua para mantener constantes las condiciones en cuanto a la calidad del agua. La temperatura (°C) en cada uno de los ensayos experimentales se mantuvo constante para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) $14.0\pm 1^{\circ}\text{C}$, para totoaba (*Totoaba macdonaldi*) de $26.0\pm 1^{\circ}\text{C}$, para curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*) de $28.0\pm 1^{\circ}\text{C}$, para lobina rayada (*Morone saxatilis*) de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ y para lenguado de California (*Paralichthys californicus*) $17\pm 1^{\circ}\text{C}$ a través del uso de calentadores y/o enfriadores según la especie bajo estudio. En todos los ensayos experimentales se manejó un régimen similar de alimentación a saciedad con tres raciones por día (0800, 1300 y 1900 horas).

Análisis proximales

Se realizó un análisis proximal de las dietas, músculo e hígado (antes y después) de cada experimento. Todos los análisis se hicieron por triplicado y fueron reportados en materia seca de acuerdo a los estándares propuestos por AOAC (1995).

En todos los ensayos experimentales muestras de músculo de los peces fueron colectadas de la zona dorsal junto a la aleta. Las muestras fueron almacenadas individualmente y congeladas a -30°C hasta su análisis.

Determinación de Humedad

El análisis de humedad se determinó por diferencia de pesos de acuerdo a lo recomendado por la AOAC (1995). Se pesaron aproximadamente 2 gramos de muestra en una cápsula de aluminio (previamente calcinada y puesta a peso seco constante), la cual se pasó a una estufa a 100°C por un periodo de 4 hrs. Al término de este tiempo se introdujo en un desecador para ponerla a temperatura ambiente. Se obtuvo el peso con una balanza analítica (precisión ± 0.0001), y posteriormente se introdujo de nueva cuenta en la estufa por un periodo de 2 horas siguiendo el protocolo anterior hasta obtener un peso constante.

Determinación de cenizas

Las cenizas se estimaron por calcinación de acuerdo a lo recomendado por la AOAC (1995). Se colocaron 0.5 g de muestra en una cápsula de aluminio (previamente calcinada y puesta a peso constante). Las muestras se calcinaron a 550°C por un periodo de 5 horas. Posteriormente se pasaron las muestras a un desecador para ponerlas a temperatura ambiente. Se obtuvo el peso con una balanza analítica (precisión ± 0.0001 g).

Determinación de nitrógeno total y proteína cruda

Se determinó el porcentaje de proteína cruda por medio de la cuantificación de nitrógeno por el método micro-Kjeldhal (AOAC, 1995). El cual se llevó a cabo con 0.050 g de muestra que se pesó y se puso en un matraz Kjeldhal para agregarle 1.5 g de K_2SO_4 , 0.050 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 3 mL de H_2SO_4 . Los matraces se calentaron hasta que se obtuvo un color verde cristalino en la muestra. Al enfriarse, se aforo a 25mL con agua destilada. Un volumen conocido (5mL) del aforado del producto de la digestión se destilo hasta un volumen de 40 mL sobre una solución que contenía 15 mL de ácido bórico y 3 gotas del indicador de pH Shiro-Toshiro. Después de hizo la titulación con una solución de HCl hasta que se obtuvo el primer vire de color de la solución.

El porcentaje de proteína se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{mL de HCl consumido} - \text{mL muestra-blanco}) \times N \text{ HCl} \times 1.4}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ de Proteína} = (\% N) \times 6.25$$

Determinación de grasa total

La concentración de grasa total se determinó por gravimetría después de la extracción por el método de Soxhlet. Este se llevó a cabo con 2.0 g de muestra

|
que fueron pesados en un filtro de papel con una retención de partícula de 11µm de 125 mm de Ø de la marca WATTMAN™, utilizando como solvente acarreador éter de petróleo, por un periodo de 4 hr.

Extracto libre de nitrógeno

El extracto libre de nitrógeno se determinó por diferencia mediante la siguiente fórmula:

(% ELN = 100 – (% de proteína cruda + % de lípidos + % de cenizas).

Determinación de aminoácidos

Se obtuvo el perfil de aminoácidos (AAs) de las dietas experimentales, a partir de muestras desengrasadas. Una muestra de 25 mg se colocó en viales de vidrio con tapa presurizada y capacidad de 1.0 mL. Se agregaron 200 µL de una mezcla de HCl 6N con 0.06% de fenol para una digestión a 110 °C durante 24 hrs. Posteriormente las muestras frías se filtraron a través de acrodiscos de 0.45 µm. Las muestras se derivatizaron de acuerdo a lo recomendado por Waters mediante un kit comercial *AccQ•Taq*™ (WATERS®). Se utilizó un HPLC marca WATERS®, y una columna de fase reversa C18 (3.9 X 150 mm) a 37°C. Se empleó un volumen de inyección de 5 µL a una concentración de 25 mg/mL, con un gradiente de buffer de boratos al 10% (WATERS®) acetonitrilo al 60%, a un flujo constante de 1mL/min. El sistema estuvo acoplado a un detector de

|

fluorescencia (Waters 474 series, Milford, MA, USA) con longitudes de onda de 254/395 nm excitación/emisión para la detección de los AAs. La curva de calibración fue obtenida mediante una solución de AAs estándares con 5 concentraciones de 18.5 a 300 pmol. La integración de los datos se realizó con el programa “Empower” (Waters corporation, 2005).

Determinación de ácidos grasos.

La extracción de lípidos se realizó siguiendo la técnica descrita por Folch *et al.* (1957), pero modificada utilizando diclorometano en vez de cloroformo. Se pesó 1.0 g de muestra de alimento o músculo, se agregó 1 mL de agua destilada sólo en el caso del alimento y 2 mL de solución de extracción 2:1 (diclorometano-metanol), 50 µL de BHT al 1% y se dejaron reposar durante 20 hrs a 4°C, tapados con papel aluminio. Después de este tiempo se centrifugaron 10 minutos a 4400 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se colocó en otro vial previamente pesado, posteriormente se agregaron 0.25 volúmenes de NaCl al 0.75% se agitó en vortex, se recuperó la fase de diclorometano en un vial ámbar previamente pesado y se evaporó el solvente con nitrógeno. Se pesó el vial conteniendo los lípidos y se calculó el contenido de lípidos totales por diferencia del peso inicial. Una vez extraídos los lípidos totales se inició el proceso de saponificación el cual consistió en agregar 100 µL de una solución de 0.3N de KOH metanólica al 90% a la muestra resultante de la extracción y se dejó en baño maría a 60°C por 30 minutos, se agregaron 550 µL de agua destilada. Se agitó y se centrifugó por 5

minutos a 4400 rpm a 4°C, se descartó la capa superior y se agregaron 300 µL de agua destilada. La mezcla se acidificó con 1 gota de HCl al 6N, 250 µL de hexano, se extrajo la capa superior y se evaporó con nitrógeno. La metilación se llevó a cabo agregando 500 µL de Trifluoruro de Boro (BF₃) al 14% en metanol (Sigma B1252) en baño maría a 60°C por 15 min. Después se agregó agua destilada y hexano, se descartó la fase de agua y se dejó la fase con hexano que contiene los ácidos grasos, se secaron con nitrógeno y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases. Los metil-esteres de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases capilar (Agilent GC6850) en una columna (DB-23, Modelo No. Agilent 122-2362E, 60 m x 250 µm x 25.0 µm nominal). Como gas transportador se utilizó nitrógeno a un flujo de 0.7 mL/min, se utilizó 1 µL de volumen de inyección, con un Split de 50:1. La temperatura inicial fue de 130°C por 1 min, después se llevó a 170°C a una tasa de incremento de temperatura de 6.5 °C/min. Se llevó a 215 °C a una tasa de 2.75 °C/min y se mantuvo por 12 min más. Posteriormente se aumentó a 230 °C a una tasa de 40°C/min. Los ácidos grasos se identificaron y cuantificaron por comparación utilizando estándares de aceites y FAME mix (Supelco 37) a distintas concentraciones para generar una correlación lineal. Los cálculos se efectuaron mediante el software HP “*Chemstation*” para Windows (“*Data Analysis Application Model*” G1701EA E.02.00.493). Se tomó en cuenta el tiempo de retención relativo del C16 para su posterior identificación de los A.G. Se utilizó el

porcentaje de cada ácido graso presente en el cromatograma para estimar el porcentaje del total de ácidos grasos.

Análisis isotópico.

La determinación de isótopos estables de N y C se realizó a partir de muestras desengrasadas de los ingredientes y de las dietas ya elaboradas así como de las muestras iniciales y finales de músculo e hígado. En resumen, muestras de 1.5 mg fueron pesados en una ultra balanza ($\pm 0.1\mu\text{g}$). Se almacenaron en cápsulas de estaño para su envío y análisis al laboratorio de isótopos estables de la Universidad de California Davis (EUA). Dichos análisis se llevaron a cabo mediante un analizador elemental de interfaz con un espectrómetro de flujo continuo de masas de relación isotópica (IRMS) con una precisión de 0.3‰ para $\delta^{15}\text{N}$ y 0.2‰ para $\delta^{13}\text{C}$. El valor isotópico de la muestra fue expresado con la connotación delta (δ) en partes por (‰) relativo al nitrógeno atmosférico en el caso del N y Vienna Pee Dee Belemnite en el caso del C siguiendo la siguiente fórmula:

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

en donde R de la muestra y R del estándar representan la relación del isótopo pesado al isótopo ligero ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

El factor de discriminación (Δ) fue calculado para cada uno de los experimentos con los valores isotópicos obtenidos del hígado y del músculo para

N después del periodo de experimentación y el valor isotópico de cada una de las dietas experimentales (OHA, 33HA, 67HA y 100HA) con la siguiente ecuación:

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

Un modelo de mezcla isotópico con dos fuentes (HP y HA) y con un sistema isotópico (N), se utilizó para estimar la fracción de cada fuente que fue retenida diferencialmente en el tejido muscular que se encontraba en equilibrio isotópico con su dieta para los tratamientos 33HA y 67HA en donde se había hecho una mezcla de fuentes proteicas (Phillips y Koch, 2002)

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

$$1 = f_{\text{HP}} + f_{\text{HA}}$$

en donde $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{HP}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{HA}}$ son la composición isotópica del musculo del organismo, HA y HP respectivamente y f_{HP} and f_{HA} son la fracción de nitrógeno retenido. Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{músculo}}$ fueron corregidos por el factor de discriminación isotópica usando el valor promedio calculado para músculo en equilibrio con su dieta para los tratamientos 33 y 67HA al final de 80 días de experimentación.

|

Análisis estadístico

Para observar posibles diferencias entre los índices biológicos fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) ($n=3$). Para aquellos en donde se hubieran detectado diferencias estadísticas, se utilizó la prueba a posteriori de Tukey mediante el programa SigmaStat para Windows 3.5

1.4 DISCUSIÓN GENERAL

En este apartado se abordaran en forma global los experimentos realizados en el trabajo de la tesis y en cada uno de los siguientes capítulos se aborda cada caso particular.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue el determinar a través de la técnica de isótopos estables el nivel de retención del nitrógeno de la harina de subproducto de ave en comparación al de la harina de pescado y el efecto diferencial entre las distintas especies. Si bien el estudio pudiera estar encaminado a la búsqueda y comprobación de técnicas que nos permitan evaluar distintas fuentes proteicas en su capacidad de dar respuesta a un crecimiento óptimo, los resultados obtenidos nos permite afirmar que la harina de pescado puede ser reemplazada bajo determinadas condiciones que se discutirán más adelante. El uso de los isótopos estables como aquí se demuestra, resulta ser una herramienta para conocer el % de retención proteica de distintos ingredientes que son incorporados en dietas como substitutos a la harina de pescado y poder diseñar dietas con mayor exactitud que beneficien el crecimiento. Si bien este objetivo fue cumplido, se podría ahondar un poco más sobre las cuestiones que implica esta técnica. A través de los distintos experimentos con las especies de peces utilizadas ((trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), curvina golfina (*Cynoscion Othonopterus*), lobina rayada (*Morone saxatilis*) y lenguado de California (*Paralichthys californicus*)) se observó de

manera general que la harina de subproducto de ave (HA) constituye un ingrediente con calidad alta para ser utilizado con este propósito. De acuerdo a los resultados obtenidos, la recomendación en el uso de HA en dietas formuladas para peces marinos con Ha y Harina de pescado como únicas fuentes de proteicas es una inclusión de HA no mayor al 67%. Se estima que la substitución total pudo haber estado limitada por la baja proporción de LC-PUFAs contenido en las dietas. Con base a los análisis del contenido de ácidos grasos realizado en las distintas dietas de los procedimientos experimentales es evidente el bajo nivel de los valores de los ácidos grasos esenciales. Por ejemplo, el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), a medida de que se incrementa la cantidad de HA éstos disminuyen llegando a niveles inferiores a lo recomendado para peces de acuerdo al NRC (2011). Hecho que desde un principio nos hizo pensar en la baja probabilidad de éxito de ese tratamiento en particular (100HA). Cuando los diseños experimentales fueron desarrollados en un inicio, se estableció el contar con una dieta que contuviera las fuentes de proteína y grasa total de origen marino y otra que el origen de la proteína y la grasa total fuera de subproducto de ave, de igual forma se realizaron las mezclas correspondientes para mantener la relación proteína y grasa total en los tratamientos 33 y 67% de cada una de las especies. La harina de ave fue seleccionada por ser una excelente fuente proteica con potencial para poder substituir a la harina de pescado, aunado a esto se consideró que la naturaleza de esta harina presentaría valores isotópicos distintos a la harina de pescado, por

provenir de distintos ambientes, esto debido a que las aves al consumir granos y semillas presentaría distintos valores isotópicos a los obtenidos en la HP, lo cual nos permitiría obtener un amplio intervalo isotópico entre estas dos fuentes proteicas, reflejando distintos valores isotópicos en las dietas una vez que fueran elaboradas. En peces como totoaba y curvina golfina cuyo requerimiento de lípidos es bajo (8%), el tratamiento 100HA se volvió crítico ya que no era necesaria la adición de aceite de pescado. Por lo que el contenido de EPA y DHA fue aún menor. En cambio, en lobina rayada y lenguado en donde el contenido de lípidos en las dietas fue mayor, fue necesaria la adición de aceite, que para mantener el diseño experimental homogéneo a los otros, se adicionó aceite de subproducto de ave de ave. No mejorando la condición del requerimiento de EPA y DHA en las dietas.

Del 100 por ciento de la contribución de nitrógeno que se tenía previsto en las distintas dietas el 90% fue aportado por la HP y HA, y el 10% restante fue atribuido a la incorporación de la gelatina. Esta última agregada como aglutinante en la dieta.

En el capítulo II en el cual utilizamos trucha arcoíris, el resultado fue distinto a lo esperado. Se obtuvo un incremento en peso similar en todos los tratamientos, incluso en el tratamiento 100HA en el que se tenía previsto que no hubiese crecimiento. Lo anterior haciendo referencia a la posible deficiencia en los ácidos grasos esenciales (EPA y DHA) que de acuerdo al NRC (2011) se

|

estipula que deberán ser mayores a 1% del total de ácidos grasos. La trucha al ser un pez de agua dulce sus requerimientos de LC-PUFAs (EPA y DHA) podrían ser menores por lo que la respuesta no se vio afectada de igual manera por el aporte bajo de éstos, al menos durante el periodo experimental. Sin embargo, en todas las especies marinas como totoaba, curvina golfina, lobina y lenguado las cuales son organismo desarrollados en agua de mar, se vio un marcado efecto debido a la falta de estos ácidos grasos (EPA y DHA). Si bien se sabe que la lobina a pesar de que es un organismo que puede ser adaptado tanto al ambiente marino como al ambiente dulceacuícola, su carácter eurihalino pudo haber sido determinante para requerir los LC-PUFAs en mayor cantidad (Rawles *et al.*, 2012). Sin embargo, cabe destacar que sólo en el caso de la totoaba con inclusiones de hasta en un 67% de sustitución de harina de subproducto de ave los organismo crecieron más del doble que el tratamiento control con HP (capítulo III). En los organismos marinos nos enfocamos principalmente al crecimiento obtenido en totoaba debido a que en las otras especies estudiadas (curvina golfina, lobina, lenguado) los crecimientos obtenidos fueron menores a los deseables para una especie comercial. Se sabe que tanto curvina golfina como lenguado presentan crecimientos bajos (Aragon-Noriega, 2014; Badillo *et al.*, 2010), mientras que la lobina es conocida por su capacidad a adaptarse a ambientes distintos y con una velocidad alta de crecimiento (Rawles *et al.*, 2012). La empresa ("*Pacífico Aquaculture*" S de RL de CV) que amablemente nos hizo la donación de estos organismo insistió en que se evaluara esta dieta bajo

condiciones similares a las de cultivo ($18\pm 1^\circ\text{C}$). Temperatura a la cual la lobina presenta una tasa de crecimiento menor que la que pudiera observarse a su óptima de crecimiento ($22 - 24^\circ\text{C}$; Muller-Belecke et al., 2015). En este caso particular podemos decir que el crecimiento bajo, aquí observado, podría estar atribuido a la baja temperatura de cultivo implicando al metabolismo y por ende, desempeño en crecimiento (Person-Le *et al.*, 2004).

En cada uno de los ensayos experimentales en donde se obtuvieron crecimientos superiores al 400% se estimó el factor de discriminación de N al final del tiempo experimental (capítulo II, III). En éstos se obtuvo que cada especie presentó distintos fraccionamientos como muestra del enriquecimiento isotópico en los organismos, a pesar de que los ingredientes eran los mismos y las dietas se formularon para contener los niveles requeridos de acuerdo a la información existente de cada especie (NRC, 2011). Lo anterior puede implicar que las dietas establecidas para cada especie aún no son las ideales ya que el aprovechamiento es distinto.

El enriquecimiento isotópico es un reflejo de la concentración de los isótopos pesados con relación a los ligeros. La técnica de isótopos estables parte del principio de que todo organismo deberá llegar al equilibrio isotópico con su alimento. De acuerdo a Martínez del Río *et al.*, 2009, el enriquecimiento isotópico nos lleva a varios cuestionamientos tales como: 1) los peces no alcanzaron un equilibrio isotópico con su alimento (en caso de que los organismos iniciales

hubiesen presentado un valor isotópico más elevado a las dietas experimentales). 2) Que el nitrógeno contenido en las dietas una vez que es asimilado por los organismo pase por procesos de enrutamiento isotópico producto de los distintos procesos metabólicos del organismo. 3) Que los organismos hubieran recibido una fuente proteica mal balanceada existiendo la necesidad de cierto nivel de AA esenciales y que el resto fuera utilizado como fuente energética.

El perfil de AA de las dietas era muy similar por lo que el enriquecimiento diferencial entre los distintos niveles de sustitución para cada especie no es atribuible a un mal balanceo de los AA. Entonces podría ser probable que la biodisponibilidad fuera la causante del aprovechamiento diferencial de los AA.

Con relación a la calidad de la proteína en la dieta existen estudios que relacionan el nivel de la calidad con los valores de factor de discriminación obtenidos por un consumidor y su dieta (Martínez del Río *et al.*, 2009). Robbins *et al.* (2010) encontraron que en dietas para ratas con altos valores proteicos, principalmente de la harina de pescado, se mostraron valores de factor de fraccionamiento más bajos que en aquellos en donde la principal fuente proteica era a base de harinas vegetales (3.3‰ vs 5.0‰, respectivamente). Esto refuerza la idea de que no sólo la cantidad sino la calidad de una fuente proteica dada es importante y está estrechamente relacionada con el factor de discriminación obtenida por los organismos (Martínez del Río y Wolf, 2005; Martínez del Río *et al.*, 2009). Aquí, el factor de discriminación en músculo e hígado fue

relativamente similar a lo reportado en la literatura (Post, 2002) que marca valores hasta un 3.8‰. Los valores experimentales aquí obtenidos fueron desde 0 hasta 5‰. Este comportamiento refleja una vez más que el aprovechamiento de los AA de las distintas fuentes de proteína varía de acuerdo a la especie. Por ejemplo, en la trucha arcoíris al ser un organismo omnívoro, en contraste con las demás especies que se utilizaron en estos ensayos (carnívoros) presentó valores más bajos (2.0, 1.1, 1.0 y -0.1(‰) para los tratamientos 0HA, 33HA, 67HA y 100HA respectivamente). Esto nos hace suponer que los nutrientes que fueron incorporados en las dietas son utilizados e incorporados de mejor forma sobre todo los de HA ya que el tiempo de permanencia en el tracto intestinal es mucho más largo. Mientras que en los peces carnívoros al presentar un intestino significativamente más corto que el de trucha quizás tienen un menor tiempo para aprovechar los nutrientes de la dieta. En la totoaba el factor de discriminación aumentó conforme se incrementó la HA en un intervalo de 2.8 a 4.9 (‰) en el músculo, y en hígado de 1.2 a 4.4 (‰). Esto pudiera significar un menor aprovechamiento de los nutrientes de la HA. Lo anterior nos hace suponer que la digestibilidad de la HA se realiza en mayor tiempo. Si bien lo anterior es una especulación, sería interesante probar la digestibilidad de la HA de una manera más puntual. En los demás experimentos con las otras especies en un ambiente marino al presentar un bajo índice de crecimiento, resultó imposible que hubiesen alcanzado un equilibrio isotópico.

|

En ecología los valores de discriminación isotópica para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ son entre 0.5-1.0‰ y 3-4‰, respectivamente, los cuales son tomados de un promedio de un compendio de datos de muchas especies y no de muestras con una experimentación controlada de cada especie (De Niro y Epstein, 1978; Post, 2002). Por dicha razón muchos autores han cuestionado la forma en que estos factores hayan sido calculados. Por ejemplo, Martínez del Río *et al.* (2009) mencionan que basados en los distintos experimento que se han llevado a cabo con organismos acuáticos el factor de discriminación de la dieta depende mucho de la especie con la que se esté trabajando y el tipo de tejido que se esté analizando. Caut *et al.* (2009) realizó una extensa revisión bibliográfica sobre factores de discriminación, reportando que en la mitad de los estudios donde se utilizaban modelos isotópicos de mezcla para la reconstrucción de dietas, el factor de discriminación utilizado correspondía a valores previamente reportados como un valor promedio y mientras que en estudios en donde se habían utilizado datos experimentales, los factores de discriminación eran distintos a los obtenidos con anterioridad; encontrando valores para $\Delta^{13}\text{C}$ que van desde los 0.4‰ al 4.1‰ y para el $\Delta^{15}\text{N}$ de 0.1‰ a 5.3‰. El factor de discriminación isotópica es fundamental para reconstruir proporciones de cada ingrediente retenido en la dieta además de ser requeridos para estimar el nivel trófico de un animal (Pérez *et al.*, 2008). En este estudio se pudo comprobar experimentalmente cuales fueron los valores de discriminación reales obtenidos por experimentación.

|

El aspecto más relevante dentro de estos ensayos experimentales fue el poder estimar el nivel de retención de N proporcionado por cada una de las dos fuentes proteicas (HP y HA). Esto se logró gracias a la utilización de la ecuación de balance de masas para un sistema isotópico (N), con dos fuentes (HP y HA) y el factor de discriminación obtenido en cada ensayo experimental en los tratamientos (33HA y 67HA); tratamientos en los que se realizó la mezcla de dichos ingredientes. Esto se debe llevar a cabo una vez que los organismos hayan alcanzado el equilibrio isotópico con su dieta, basados en una ganancia en peso durante el experimento a través de una cierta cantidad de alimento ingerido. Como se mencionó con anterioridad, una condición importante para llegar al equilibrio isotópico es que el organismo haya consumido el alimento en tal cantidad que haya dado lugar a que los tejidos hayan sobrepasado la tasa de recambio proteico, la cual varía de acuerdo al estado metabólico de cada tejido. En un organismo con una alta tasa de crecimiento un 400% de ganancia en peso puede asegurar que se haya llegado al equilibrio (NRC, 2011). Sin embargo, en organismos cuya tasa de crecimiento sea lenta, ya sea por edad o estado metabólico el equilibrio se logra una vez que el organismo haya consumido al menos dos veces su peso en alimento (NRC, 2011). En los experimentos aquí realizados se obtuvieron crecimientos óptimos con la trucha y totoaba (capítulo II y III) en donde se demostró, que en ambos casos, el nivel de retención de N fue semejante y con valores incluso más altos por parte de la harina de subproducto de ave. Una posible explicación es que el subproducto de ave sea tan

|

aprovechable como la harina de pescado. De acuerdo a varios reportes (Cheng y Hardy, 2002; Subhadra *et al.*, 2006; Saley *et al.*, 2011) las mejoras tecnológicas en la elaboración de la harina de subproducto de ave, ha permitido mostrar una digestibilidad aparente entre un 69 y 96%, además de presentar un perfil de aminoácidos semejante al de la harina de pescado (Salley *et al.*, 2011). La harina de ave presenta un perfil de ácidos grasos distinto al de la harina de pescado, la cual presenta una carencia de LC-PUFAs pero también hay una elevada cantidad de ácidos grasos monosaturados como el oleico. El hecho de que no hubiera habido una excesiva acumulación de éste ácido graso monosaturado en el tejido de trucha (Parés-Sierra *et al.*, 2014) y Totoaba (Capítulo III), nos hace suponer que se estaban utilizando de forma eficiente como fuente energética; mientras que la proteína pudiera utilizarse en crecimiento, proceso conocido como “ahorro de proteína”.

1.5 CONCLUSIONES GENERALES

- Ingredientes con señales isotópicamente distintas permite evaluar con mayor precisión el nivel de retención del N de las distintas fuentes que son incorporadas de una dieta
- El uso de isótopos estables nos permitió demostrar que la harina de subproductos de ave es igualmente retenida a la harina de pescado
- En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) la harina de subproducto de ave mostró ser un posible sustituto de la harina de pescado.
- En totoaba (*Totoaba macdonaldi*) la inclusión de la harina de subproducto de ave es un buen sustituto al 67% de la harina de pescado, aunque el perfil de AG no es igual al de la HP
- Para totoaba la inclusión de dos terceras partes de HA por una de HP resultó en un crecimiento significativamente mayor (2.5 veces más) que una dieta con 100% de harina de pescado
- La curvina golfina, lobina rayada y lenguado de california debido al bajo crecimiento reportado de estos lotes no nos lleva a concluir sobre su capacidad de retención
- Bajo condiciones comerciales de cultivo de peces, el uso de isótopos estables podría representar una buena alternativa como herramienta para determinar la calidad proteica de las dietas comerciales

1.6 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.
- Aragón-Noriega, E.A., 2014. Modeling the individual growth of the Gulf corvina *Cynoscion othonopterus* (Pisces: Sciaenidae), using a multi-model approach. Ciencias marinas. ISSN 0185-3880
- Badillo-Zapata, D., Correa-Reyes, G., Abramo, D. Lr., Lazo, J.P., Toro-Vazquez, Jf., Viana, M.T. 2010. Effect of replacing dietary fish oil with vegetable oils on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*). Rev. Ciencias marinas. 36(2):121
- Caut, S., Angulo, E., Courchamp, F., 2009. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. Journal of Applied Ecology. 46: 443-453.
- Carleton, S.A. y C. Martínez del Río. 2010. Growth and catabolism in isotopic incorporation: a new formulation and experimental data. *Functional Ecology* 24: 183-264.
- Cheng, Z.J. y Hardy, R.W., 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.

- |
- CONAFAB (Consejo Nacional de fabricantes de Alimentos balanceados y de la Nutrición Animal). La Industria Alimentaria Animal de México. 2012. México, D.F.
- Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., Civera, R., Haard, N.F., 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in White shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157:251-262.
- De Aguiar, A.C., Boroski, M., Giriboni-Monteiro, A.R., De Souza, N.E., Visentainer, J.V., 2011. Enrichment of whole wheat flaxseed bread with flaxseed oil. *Journal of Food Processing and Preservation* 35: 605-609.
- DeNiro M.J., Epstein S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotope ratios in animals *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- Focken, U., 2005. Stable isotopes as tracers for the metabolic routing of individual dietary components. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 14:37.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G., 1957. A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 22, 497-509.
- Fry, B., 2006. *Stable Isotope Ecology*. Springer ed., Baton Rouge, LA USA 308 p
- Gamboa-Delgado, J., Le Vay, L., 2009a. 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.

- Gamboa-Delgado, J., Cañavate, J.P., Zerolo R., Le Vay, L., 2008. Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 280, 190-197.
- Gamboa-Delgado, J., Rojas-Casas, M.G., Nieto-López, M.G., Cruz-Suárez, L.E., 2013. Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture* 380-383, 33–40.
- Gannes, L.Z., O'Brien, D.M., Martinez del Rio, C., 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78:1271- 1276
- Gatlin, D. M., Barrows F., Brown, T.P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Kroghdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E. J., Stone, D., Wilson, R. & Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38: 551-579.
- 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.

- Gonzales-Salas, R., Romero-Cruz, O., Valdivie-Navarro, M., Ponce-Pala-fox, J.T., 2014. Los productos y subproductos vegetales, animales y agroindustriales: una alternativa para la alimentación de la tilapia. *Revista Bio Ciencias* 2(4):240-251.
- Hardy, R. W., 1998. Back to the future. *Aquaculture*.24: 78-81.
- 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.
- Lehninger, H. A., 1989. *Bioquímica*, Segunda edición, editorial Omega, Barcelona España. 1117 pp.
- 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
- Lopera-Barrero, N.M., y Poveda-Parra, A.R., 2009. Exigencias nutricionales en peces tropicales: factores y métodos de estimación. *Revista colombiana de ciencia animal*, Vol. 2, No. 2.
- Martínez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S.A., Gannes, L.Z., 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84:91-111.
- Martínez del Rio, C., Wolf, B.O., 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.

- Muller-Belecke, A., Bohm, M., Pfeifer, M., Fullner, G. 2015. Potential of hybrid striped bass (*Moreone saxatilis* (Walbaum) X *Moreone chrysops* (Rafinesque)) to reproduce among climatic conditions of northern and central Germany. *Aquaculture Research*. 1-5
- National Research Council. 1993. Nutrient requirements of fish. Washington, D.C. National Academy Press
- National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC, p 376.
- Pares-Sierra, G., Durazo, E., Ponce, M.A., Badillo, D., Correa-Reyes, G., Viana, M.T., 2014. 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. *Aquaculture research*. 45: 1459-1469
- Pedersen, B., y Eggum, B.O., 1983. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure, *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.*, 49: 265-277.
- Pérez, E.G., Schondube, J.E., Martínez del Río, C., 2008. Isotopos estables en ornitología: Una Introducción breve. *Ornitologia Neotropical*. 19: 95-112.
- Person-Le Ruyet, J., Mahe, K., Le Bayon, N. and Delliou, H. 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237: 269-280.

- |
- Phillips, D.L., Koch, P.L., 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130: 114-125.
- Post, D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83, 703–718.
- Rawles, S.D., Green, B.W., Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Matthew, E.M., Freeman, D.W., 2012. Response of sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to digestible protein/ dietary lipid density and ration size at summer culture temperatures in the Southern United States. *Aquaculture* 357, 80-90.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa-Reyes G., Viana, M.T., 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juveniles *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319, 385-390
- Sealey, W.M., Hardy, R.W., Barrows, F.T., Pan, Q., Stone, D.A., 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.
- Subhadra B, Lochman R, Rawles S, Chen R (2006) Effect of fish-meal replacement with 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

- |
- Sulzman, E. W., 2007. Stable isotope chemistry and measurement. In Stable isotopes in ecology and environmental science. Editor Michener R. y Lajtha K. 2nd edition, Malden, MA, pp 1-2.
- Tacon, A.G.J., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados - Manual de capacitación. GCP/RLA/ITA, Proyecto Aquila II, Documento de Campo No4, FAO Brasilia, Brasil.
- Torres, J., Farmer, A. y Bucher, E.H. 2006. Uso de isótopos estables para determinar conectividad migratoria en aves: alcances y limitaciones. *Hornero*. 21:73-84.
- Voigt, C.C., Rex, K., Michener, R.H. y Speakman, J.R. 2008. Nutrient routing in omnivorous animals tracked by stable carbon isotopes in tissue and exhaled breath. *Oecologia*. 157, 31-40
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. In fish nutrition. Edited by Halver J.E and Hardy R.W. Academic Press. 143-179

|

CAPITULO II

Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers. **PlosONE, 9(9):e107523..**

|
**Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution
of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable
isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers**

Daniel Badillo¹, Sharon Z. Herzka², Maria Teresa Viana^{3*}.

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

² Departamento de Oceanografía Biológica, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada –Tijuana No. 3918 Zona Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C. México;

³ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Km 107 Autopista Tj-Ens, C.P. 22860, Ensenada, B.C. México

*Corresponding author, viana@uabc.edu.mx phone +52 646 1744601

|
Abstract

This is second part from an experiment where the nitrogen retention of poultry by-product meal (PBM) compared to fishmeal (FM) was evaluated using traditional indices. Here a quantitative method using stable isotope ratios of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$ values) as natural tracers of nitrogen incorporation into fish biomass is assessed. Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were fed for 80 days on isotopically distinct diets in which 0, 33, 66 and 100% of FM as main protein source was replaced by PBM. The diets were isonitrogenous, isolipidic and similar in gross energy content. Fish in all treatments reached isotopic equilibrium by the end of the experiment. Two-source isotope mixing models that incorporated the isotopic composition of FM and PBM as well as that of formulated feeds, empirically derived trophic discrimination factors and the isotopic composition of fish that had reached isotopic equilibrium to the diets were used to obtain a quantitative estimate of the retention of each source of nitrogen. Fish fed the diets with 33 and 66% replacement of FM by PBM retained poultry by-product meal roughly in proportion to its level of inclusion in the diets, whereas no differences were detected in the protein efficiency ratio. Coupled with the similar biomass gain of fishes fed the different diets, our results support the inclusion of PBM as replacement for fishmeal in aquaculture feeds. A re-feeding experiment in which all fish were fed a diet of 100% FM for 28 days indicated isotopic turnover occurred very fast, providing further support for the potential of isotopic ratios as tracers of the retention of specific protein sources into fish tissues. Stable isotope analysis is a useful tool for studies that seek to obtain quantitative estimates of the retention of different protein sources.

Key words: N retention; stable isotopes; Poultry by-product meal

Introduction

Feed production for aquaculture is highly dependent on protein ingredient supplies, especially on fishmeal, which is considered the primary source of protein. According to Tacon and Metian [1], 75% of the world's fish stocks are currently considered as fully exploited or overexploited, including many small pelagic fish species used to produce fishmeal for feed formulation worldwide. Since fishmeal production is forecast to be unable to support the growth of the aquaculture sector, the search for alternative ingredients and protein sources and the optimization of dietary protein content is an important goal [2].

Dietary protein has numerous structural and metabolic functions that are essential for sustaining fish growth, structural body composition, muscle contraction, cell signalling and for ensuring the adequate function of the cell cycle [3]. Since particular metabolic functions require specific amino acids, it is crucial that fish ingest, digest and assimilate the necessary amino acids from protein sources. Protein quality is therefore generally evaluated according to its amino acid content. Its quality is often tested based on the assessment of digestive capacity using *in vitro* digestibility assays performed with a pH Stat on crude homogenates, using digestive enzymes extracted from the species of interest [4,5]. Although these *in vitro* experiments provide information on digestive capability of particular dietary components, they cannot be used to relate protein retention with growth.

The traditional methodologies employed in the study of protein utilization, including feed ingestion, growth, and *in vivo* apparent digestibility rely on *in vivo* experiments under controlled laboratory conditions. Complicated physiological laboratory experiments are necessary to measure energy expenditure and ammonia production to estimate the amount of

| protein used to support metabolic functions and as an energy source [6]. Results from *in vitro* experiments have been criticized for not being reproducible under commercial conditions [2]. Moreover, laboratory experiments are usually performed only for short periods of time and usually focus on earlier life stages than those used in commercial production [2].

Digestibility depends on the availability of specific digestive enzymes that break down the protein into small peptides. The availability of specific proteins (related to their degree of solubility) is crucial, as is the availability of certain amino acids for enzymatic cleavage in order to produce specific peptides for further digestion into free amino acids that are absorbable within few hours. Thus, diets with similar crude protein content that differ in protein sources or that contain proteins that have undergone various types of processing can result in different retention performance. Methodologies that can provide quantitative estimates of the differential retention of alternative protein sources used in diet formulations under purely experimental and commercial conditions are thus a valuable tool.

Poultry by-product meal (PBM) is an ideal protein source for the partial substitution of fishmeal. According to Tacon and Metian [1], PBM substitutes up to 30% of fishmeal in diets for salmon, sea trout and shrimp. Australia, Canada, Chile and Mexico are the main users of PBM. Partial replacement of fishmeal with PBM has been shown to yield a similar growth performance than that obtained solely with fishmeal in aquaculture diets [2,7]. For example, an 80% replacement of fishmeal by PBM in shrimp diets and a 30% replacement in rainbow trout diets yielded a similar growth performance than in those fed a diet with fishmeal as the only protein source [8,9].

Measurements of the relative abundance of the stable isotope of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, expressed as $\delta^{13}\text{C}$ values) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $\delta^{15}\text{N}$ values) have been used for dietary

| reconstruction in ecological studies because the isotopic composition of tissues reflects that of an animal's diet [10,11]. Stable isotope analysis has also been used to distinguish between protein sources and to estimate their relative contribution to an animal's biomass and to infer food quality [12,13,14] or determining the length of time an individual has spent in a new environment [15]. The contribution of different protein sources into diets to biomass production can be estimated using isotope-mixing models [16,17,18]. However, few studies have used stable isotopes to quantify the retention of alternative protein sources to fishmeal in fish nutrition.

Estimating the contribution of different protein sources included in diets to an animal's biomass using isotope-mixing models has three requirements. First, the protein sources must have distinct isotopic compositions [19]. Second, the isotopic composition of consumer tissues must be corrected for trophic discrimination. There is enrichment in the heavy isotope relative to a consumer's diet due amino acid deamination and transamination [20]. Ideally, trophic discrimination factors need to be estimated empirically on a tissue and species-specific basis under controlled conditions and incorporated into mixing models [21,22,23]. If protein quality varies among diets, then trophic discriminations factors need to be estimated for each formulation [24]. Third, an individual's tissues must be in isotopic equilibrium with the diet. Following a shift to a diet of different isotopic composition, the isotopic composition of soft tissues will gradually reflect that of the new diet [25,26]. Experimentally, this implies that animals must be fed a diet of constant isotopic composition until the tissue of interest fully reflects that of the diet. For teleost fishes, a six to eight-fold increase in biomass while fed a single diet of constant isotopic composition can be considered sufficient to ensure that isotopic equilibrium has been closely approximated [27].

In a previous experiment, we demonstrated that the partial replacement of fishmeal with PBM was achievable without a detrimental effect on growth [28]. However, the level of retention of each protein source as a function of the fishmeal replacement level was not quantified. Thus, the aim of this study was to quantitatively estimate the nitrogen retention of diets in which poultry by-product meal was used to replace fishmeal at four different levels. We used juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a model species and the stable isotopes of nitrogen as natural tracers of diet retention. We capitalized on differences in the nitrogen isotope ratios of diets with different formulations and applied a two source isotope-mixing model to estimate the percentage of incorporation of these two protein sources into muscle tissue following an 80 d feeding experiment. In addition, we evaluated whether fish fed a finishing diet of fishmeal reflected its isotopic composition following a 28 d re-feeding period.

Methods

Dietary treatments

Four isonitrogenous (43.5% crude protein) and isolipidic (12.5% crude fat) experimental diets with a gross energy ranging from 19.3 to 21.2 kJ g⁻¹ were formulated with graded levels of poultry by-product meal (PBM). Dietary treatments included 0, 33, 67 and 100% PBM (Table 1). Commercial gelatin (80% protein content) was used as binder (6% by weight in all diets) with corresponds to a contribution of 10% of the N. Fish oil (FO) and poultry oil (PO) were use to maintain a proportional ingredient substitution. The USA National Renderers Association supplied “pet food grade” PBM and PO. The fishmeal (60.0% crude protein made from tuna fish by-products) was acquired from Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV (Guadalajara, Mexico). Starch and gelatine were cooked separately

and added to the ingredients and blended to produce a homogeneous mixture with a 60% moisture content. The resulting mixture in the form of dough was then cold-pressed through a meat grinder into 0.2 mm diameter strips, from which pellets were cut and then dried at 60°C for 24 h. The feed was then stored at -30°C until it was fed to the fish.

Experimental design

Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used during feeding experiments were held at the Fish Nutrition Experimental Laboratory at the Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Experiments were performed according to the ethics guidelines of the university and in accordance to international guidelines, and this study was approved and supervised by the ethics committee of the Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO, UABC). The fertilized ova were obtained from Troutlodge Inc. (Orting, WA) and transported by plane to the research facility in Mexico.

Prior to the feeding experiments, all fish were fed the control (0PBM) diet formulated with fishmeal as the only protein source for one month. After the one-month period, 600 fish (1.4 ± 0.1 g) were randomly distributed in 12 experimental units consisting of 500L fiberglass tanks with 50 fish each. The four dietary treatments were evaluated in triplicate. Tanks were connected to a biofilter coupled to a recirculation system and set to 5% water renewal every day. The biofilter consisted of a 200L Pneumatic Drop Bead Filter, a plastic compensation tank (1,100L) and a pump (0.7 HP). Water was maintained at $14.0 \pm 1^\circ\text{C}$ by cooling the water in a reservoir after filtration through the biofilter. Water was monitored twice a week to ensure adequate levels of ammonia, nitrites, nitrates, pH and carbonate using a kit master for fresh water.

Fish were fed the experimental diets to apparent satiation 7 days a week at 0800, 1200, 1600 and 2000 hrs. The fish in each tank were weighted and counted every 20 days and the quantity of feed consumed was registered daily. Tanks were cleaned and siphoned daily and survival was continuously monitored. After 80 d, three fish from each tank were euthanized by hypothermia in accordance with the University's policy on health and safety and based on the approval from the ethics supervising committee. Muscle samples from the dorsal to the caudal fin region of each of three fish from each experimental unit (tank) were dissected, pooled and stored at -80°C pending isotopic analysis. Hence, each replicate consists of a pooled sample of three fish from a single tank.

A second experiment was conducted following completion of the 80 d feeding trial to evaluate how quickly fish incorporated fishmeal into their muscle (finalization diet). All groups were re-fed with the diet 0% PBM for 4 more weeks. On days 0, 14, 21 and 28, three fish from each tank were randomly selected and euthanized and muscle tissue was dissected (n=3 pooled samples per treatment) and prepared for stable isotope analysis as described above.

The following indices were calculated to evaluate growth performance:

$$\% \text{Weight gain} = [(\text{final weight} - \text{initial weight}) \times 100 / \text{initial weight}] \quad (1)$$

Thermal growth coefficient (TGC)

$$\text{TGC} = ((\text{final weight}^{1/3} - \text{initial weight}^{1/3}) / (\text{T} \times \text{D})) \times 100 \quad (2)$$

Protein efficiency ratio

$$\text{PER} = [\text{increase in body weight (g)} / \text{total protein intake (g)}] \quad (3)$$

|
Proximate analysis

The proximate composition of each diet was measured (in triplicate) and expressed on a dry matter basis according to standard procedures [29]. The moisture content of each sample was calculated from samples (2g) and dried to constant weight at 60°C. Total nitrogen content was determined with the micro-Kjeldahl method, and percent crude protein was then calculated as % N x 6.25. Total lipid concentration was determined by Soxhlet extraction with petroleum ether as a solvent and the crude fat was calculated gravimetrically. Ash content was determined by heating samples to 550°C for 6 h. The nitrogen-free extract was calculated by difference (% NFE = 100 - (% crude protein + % total lipid + % ash)).

Isotopic analysis

The $\delta^{15}\text{N}$ values of dry, defatted feed samples, fishmeal, poultry by product-meal and muscle tissue were determined. Samples were dried (60°C for 24 h) and homogenized with a mortar en pestle. About 1.5 ± 0.5 mg were weighed using an ultrabalance ($\pm 0.1 \mu\text{g}$), placed into tin capsules and sent to the Stable Isotope Facility of the University of Davies California (USA) for isotopic analysis. The laboratory's internal standards had a standard deviation of $\leq 0.3\%$ for ^{15}N . Isotope values are expressed in delta (δ) notation in parts per thousand (‰) relative to atmospheric N_2 as follows:

$$^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \times 1000 \quad (4)$$

where, R sample and R standard are the ratio of heavy to light isotopes ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) in the sample and standard, respectively. Trophic discrimination factor of muscle tissue (Δ) relative to each experimental diet at isotopic equilibrium was calculated as follows:

$$= (\text{tissue} - \text{diet}) \quad (5)$$

A two-source isotope-mixing model was used to estimate the fraction of each source that was differentially retained into muscle tissue at isotopic equilibrium [30]:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} (\text{‰}) = f_{\text{fishmeal}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{fishmeal}} + \epsilon) + f_{\text{PBM}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{PBM}} + \epsilon) \quad (6)$$

$$1 = f_{\text{fishmeal}} + f_{\text{PBM}} \quad (7)$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{fishmeal}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{PBM}}$ are the isotopic composition of fish muscle, fishmeal and poultry by-product meal, respectively, and f_{fishmeal} and f_{PBM} are the fraction of nitrogen retained from the fishmeal and poultry by product meal. $\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ values were corrected for trophic discrimination using the mean value calculated for muscle tissue equilibrated onto the 33 and 67PBM diets at the end of the 80 d feeding period. To evaluate the potential impact of natural variation in trophic discrimination factors on the results of the mixing model, we performed a sensitivity analysis. The mixing models were also run using the trophic discrimination factors calculated for fish at isotopic equilibrium with the 0PBM and 100 PBM diets and. For the 0% and 100% PBM, the isotopic composition of the trout muscle at isotopic equilibrium reflects the diet that includes only fishmeal or poultry by-product meal, respectively, and the use of mixing models is unnecessary.

Statistical analysis

Differences among treatments in biological indices and trophic discrimination values calculated for the muscle tissue from each experimental unit were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA; n=3). When statistical differences were detected a Tukey post-hoc test was used to identify statistical differences between treatments. SigmaStat for Windows 3.5 was used to perform the statistical analysis.

Results

After being fed for 80 d on the four experimental diets, no significant differences were detected ($P < 0.05$) in TGC based on the results of the one-way ANOVA; values were around 1.5 (Table 2). The PER was also similar among treatments with values around 2.8 g body weight g protein intake⁻¹. However, fish fed the 67% PBM diet had a significantly higher final weight than the rest of the treatments, whereas the 100% PBM had a significantly lower final weight than the other treatments. Nevertheless, the total percent weight gain relative to initial weight ranged from 1480 to 1587%, indicating that isotopic equilibrium was reached in all treatments.

After 80 days, the muscle tissue of the fish had isotopic values similar to that of each diet. The trophic discrimination factors differed significantly between treatments. For nitrogen, $\Delta\delta^{15}\text{N}$ ranged between 2.0‰ for fish fed the 0%PBM and -0.1‰ for those fed the 100%PBM, while $\Delta\delta^{15}\text{N}$ was similar for the 33PBM and 67PB treatments, whereas the fish from the 67% PBM treatment assimilated 78% of their nitrogen from PBM (Table 3). Using meal-based endpoints yielded a 5% larger and a 3% smaller retention of PBM for fish fed the 33% and 67%PBM diets, respectively.

The results of the sensitivity analysis indicated that in most cases, variations ca. ± 1 ‰ in $\Delta\delta^{15}\text{N}$ led to differences in the percent of nitrogen retention that ranged 8.9 and 13.5% (Table 3). The one exception was for the 33PBM, using the meal-based endpoints and a lower estimate of TD. In that case, the contribution of PBM was 28% higher.

After the fish from the four experimental diets were switched to the diet containing only fishmeal for 28 days, the isotopic composition of muscle tissue changed quickly toward the value of the 0PBM diet (Figure 1). Fish from the 33PBM, and 67PBM had isotopic values of 15.1 and 13.6 ‰ after 28 days, whereas the treatment 100PBM reached a value of 12.0 ‰ after 21 days.

Discussion

Stable isotopes have proven very useful as natural tracers for calculating the relative contribution of multiple food or carbon sources in an animal's diet to its biomass [10]. In spite of increasing number of nutrition experiments in which stable isotopes are used, only few of them are focused on the fishmeal substitution as protein source. The potential applications of this technique to nutritional studies are ample and can provide quantitative estimates of the retention of different protein sources into a consumer's tissues that are difficult to obtain with other techniques, especially in the case of carnivorous fish that require large amounts of protein in formulated diets.

In nutritional experiments it is widely recommended that a 400% increase in weight should be achieved to assess the effect of an ingredient or additive on an organism's performance [2]. In the case of the isotopic composition of an organism's tissues, the time needed to achieve an isotopic equilibrium, a pre-requisite to the application of mixing models, depends on the rate of isotopic turnover. For muscle tissue of teleosts, the rate of isotopic turnover is related to growth rate, particularly in young and rapidly growing organisms [26,34,35,17]. At the beginning of the experiment, juvenile rainbow trout weighted 1.4 ± 0.1 g

wet weight. After 80 d the fish had increased in weight about 15-fold, indicating that full isotopic equilibrium with the diets was reached [27]. This ensured that the application of the isotope-mixing model could be used to calculate the fraction of PBM incorporated into the trout's muscle tissue.

The nitrogen isotope discrimination factors calculated for fish fed the four formulated diets ranged between 2 and -0.1‰, despite the fact that the diets were isonitrogenous, isolipidic and similar in gross energy content. The highest trophic discrimination factor was found for fish in isotopic equilibrium with the 100% fishmeal diet, while there was little or no discrimination observed for fish fed the 100% PBM diet. Pares *et al.* [28] analysed the effect of fatty acids and amino acid composition of the diets used in this study, and reported that their amino acid profiles were somewhat similar. Hence, the formulated diets yielded different levels of isotopic discrimination despite having similar protein content and amino acid profiles content.

All diets contained commercial gelatin as binder, a protein that was constant in all treatments with a contribution of 10% of the nitrogen contained in diets (Table 1). Gelatin was used as binder due to their capacity to bind fish diets under laboratory conditions without the addition of high quantities of carbohydrates, which are not easily tolerated by fish. Gelatin is easily assimilated by most organisms [28,36]. Its nitrogen isotopic composition was 7.8‰, compared to 14.1‰ and 3.4‰ for FM and PBM, respectively (Table 1), which explains the difference in $\delta^{15}\text{N}$ values of the meals vs. whole diets. Since PBM and FM contributed about 90% of the nitrogen in the formulated diets, differences in the results of the mixing model are assumed to be attributed mostly to the differential retention of FM and PBM in each of the two

diets (i.e., the retention of gelatin is assumed to be constant). Unfortunately, we were unable to successfully estimate the fractional contribution of gelatin by incorporating $\delta^{13}\text{C}$ values of the three protein sources into mixing models due to limited differences in their highly variable exploratory results with different carbon isotopic composition.

Therefore, it is suggested that PBM in trout is not only as highly digestible than FM or at least as digestible than the kind used, but is highly retained. The protein efficiency ratio (PER) calculated here fail to show differences, a calculation reported as growth increase from protein ingested, being unable to quantitatively estimate how much and from which source was retained. Even if PER measurement is considered as a sensitive indicator, here it is demonstrated that the use stable isotopes is a more sensible and accurate index for protein substitution evaluations.

Previous studies have related protein quality to the level of trophic discrimination in a consumer's tissues. Robbins *et al.* [24] found that the plasma of rats fed high protein diets (fishmeal) showed lower trophic discrimination values compared with those fed various plant-based diets (3.3 ‰ vs 5.0 ‰, respectively). Gaye-Seissenger *et al.* [13] fed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets with a range of protein levels and did not find significant differences in nitrogen discrimination values between treatments. However, they did find that trophic discrimination values calculated for individual whole fish were negatively and linearly correlated with protein accretion. They concluded that individual protein balance could influence the level of nitrogen isotope discrimination between a consumer and its diet. More generally, Martínez del Río and Wolf [19] applied mass balance models and predicted that nitrogen isotope discrimination should be lower in animals fed diets with higher protein quality

and with higher protein accretion (termed nitrogen deposition in their study). Based on a subsequent review of the literature, Martínez del Río *et al.* [17] concluded that the evidence accrued to date regarding the relationship between nitrogen isotope discrimination and protein content had yielded varying results, and highlighted the need for laboratory experiments. In this study, the diets were formulated to maintain a constant protein content of 43-44%, and the variation in nitrogen isotope discrimination cannot be attributed to differences in protein content.

Isotopic routing, or the channelling of specific components (in this case amino acids) assimilated from a diet into specific tissues can also influence discrimination factors, but this process is not well understood [19,21]. The underlying mechanisms leading to differences in isotope discrimination values are therefore unclear, and identifying the causes underlying the variation in nitrogen isotope discrimination is beyond the scope of this study. Our purpose was to calculate trophic discrimination values so as to apply the isotope-mixing models and estimate the incorporation of FM vs. PBM in diets with different formulations in order to eliminate or reduce the inclusion of FM in aquafeeds. Using empirically derived trophic discrimination factors ensures the estimates of the fractional contribution of different protein sources to trout muscle tissue are robust.

According to the results of the isotope mixing model, the 33% and 67% PBM diets showed a slightly higher level of retention of nitrogen from the poultry by product meal than what was included in each formulation. The 33% and 67% PBM dietary treatments showed a 35.9 and 78.2% retention. However, the results of the sensitivity analysis indicates that variations in the value of $\Delta\delta^{15}\text{N}$ yields a range of nitrogen retention estimates that overlaps with

the level of PBM-based protein included in the diets. Although the mixing model results clearly indicate that the contribution of PBM N to fish biomass was similar to that of its level of inclusion, the uncertainty associated with $\Delta\delta^{15}\text{N}$ makes it impossible to infer preferential retention of either fishmeal or PBM.

The apparent digestibility coefficient (ADC) of crude protein in PBM ranges between 69 and 96%, which is comparable to the ADCs of crude protein reported for various types of fishmeal [37]. A possible explanation for these results could be that differences in the overall digestibility (of protein and lipids) between protein sources or a limitation in some other essential nutrient led to a protein sparing effect.

Earlier reports have attempted to use PBM to replace fishmeal in several species, including *Micropterus salmoides* [38], *Morone chrysops* X *M. saxatilis* [39,40], *Rachycentron canadum* [41] and *Trachinotus carolinus* L. [7]. Those studies reported good results in terms of growth rate. However, most did not examine the effect of the total replacement of FM by PBM. Rainbow trout fed the 100PBM treatment seems to result in similar PER.

During the 28d re-feeding experiment, the isotopic composition of the juvenile rainbow trout muscle changed quickly, indicating a very fast rate of isotopic turnover. Rapid isotopic turnover is characteristic of fishes with fast growth rate [42], which was the case of the juvenile rainbow trout used in this study. The $\delta^{15}\text{N}$ values of the fish fed the 67PBM and 100 PBM were close to isotopic equilibrium by day 15 of the re-feeding period, as indicated by the consistency in the isotopic ratios of the muscle tissue on day 15 and thereafter. In contrast, the fish from the 33PBM treatment became increasingly enriched in ^{15}N until the end of the experiment, suggesting that isotopic equilibrium may not have been reached in that treatment.

|
The comparatively high level of enrichment (ca. 3 ‰) relative to the diet on day 28 after the re-feeding with the 100% FM diet may be due to isotopic routing of specific amino acids, although our data do not allow for that sort of analysis.

Conclusions

The use of stable isotopes analysis is a helpful technique to obtain quantitative estimates of the retention of different protein sources that can be distinguished based on their isotopic composition, such as FM and PBM. In the present work we report the potential total substitution of FM by PBM in trout diets, and shows that a high protein retention can be reached without an apparent effect on growth.

|
Acknowledgments

We thank Germán Dávalos for donating the poultry by-product meal from the National Renderers Association, and Francisco Negrete for donating the mineral and vitamin mixture from DSM México. Daniel Badillo thanks CONACYT for their fellowships for graduate studies. We want to Thanks Brian Stock for guiding us to run the MixSiar model. Also we thank the pertinent and assertive comments of the reviewers. Also we appreciate the help of Fernando Barreto-Curiel for his valuable time help in running the mixing models in the computer.

References

1. 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.
2. National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, DC, p 376.
3. Halver JE (2002) The Vitamins. In: Halver JE, Hardy RW (ed), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp. 61–141.
4. Ezquerro 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.
5. 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.
6. Gnaiger E, Forstner H (1983) *Polarographic Oxygen Sensors*. Aquatic and Physiological Applications. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 370.
7. 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.
8. Cruz-Suárez E, Nieto-López M, Guajardo-Barbosa C, Tapia-Salazar M, Scholz, U. (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.
9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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
 15. Bradley CJ, Madigan DJ, Block BA, Popp BN (2014) Amino acid isotope incorporation and enrichment factors in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *PLoS One* 9 (1): e85818.

16. 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.
17. Martínez del Rio C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84: 91-111.
18. 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
19. Martínez del Rio 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.
20. Macko SA, Estep ML (2002) Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta*, 50(10), 2143–2146.
21. Gannes LZ, O'Brien DM, Martinez del Rio C (1997) Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78: 1271-1276
22. Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703–718
23. McCutchan Jr JH, Lewis Jr WM, Kendall C, McGrath CC (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *OIKOS* 102: 378-390.
24. Robbins CT, Felicetti LA, Florin ST (2010) The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ratio on discrimination and assimilate diet estimation. *Oecologia* 162: 257-579.

25. Fry B, Arnold C (1982) Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia* 54: 200–204.
26. 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.
27. Herzka SZ (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ration analysis. *Estuar Coast Shelf S* 64: 58-69
28. Parés-Sierra G, Durazo E, Ponce MA, Badillo D, Correa-Reyes G. (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
29. AOAC Association of Official Analytical Chemists (1995). *Analysis of Official Analytical Chemists*, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
30. Phillips DL, Koch PL (2002). Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130: 114-125.
31. Schleichtriem 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
32. 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.

33. 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.
34. Martin-Perez M, Fernandez-Borras J, Ibarz A, Felip O, Fontanillas R (2013) Naturally occurring stable isotopes reflect changes in protein turnover and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles under different dietary protein levels. *J Agric Food Chem* 2013, 61: 8924-8933.
35. 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.
36. Morillo-Velarde PS, Cerezo VJ, Hernandez MD, Aguado-Gimenez F, Garcia GB (2012) Growth and digestibility of formulated diets base on dry and freeze-dried ingredients in common octopus (*Octopus vulgaris*). *Aquaculture* 368-369: 139-144
37. 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
38. 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
39. Rawles SD, Riche M, Gaylord TG, Webb J, Freeman DW. (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.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Jobling M (2003). The Thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquacult Nutr* 34: 581-584.

Table 1. Ingredients (g per Kg), proximate composition on a dry weight basis (%) and $\delta^{15}\text{N}$ values of four experimental diets containing different levels of substitution of fishmeal with poultry by-products meal (PBM; 0, 33, 67 and 100% replacement). The four diets were fed to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for 80 d. Fractional N contribution is expressed inside parentheses ().

Ingredients	TREATMENTS			
	0PBM	33PBM	67PBM	100PBM
Poultry by-product meal (PBM) ¹	0.0 (0.0)	235 (0.3)	440 (0.6)	590 (0.9)
Fishmeal ²	660 (0.9)	400 (0.5)	175 (0.2)	0 (0.0)
Corn meal	55 (0.01)	55 (0.01)	55 (0.01)	55 (0.01)
Poultry oil ³	0.0	5.0	17	35
Fish oil ⁴	72	52	28	0
Corn starch	91	131	166	201
Gelatin	60 (0.1)	60 (0.1)	60 (0.1)	60 (0.1)
Rovimix for carnivores fish ⁵	30	30	30	30
Stay c ⁵	4	4	4	4
Sodium Benzoate	2.3	2.3	2.3	2.3
Choline chloride	0.9	0.9	0.9	0.9
Tocopherol	0.1	0.1	0.1	0.1
Cellulose	25	25	25	25
TOTAL	1000	1000	1000	1000
Proximate composition (% of dry matter)				
Crude protein (%)	43.1	43.4	43.7	43.6
Crude fat (%)	12.5	12.5	12.5	12.3
Ash (%)	19.8	15.1	12.1	8.8
NFE ⁶	24.5	29.0	31.7	35.3
Diet isotopic composition				
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	12.7	9.0	6.1	4.2

¹“Pet food grade” (69.6% crude protein, 12% crude lipid) supplied by the National Renderers Association, USA.

²Tuna fishmeal (60.0% crude protein, 6.9% crude lipid) from Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México.

³Poultry oil from Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México.

⁴Sardine oil

⁵Rovimix[®]; Stay-C donated by DSM, Guadalajara, México.

⁶Nitrogen free extract: calculated by difference: NFE = 100-CP-CF-Ash.

$\delta^{15}\text{N}$ values of main nitrogen-containing ingredients: Fishmeal (14.1‰), poultry by-product meal (3.4‰) and gelatin (7.8‰)

Table 2. Biological indices, nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) of muscle tissue and trophic discrimination values for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed four experimental diets formulated to contain similar protein and lipid levels. Fishmeal and fish oil were incrementally substituted for poultry by-product meal (PBM; 0, 33, 67 and 100%) and poultry oil. Measurements were made after 80 d. Values within the same row with different superscripts letters were significantly different ($P < 0.05$).

	Experimental Treatments			
	0PBM	33PBM	67PBM	100PBM
Biological indices				
Final weight (g)	21.8±1.5 ^{ab}	21.9±1.1 ^{ab}	23.5±1.6 ^a	20.9±0.5 ^b
TGC ¹	1.48±0.05	1.48±0.01	1.54±0.05	1.47±0.02
Weight gain (% of initial)				
PER ²	1480±39	1495±32	1587±32	1495±103
	2.85±0.1	2.72±0.3	2.78±0.2	2.77±0.1
Isotope ratio of muscle at equilibrium with the diet				
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	14.7±0.9 ^a	10.1±0.1 ^b	7.1±0.1 ^c	4.1±0.0 ^d
Isotopic trophic discrimination				
$\Delta\delta^{15}\text{N}$ (‰)	2.0±0.1 ^a	1.1±0.1 ^b	1.0±0.1 ^b	-0.1±0.0 ^d

¹ TGC = $\left(\frac{\text{final weight}^{1/3} - \text{initial weight}^{1/3}}{\text{K D}} \right) \times 100$, [43]

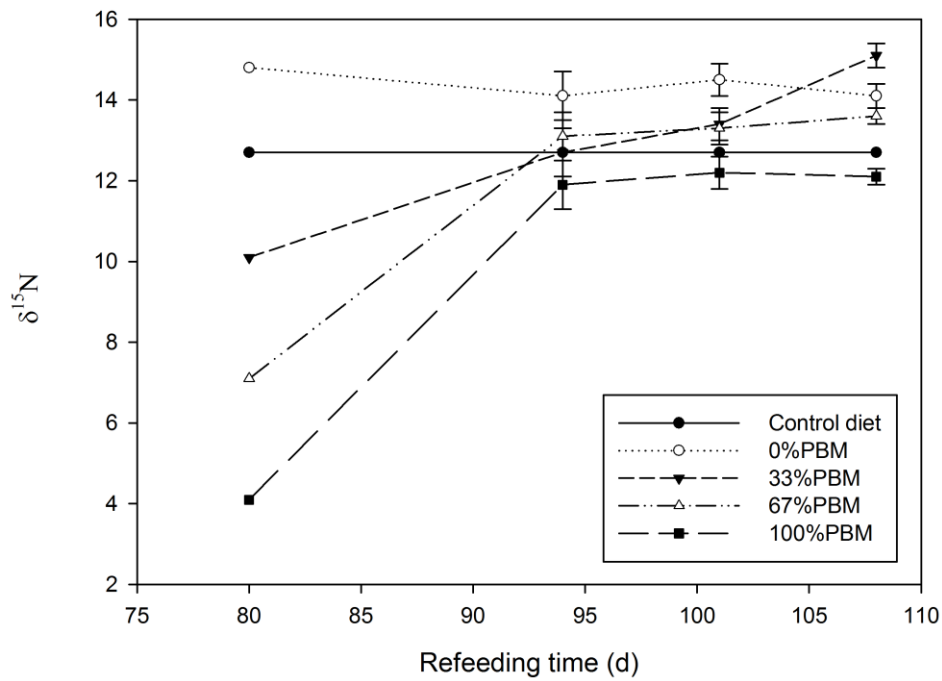
² PER = [increase in body weight (g) / total protein intake (g)],

Table 3. Percentage of nitrogen retention by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed formulated diets with two levels (33 and 67%) replacement of fishmeal (FM) with poultry by-product meal (PBM). Nitrogen retention was estimated using a simple two-source mixing model considering (a) the isotopic composition of the diets formulated with only fishmeal or poultry by-product meal as endpoints and (b) the isotopic composition of the fishmeal and poultry by-product meal itself. The mixing model was applied after correcting for trophic discrimination (TD) using the average value calculated for fish equilibrated onto the 33 and 67PBM diets (1.1 ‰). Results of a sensitivity analysis of mixing model output to variations in TD are reported in parentheses.

	Treatments	
	33PBM TD=1.1‰ (-0.1‰; 2.0‰)	67PBM TD=1.1‰; (-0.1‰; 2.0‰)
(a) Diet-based endpoints		
Fishmeal	64.1 (77.6; 52.9)	21.8 (35.3; 10.6)
PBM	35.9 (22.4; 47.1)	78.2 (64.7; 89.4)
b) Meal-based endpoints considering two ingredients		
Fishmeal	58.4 (30.8; 49.5)	24.8 (35.3; 15.9)
PBM	41.6 (69.2; 50.5)	75.5 (64.5; 84.1)

Figure Legends

Fig. 1 Isotopic values ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle tissue that were isotopically equilibrated into four experimental diets with different levels of substitution of fish meal with poultry by-product meal (time 0) and were then switched to the control diet and fed for a 28 additional days. PBM: Poultry by product meal. Values shown are means (n=3) \pm SD.



|

CAPITULO III

The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. **Aquaculture Research, 2014, 1-12**

**The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets
for *Totoaba macdonaldi* juveniles**

Daniel Badillo Zapata¹, Juan Pablo Lazo², Sharon Z. Herzka³ & María Teresa Viana⁴

¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), México

² Departamento de Acuicultura y Biotecnología, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Carretera Ensenada (CICESE) –Tijuana No. 3918 Zona Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C México.

³ Departamento de Oceanografía Biológica, CICESE

⁴ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Km 107 Autopista Tj-Ens, C.P. 22860, Ensenada, B.C México

Correspondence: MT Viana, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Km 107

Autopista Tj-Ens, C.P. 22860, Ensenada, B.C México; E-mail: viana@uabc.edu.mx, Phone

+52 646 1744601

Running Title: Protein retention in *Totoaba macdonaldi*

Abstract

Four diets were formulated to evaluate the partial to total substitution of fishmeal with poultry by-product meal (PBM) (0, 33, 67 and 100PBM) in diets for totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). Amino acid profiles from diets and fatty acid content in diets and muscle tissue were used to assess the fish performance using PBM as fishmeal replacement. Stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) were measured in muscle and liver tissue to quantify the retention of each protein source. At the end of the experimental period, the fish fed the 67PBM diet had a significantly higher growth gain increase compared to the other treatments (almost 2000% over an 86 d period; TGC of 1.06). The total replacement of fishmeal with PBM led to low growth gain increase (ca. 220% over 72 d; TGC of 0.52) and increased mortality. Both fish performance and tissues fatty acid composition suggest that the 100PBM diet was deficient in essential fatty acids. An isotope-mixing model applied to isotope ratios of muscle and liver tissues of fish fed the 67PBM tissues indicated that PBM was retained into muscle and liver tissue in a higher proportion than its level of inclusion in the diet. We conclude that PBM is a good source of nutrients for totoaba juveniles when used in up to 67% fishmeal replacement level in diets containing 52% protein leading to adequate growth rate and survival.

Key words: protein retention; totoaba; poultry by-product meal; stable isotopes; nutrition

Introduction

Totoaba macdonaldi, an endemic fish from the Gulf of California, is the largest member of the Scianidae family. This species can be reproduced successfully in captivity and has shown adequate growth rates on a pilot scale when fed formulated diets containing high protein and low lipid levels (Rueda-López et al. 2011). However, in order to make the culture of this species sustainable, it is imperative to replace fish meal with alternative protein sources in commercial diets as well as to reduce the overall protein intake by formulating to the exact amount of aminoacids (“ideal protein”; Boisen et al. 2000).

Recently in our lab we were able to evaluate the protein retention in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) stable isotopes, showing that poultry by-product meal (PBM) was better retained than fishmeal (Badillo et al. 2014). Technological developments in the production process have significantly improved the quality standards of PBM and other rendered meals (Sealey et al. 2011). PBM now contains highly digestible protein with amino acid profiles somewhat similar to those of fishmeal. Additionally, the amount of saturated fats present in rendered meals has been reduced, which makes them excellent candidates for formulated diets for aquatic organisms.

Aqua-feeds are typically formulated to contain high protein content and are likely to exceed protein requirements (Wilson 2002; NRC 2011), which can lead to an inefficient use of costly protein sources. Part of the problem is that it is difficult to estimate exactly how much of the protein in a diet is being used as an energy source or retained into growth (NRC 2011). By using stable isotopes analysis (SIA) of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers it is possible to obtain quantitative estimates of the incorporation of the nitrogen from different

protein sources into tissues (Boecklen et al. 2011, Gamboa-Delgado et al. 2013). Nitrogen stable isotope analysis has been used successfully for many years in ecological studies (Fry 2006) and more recently in fish nutrition studies (Gaye-Siessegger et al. 2007; Martínez del Río et al. 2009; Le Vay & Gamboa-Delgado 2011). During the last 15 years significant improvements have been achieved with respect to isotope techniques, applications, and prediction models that have supported research into physiological processes in areas such as nutrition and metabolism (Martínez del Río et al. 2009). Typically, muscle tissue is used to measure nitrogen (N) incorporation into the body because it comprises the bulk of the protein pool. However, the isotopic composition of liver tissue responds faster than that of muscle to changes in the isotopic composition of a diet due to its inherently higher turnover rate, and it therefore provides information on retained foods over short time periods (Logan et al. 2005; Malpica-Cruz et al. 2012). Simultaneous analysis of both tissues can provide complementary information (Varela et al. 2012).

Information on marine fish nutrient requirements is necessary for precise feed formulation. For example, a high protein requirement has been reported for a variety of marine fish species (Hidalgo & Aliot 1988; Robaina et al. 1995; Hansen et al. 2007) and attributed to their ability to efficiently use amino acids as an energy source, which is reflected in a low protein efficiency ratio when compared to trout or salmon (NRC 2011). It is often not clear if the protein requirement is indeed high, or if a deficit in one or a few amino acids leads to limited protein synthesis, consequently causing an artificially high estimate of protein requirement. Therefore it is of utmost importance to measure the N retention of alternative protein sources directly in order to accurately estimate the protein

|

value of these ingredients in marine fish diets. Moreover, when fishmeal is replaced with other sources of protein, essential amino acids (i.e., lysine), fatty acids (i.e., n-3 PUFAs) and other nutrients (i.e., taurine, cholesterol) can be limiting, which inhibits adequate growth. Amino acids, fatty acids and other nutrients should therefore be measured in feeds and tissues to properly evaluate whether some nutrients are limiting and if so, to consider their effect when evaluating fish performance.

The aim of this study was to quantitatively estimate the retention of PBM used to replace fishmeal at four levels in juvenile totoaba (*Totoaba macdonaldi*) diets using nitrogen stable isotopes as natural tracers. Amino acid profiles in diets and fatty acid content in diets and muscle tissue were also measured to assess the fish performance using PBM as fishmeal replacement in the diets.

Materials and methods

Dietary treatments

Four isonitrogenous (51.5% crude protein; CP) and isolipidic (8% crude fat; CF) experimental diets were formulated according to Rueda-López et al. (2011), who reported the highest growth rates for totoaba fed a diet containing 52% protein. The formulations contained graded levels of poultry by-product meal (PBM) as substitute for fishmeal: dietary treatments included 0, 33, 67 and 100% PBM substitution. Fish oil was employed to compensate the low fat content in FM compared to PBM in order to become isolipidic (Table 1). The USA National Renderers Association kindly provided “pet food grade” (65.5% CP; 12.0% CF) PBM. The fishmeal from Pacific sardines (68% CP; 8.0% CF) was

locally acquired. Starch and gelatin (binders) were cooked separately, mixed with the other ingredients and blended to produce a homogeneous mixture with 60% moisture content. The resulting mixture in the form of dough was then cold-pressed through a meat grinder into 2.0 mm diameter strips, from which pellets were cut and dried at 60°C for 24 h. The experimental feeds were stored at -30 °C until used to feed the fish.

The proximate composition of the experimental diets indicated nutrient levels of 51.5 to 51.6% CP and 8% CF. Dietary ash content decreased from 13.9 to 9.3% as function of decreasing fishmeal level in the diets. The amino acid profiles of the diets indicated lower levels of lysine as a function of increasing PBM content, ranging from 4.2 to 3.4% of the dry matter (DM) diet. The nitrogen free extract (NFE) represents the carbohydrates, sugar starches and the insoluble carbohydrates and it was calculated by difference after subtracting CP, CF and ash (Table 1). The highest level of methionine (1.2% DM) was found in the 0 and 33PBM diet and the lowest level in the 67PBM (0.9% DM). The $\delta^{15}\text{N}$ values of fishmeal and PBM differed by 12.5‰. The heaviest isotope ratios were found in the 0PBM diet (15.3‰) and $\delta^{15}\text{N}$ values were progressively lighter as a function of the percentage of inclusion of PBM (4.7‰ for the 100PBM diet). The isotopic composition of the fishmeal and poultry by-product meal were 16.0 and 3.5‰, respectively, which is very similar to that of the 0PBM and 100PBM diets.

[Table 1 near here]

The fatty acid profile (expressed as percentage of total fatty acids) of the diets showed that oleic (18:1n-9) and linoleic (18:2n-6) acids gradually increased with PBM inclusion. Also arachidonic acid (20:4n-6) increased from 1.6 to 2.4%. In contrast, **eicosapentaenoic (20:3n-3; EPA) and docosahexaenoic acids (22:6n-3; DHA)** gradually decreased from 11.7 to 0.5% and 12.4 to 0.6% for EPA and DHA, respectively, from the 0 to 100PBM diets. Similarly, n-3/n-6 ratios decreased from 5.6 to 0.1 as PBM inclusion increased (Table 2).

[Table 2 near here]

Experimental design

A total of 300 juvenile totoaba (*Totoaba macdonaldi* of 2.7 ± 0.1 g; mean \pm SD) produced at Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) Fish Nutrition Laboratory in Ensenada were used for the feeding trial. Eggs were obtained from captive broodstock held at the Marine Sciences facilities of the Universidad Autónoma de Baja California. Fish were randomly distributed in 12 experimental units consisting of 350L fiberglass tanks seeded with 25 fish each. The four dietary treatments were evaluated in triplicate. On day 15, after the start of the experiment, there was a high mortality in the three tanks corresponding to the 100PBM treatment. To maintain the experimental design, all fish were replaced with sibling juveniles from the same batch that were held under similar conditions and that had been fed the 0PBM (control diet). Those fish were 6.4 ± 0.2 g on day 15 when the experiment was restarted. For comparison, fish in the 0PBM treatment were

8.1±1.0 g on day 21, indicating the replacement fish were similar in size. Tanks were connected to a biofilter (PolyGeysers®; Pneumatic Drop Bead Filter model PG7 International Filter Solutions, TX, USA) coupled to a recirculation system with a reservoir tank set to 5% water renewal every day. Temperature was maintained at 26.0±1°C by heating the water in a reservoir tank after filtration through the biofilter. Water was sampled twice a week to measure the concentration of ammonia, nitrites, nitrates, pH and carbonate using a commercial kit for marine water (Aquarium Pharmaceutical, Inc. Canada) and dissolved oxygen was measured daily (Ysi 55 oxymeter; Yellow Springs OH, USA).

Fish were fed to apparent satiation daily at 0800, 1200 and 1600 hrs. All fish were weighted and counted every 21 days. Tanks were cleaned and siphoned daily and survival was continuously monitored. Prior to the initiation of the feeding experiments, the fish were fed for one month on the control diet (0PBM), which was formulated with fishmeal as the main protein source. After 86 d for the 0, 33 and 67PBM substitution and 72 d for treatment 100PBM, fish were starved for 15 hours prior to the sampling and euthanized. Liver and muscle samples from the dorsal region close to the caudal fin were dissected from three fish from each experimental unit (tank) and stored at -80 °C pending chemical and isotopic analysis.

The following indices were calculated to evaluate growth performance:

$$\% \text{ Weight gain} = [(\text{final weight} - \text{initial weight}) / \text{initial weight}] * 100$$

Thermal growth coefficient (TGC),

$$\text{TGC} = [(\text{final weight}^{1/3} - \text{initial weight}^{1/3}) / (T_{\text{°C}} \times D_{\text{days}})] * 1000$$

Chemical analysis

Proximate composition of diets and muscle tissue were measured (in triplicate, 4-5 g) for each treatment and experimental unit and expressed on a dry matter basis according to standard procedures (AOAC 1995). Muscle tissues from three fish per tank were pooled and blended for analysis. The moisture content of each sample was calculated from samples (2 g) dried to constant weight at 60 °C. Total nitrogen content was determined by the micro-Kjeldahl method, and percent crude protein was then calculated as % N x 6.25. Total lipid concentration was estimated using the Soxhlet extraction method with petroleum ether as a solvent and the crude fat was calculated gravimetrically. Ash content was estimated by heating samples to 550 °C for 6 h. The nitrogen-free extract was calculated by difference of dry matter and includes soluble and insoluble carbohydrates (NFE (%) = 100 - (% crude protein + % total lipid + % ash)).

Amino acid composition of the diets

Individual defatted diet samples were evaluated for AA content using a Waters HPLC equipped with a fluorescence detector (Waters 474 series, Milford, MA, USA). Samples of 40 mg were hydrolysed with 200 µL of 6N HCl and 0.06% phenol in a closed vial and heated to 110 °C for 24 h. Amino acid profiles were determined following Waters AccQ-Tag™. Briefly, hydrolysed samples were dried in a thermal monoblock at 60 °C and 1 mL distilled water was added to vials and filtered (0.45 µm). Samples were then derivatized using the AccQ-Tag™ procedure. Samples were injected into a chromatograph equipped with a reverse-phase column (3.9 x 150 mm) 4-µm AccQ-Tag™ C-18 (Waters) using the

|

water–acetonitrile gradient recommended by the Waters AccQ-Tag™ system. The fluorescence detector was programmed to an excitation wavelength of 250 nm and an emission wavelength of 395 nm. Analyses were run at a constant temperature (37.5 °C). HPLC signal calibration and standard curves were obtained with amino acid standard solutions containing 12.5 to 150 pmol of each amino acid, where taurine was added at similar proportion.

Fatty acid composition

Samples from the diets and muscle tissue from fish from each experimental unit (n=3) were homogenized and lipids extracted using dichloromethane-methanol (2:1, v/v) using a modification of the extraction method of Folch et al. (1957). One percent BHT was used as an antioxidant. After three extractions, the solvent supernatants were pooled and water was added to separate the phases. The lower phase, containing the lipids (in CH₂Cl₂), was washed with water and then evaporated under N₂ in a pre-weighted vial. The amount of total lipids was determined gravimetrically. Total lipids were saponified with methanolic KOH (0.3N in 90% methanol), dried under N₂ and weighted using pre-weighted vials. The lipids were then esterified to form methylesters of fatty acids (FAME) according to Christie (1982) using 14% boron trifluoride in methanol. The FAME were preserved with 0.01% BHT to avoid oxidation. FAMES were analyzed in an AGILENT GC 6850 gas chromatograph equipped with an injector split/splitless, a flame ionization detector (FID) and a capillary column (AGILENT 122-2362E DB-23; 60 m x 0.25 mm, film thickness 25 μm) using nitrogen as the carrier gas. Fatty acids were identified by comparing retention

times to those of standards (37 Component FAME Mix, Supelco/Sigma-Aldrich; GLC 87, GLC 96, Nu-Chek Prep.; RM-2, RM-6 and GLC 90, Supelco/Sigma-Aldrich) and well-characterized profiles of samples of marine oils (PUFA1, Supelco/Sigma-Aldrich). Fatty acid profiles are reported as percentage of FAMES identified. The software HP ChemStation Data analysis Application model G17001EA E.02.00.493 for Windows was used (Scientific Instruments Service, Inc. Ringoes NJ, USA)

Isotopic analysis

Subsamples of the lipid-extracted (Soxhlet extraction as explained above) raw materials included in the diets, whole diets and muscle and liver tissue were analyzed for $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Individual samples were dried at 60 °C for 24 h and homogenized with an agate mortar and pestle. Subsamples of 1.5 ± 0.5 mg were weighted using an ultra microbalance XP2U (Mettler Toledo® ± 0.1 µg), placed into tin capsules and sent to the Stable Isotope Facility of the University of California, Davis (USA), for isotopic analysis. According their specifications an elemental analyzer interfaced to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS). Samples were combusted at 1000 °C and oxides removed and the helium carrier flew the samples into an IRMS after N_2 and CO_2 were separated using a molecular sieve. The laboratory's internal standards had a standard deviation of 0.3‰. Isotope values are expressed in delta (δ) notation in parts per thousand (‰) relative to atmospheric N_2 as follows:

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

where R_{sample} and R_{standard} are the ratio of heavy to light isotopes ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) in the sample and standard, respectively.

Isotopic trophic discrimination of muscle tissue (Δ) relative to each experimental diet at isotopic equilibrium was calculated for muscle and liver tissue as follows:

$$\Delta = (\delta_{\text{tissue}} - \delta_{\text{diet}})$$

The δ_{tissue} and δ_{diet} were average values for a given tissue or feed. For the 33 and 67PBM diets, a two-source isotope-mixing model was used to estimate the fraction of nitrogen retained into muscle or liver tissue at isotopic equilibrium with the experimental diets (Phillips 2012):

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}} (\text{‰}) = f_{\text{fish meal}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{fish meal}} + \Delta) + f_{\text{PBM}} (\delta^{15}\text{N}_{\text{PBM}} + \Delta)$$

$$1 = f_{\text{fish meal}} + f_{\text{PBM}}$$

where $\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{fish meal}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{PBM}}$ are the isotopic values of the fish, fish meal (or 0PBM) and poultry by-product meal (or 100PBM), respectively, and $f_{\text{fish meal}}$ and f_{PBM} are the estimates of the fraction of nitrogen retained from each diet. $\delta^{15}\text{N}_{\text{muscle}}$ values were corrected using diet and tissue-specific trophic discrimination factors (Δ) prior to applying the isotope-mixing model.

Statistical analyses

In order to test for differences in biological indices, chemical composition and the trophic discrimination factors calculated for muscle and liver tissue samples between treatments at the end of the experiment a one-way analysis of variance (ANOVA) was used after testing

|

for homogeneity of variance among repetitions within each treatment. Those values given in percentage were transformed to arcsin-squared prior the ANOVA. The level of significance was set at $P < 0.05$. When statistical differences were detected a Tukey post-hoc test was used to identify statistical differences between treatments. SigmaStat for Windows ver. 3.5 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA) was used to perform the statistical analyses. Given that the 100PBM treatment was restarted and run for a shorter period of time than the other treatments, the growth rate estimates were excluded from statistical analysis and are presented solely for comparative purposes.

Results

Fish growth and survival

At the end of the experiment, percentage weight gain from the initial time varied significantly among fish fed the various experimental diets, ranging from 224% for the 100PBM up to 1902% for the 67PBM (Table 3). Weight gain standardized to the weight at the beginning of the experiment (final weight/initial weight) was ≥ 10 , except for the 100PBM treatment, which exhibited a 3.2 fold increase in weight. Significant differences in growth rates were observed among treatments. TGC was significantly higher in the 67PBM treatment (1.1) than in the 0PBM and 33PBM treatments (0.7 and 0.8). Survival was also higher from 76 to 89% for treatments 0PBM, 33PBM and 67PBM, whereas 100PBM diet had significant lower survival (52%) than the rest of the treatments.

|
[Table 3 near here]

Tissue biochemical composition

Muscle tissue exhibited similar protein and lipid contents in all treatments (Table 3). However, the 0PBM resulted in significantly lower ash content compared to the rest of the dietary treatments. The fatty acid profile of muscle tissue at the end of the experiment indicated significant variations among treatments (Table 4). Oleic and linoleic acids increased significantly with the level of inclusion of PBM in the diet, whereas the opposite trend was found for EPA, DPA (22:5n-3) and DHA. As a consequence, the n-3/n-6 ratio tended to decrease as a function of increasing PBM incorporation in the diets.

[Table 4 near here]

Isotope ratios and mixing model results

At the end of the experiment the isotopic values from muscle and liver tissues varied among the experimental treatments, from 18.1 to 9.6‰ for muscle tissue (0PBM and 100PBM, respectively) and from 16.5‰ (0PBM) to 9.1‰ (100PBM) for liver tissue (Table 5). The isotopic trophic discrimination factor ranged from 2.8 to 4.9‰ (0PBM to 100PBM) for muscle tissues and from 1.2 to 4.4‰ (0PBM to 100PBM) in liver tissues.

[Table 5 near here]

The results of the diet-based isotope-mixing model indicated that in the 33PBM treatment 21 and 50% of the nitrogen came from the PBM diet in the case of muscle and liver tissue, respectively. In the case of the 67PBM treatment, 73 and 89% of the nitrogen came from the PBM diet for muscle and liver. Estimates of nitrogen retention were similar when applying the isotope-mixing model using the isotopic composition of the fish and poultry by product meal (Table 6).

[Table 6 near here]

Discussion

Totoaba is an interesting species with high potential for aquaculture, not only due to its status as an endangered species and restocking potential, but due to its fast growth rates (Rueda-López et al. 2011) and excellent meat quality with a high market value. Rueda-López et al. (2011) evaluated the effect of protein to energy ratios using a factorial design and reported that highest growth was achieved with diets containing 52% CP and 8% CF that were formulated with high quality low-temperature fishmeal. In the present study, a similar formulation was used (51% CP and 8% lipid) as the base for the experimental diets, and a similar ingredient composition was used for the control diet (0PBM).

After the 86 days of the feeding trial the fish fed the 67PBM had significantly higher growth performance compared to the 0PBM and 33PBM treatments.

All diets had a somehow similar proximate composition and amino acid (AA) profiles. When alternative protein sources in fish feeds are evaluated one of the major

|

concerns is that diets are actually formulated with adequate AA profiles. Ensuring that essential amino acids (EAA) are not limiting is important for obtaining similar or better growth responses compared to fishmeal. Although no EAA requirements for totoaba have been reported so far, based on the performance of the fish fed the 67PBM diet, the EEA profile appeared to have successfully met the requirements for adequate growth. PBM is known to contain high levels of protein (up to 65%) and a favourable AA profile that supports adequate growth in most cultured fish species, particularly with respect to the major EAA with the exception of methionine (NRC 2011). In the present study Lys content was the EAA that showed the highest variation among diets, decreasing from 4.2 to 3.4% of the dry diet as PBM inclusion increased. Previous studies indicate that 3.3% Lys in diets is sufficient to meet the requirements for most fish species (Espe et al. 2007; Zhou et al. 2010; NRC 2011). Based on the fast growth response obtained in this study with fish fed diet 67PBM, which contained 3.4% Lys and 0.9% methionine (Met) of diet dry weight seem to meet the totoabas' requirement for these amino acids. Similarly, the other essential amino acids appear to have been present at the required level considering what has been reported for most species (NRC 2011). These results warrant future experiments evaluating the effect of lowering the protein level in the diets while supplying different levels of essential AA to find their exact requirements.

No apparent differences in the AA profile were observed between the 67PBM and 100PBM diets, but the growth rate of the latter was much smaller. Hence, the differences cannot be explained by the AA profiles of the diets. Protein digestibility of the diets and other nutritional factors must be taken into account. Using similar diet formulations as to

those used in this study to evaluate performance in juvenile rainbow trout (Badillo et al. 2014) found no differences in protein retention among dietary treatments (0PBM to 100PBM), and showed that rainbow trout could be adequately cultured with total fishmeal replacement by PBM. However, Parés-Sierra et al. (2014) in a parallel study reported that trout fed from 0 to 100PBM found no differences in growth and performance, whereas significant differences were observed in muscle fatty acid profile among treatments, a profile that was reverted by feeding the control diet (0PBM) at the end of the trial for only 28 days.

In the present study, fish fed the 100PBM diet resulted in the lowest growth rate and highest mortality. The drastic difference in performance between fish the 67PBM and 100PBM diets can be explained by the difference in essential fatty acids (EFA), particularly the levels of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) and the high requirements of marine fishes for these EFA. Fish oil contains LC-PUFA such as EPA, DHA and arachidonic acid. The lipids present in the poultry meal and oil are generally rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) (particularly oleic acid) and total n-6 PUFA, but low in EFA such as n-3 LC-PUFA, EPA and DHA (Higgs et al. 2006). In a recent study in which growth rates of the yellowtail (*Seriola lalandi*) were evaluated in response to the substitution of fish oil with poultry oil, Bowyer et al. (2012) concluded that fish fed diets containing 100% poultry oil resulted in similar growth compared to those fed the diets formulated with 100% fish oil. However, those diets were formulated with fishmeal that had not been defatted and that contained 5% lipids, which likely provided some EFA such as n-3 LC-PUFAs. The 67PBM diet contained 8.1% crude fat where the content of EPA+DHA was 0.6% of dry diet), whereas the 100PBM diet contained only 1.1% EPA+DHA with

|

8.0% crude fat (equal to 0.1% of dry diet). Thus EPA+DHA level in the 100PBM diet is substantially lower than the requirement of 0.3-0.6% of the dry diet reported by Lochman & Gatlin (1993) for other Sciaenidae, the red drum (*Sciaenops ocellatus*), while the level in the 67PBM diet likely meet this requirement.

The fact that fish fed the 67PBM diet resulted in significantly higher growth rates compared to those fed the 0PBM and 33PBM diets, in which the EAA and EFA content should have been provided in sufficient amounts to promote good growth, is intriguing. It is probably related to the higher MUFAs content in the 67PBM diet, in particular the levels of 18:1n-9, which is a good substrate for the generation of energy. Here totoaba muscle tissue had no accumulation effect of monosaturated fatty acids (i.e., 18:1n-9) in the muscle compared to those in the diets, suggesting that this FA was utilized as an energy source and probably had a protein sparing effect. However, given the fact that fish fed the 67PBM diet had substantially higher growth rates compared to fish fed the 33PBM diet, which presumably contained adequate levels of all nutrients required, raises the possibility of better protein digestibility in the PBM. It will be also important in the future to test a sustained growth at long term since DHA and all the n-3 LC-PUFA were more than halved than those contained in 0PBM.

The use of stable isotopes has been regarded as a useful technique for quantifying N retention in animals feeding on different protein sources, as long as these sources differ in isotopic composition (Beltrán et al. 2009; Martínez del Río et al. 2009). This technique is also sufficiently sensitive to allow for the quantification of differences in protein quality among ingredients with similar chemical composition (Bender 2012).

Here, a clear difference in $\delta^{15}\text{N}$ values was observed among diets, ranging from 15.3‰ for the 0PBM diet to 4.7‰ for 100PBM. It is important to acknowledge that although FM and PBM were the main protein sources in the diet, gelatin and corn meal were included as a binder and filler (at 6.0 g and 5.5 g 100 g^{-1} , respectively) in all the diets. Corn meal has a very low protein content (< 8%, NRC 2011), and hence a negligible fraction of the nitrogen in the diets was of corn origin. Gelatin, however, can contain 17-18% nitrogen (GMIA Gelatin manual 2012). Gelatin was added at 6 g 100g diet^{-1} ($\delta^{15}\text{N} = 7.8\text{‰}$), but its addition did not change the isotopic composition of the diets substantially. Based on mass-balance considerations, this implies the gelatin contributed with close to 10% from the total nitrogen. Also, comparison of the mixing model results using the isotopic composition of the 0 and 100PBM diets or both types of meals as endpoints yielded similar results (Table 6).

The calculation of trophic discrimination factors requires that fish tissues reach isotopic equilibrium with that of their diet (Post 2002). Isotopic turnover follows an asymptotic relationship in rapidly growing organisms (Fry & Arnold 1982). The isotopic turnover rate of fish muscle is closely related to biomass gain, and approaches isotopic equilibrium to a new diet after a 6-8-fold increase in weight based on estimates of the dilution of the initial isotopic composition following a dietary shift (Hesslein et al. 1993; Herzka 2005). Based on the relative gain in weight of the fish during the course of the experiment (Table 3), the muscle tissue of the fish fed the 0, 33 and 67PBM treatments should have been at or very close to isotopic equilibrium. Those from the 100PBM only exhibited a 3.2 fold increase in weight, and hence isotopic equilibrium may not have been fully reached. Nevertheless, the trophic fractionation factors for muscle tissue calculated for

|
the 33, 67 and 100PBM diets were similar (4.8, 4.2 and 4.9‰, respectively), and the mixing model was applied using the isotopic composition of the 100PBM as a source (diet or ingredient).

Liver tissue has a much more rapid rate of isotopic turnover than that of muscle. The time to isotopic equilibrium in the liver tissue of young teleost fishes has been estimated at days to a few weeks (Buchheister & Latour 2010; Heady & Moore 2013; Xia et al. 2013). Since the feeding experiment lasted for 10-12 weeks, we assume the liver tissue in all treatments had reached isotopic equilibrium by the end of the experiment.

In general, the trophic discrimination factors for muscle were higher than those for liver tissue, and the lowest values both in muscle and liver tissue of fish were found on those fed the diet containing only fishmeal (2.8 and 1.2‰), whereas higher values for liver tissue was found in the diets containing 100PBM (4.4‰). Variations in trophic discrimination have been related to a variety of processes, including protein quality and quantity (Vanderklift & Ponsard 2003; Robbins et al. 2005; Gaye-Siessegger et al. 2007), as well as protein catabolism or isotopic routing (Martínez del Río et al. 2009). Given that the AA profiles of the diets were similar and that requirements appear to have been met, it is likely that protein quality is not the cause of the differences in trophic fractionation. Previous studies have documented differences in trophic fractionation between muscle and liver tissue (Trueman et al. 2005; Beltran et al. 2009). As in this study, for most treatments the discrimination factors were higher for muscle tissue. The specific causes of variations in trophic fractionation between muscle and liver tissues seems likely due to isotopic routing, or the

|

allocation of specific compounds to particular tissues or metabolic functions (i.e., as energy substrates) as part of the normal metabolic process. Variations in protein digestibility leading to differential retention of dietary components may also be important. Lastly, the biochemical composition of muscle and liver tissue varies widely, as does its metabolic function. All of these possibilities certainly warrant further research. For our purposes, however, the calculation of the trophic discrimination factors was oriented toward the application of the mixing model.

Based on the isotope-mixing model results for diet, nitrogen from the PBM was slightly better retained into the totoaba muscle and liver tissue when incorporated at higher proportions as shown for 67PBM diet, whereas lower retention was observed when added at 33%. Very similar results were obtained using the diet or single meal-based (i.e., protein source) estimates, which indicates that the inclusion of gelatin as a binder had a negligible effect on the mixing model results. For muscle tissue, the estimates of N retained from the poultry by product meal (21-24%) was somewhat lower than the percentage of inclusion in the 33PBM diet but similar in the case of the 67PBM diet (73-66%). For both dietary treatments, liver tissue isotope ratios led to a higher estimate of N retention from the diet than predicted based on the level of inclusion of PBM. Again, the differences between tissues may be due to their biochemical composition or isotopic routing. Regardless of the cause of the differences between tissues, the analysis of the isotopic composition clearly indicates that nitrogen from the PBM was successfully incorporated into body tissues.

The fact that nitrogen from the PBM was successfully retained producing better growth rate on diet 67PBM when diets had similar EAA profiles, could be explained if there

|

was a protein sparing effect due to efficiently used energy sources other than protein and/or a better protein digestibility of the PBM. Differences in digestibility of the diets and ingredients could also help explain the results, since better digestibility provides higher EAA availability in plasma for protein synthesis if adequate energy sources are provided (Bender 2012). However, this study was not designed to evaluate digestibility of the diets and ingredients or to determine the levels of EFA. When fishmeal is replaced by other protein sources it is important to consider meeting the needs of other required nutrients besides EAAs.

Based on the results obtained in the present study, it can be concluded that PBM is a good source of nutrients for totoaba juveniles when used at 67% replacement level of fishmeal in diets containing 51% protein and 8% lipids, resulting in an adequate growth rate and survival. However, it will be important to study the digestibility and prompt availability of AA absorbed for adequate protein synthesis. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that dietary protein was offered in excess, and thus the study of fish performance in response to lower crude protein levels (providing additional amount of EAA and containing the FA profile similar to 67PBM) or studying the effect of protein replacement using compound specific isotopic analysis to assess protein utilization more adequately is warranted.

|

Acknowledgments

This work was supported by projects SAGARPA/CONACyT 109150 and 164673. We thank Germán Dávalos for donating the poultry by-product meal from the National Renderers Association, and Francisco Negrete for donating the mineral and vitamin mixture from DSM México. Daniel Badillo thanks CONACyT for his fellowships for graduate studies. All co-authors express that experiments were performed in agreement to the ethics statement from the University (UABC) and Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) in accordance to international guidelines.

References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) Official Methods of Analysis, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Badillo D., Herzka S.Z. & Viana M.T. (2014) Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers. Accepted in PlosOne.
- Beltrán M., Fernández-Borrás J., Médale F., Pérez-Sánchez J., Kaushik S. & Blasco J. (2009) Natural abundance of ^{15}N and ^{13}C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquaculture Nutrition* **15**, 9–18.
- Bender D.A. (2012) Amino acid metabolism. Third edn. John Wiley & Sons, Ltd, West University College London, UK.
- Boecklen W.J., Yarnes C.T., Cook B.A. & James A.C. (2011) On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **42**, 411–440.
- Boisen S., Hvelplund T. & Weibjerg M.R. (2000) Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock Production Science* **64**, 239-251.
- Bowyer J.N., Qin J.Q., Smullen R.P. & Stone D.A.J. (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.

- Buchheister A. & Latour R.J. (2010) Turnover and fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in tissues of a migratory coastal predator, summer flounder (*Paralichthys dentatus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **67**, 445–461.
- Christie W.W. (1982) Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Second Edn. Pergamon, Oxford. UK.
- Espe M., Lemme A., Petri A. & El-Mowafi A. (2007) Assessment of lysine requirement for maximal protein accretion in Atlantic salmon using plant protein diets. Aquaculture **263**, 168-178
- Folch J., Lee M. & Stanley G. (1957) A simple method of isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry **22**, 497-509
- Fry B. (2006) Stable Isotope Ecology. Springer edn, Baton Rouge, LA USA.
- Fry B. & Arnold C. (1982) Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Oecologia **54**, 200-204.
- Gamboa-Delgado J., Rojas-Casas M.G., Nieto-López M.G. & Cruz-Suárez L.E. (2013) Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. Aquaculture **383**, 33–40.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Abel H. & Becker K. (2007) Starvation and low feeding levels results in an enrichment of ^{13}C in lipids and ^{15}N in protein of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biology **71**, 90-100.

- Hansen A.C., Karlsen Ø., Rosenlund G., Rimbach M. & Hemre G.I. (2007) Dietary plant protein utilization in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Nutrition* **13**, 200–215.
- Heady W.N. & Moore J.W. (2013) Tissue turnover and stable isotope clocks to quantify resource shifts in anadromous rainbow trout. *Oecologia* **172**, 21–34.
- Herzka S.Z. (2005) Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine Coastal Shelf Science* **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 $\delta^{15}\text{N}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 2071–2076.
- Hidalgo F. & Alliot E. (1988) Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **72**, 115–129.
- Higgs D.A., Balfry S.K., Oakes J., Rowshandeli M., Skura B.J. & Deacon G. (2006) Efficacy of an equal blend of canola oil and poultry fat as an alternate dietary lipid source for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. I: effects on growth performance, and whole body and fillet proximate and lipid composition. *Aquaculture Research* **37**, 180–191.
- Jobling M. (2003) The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture Nutrition* **34**, 581–584.
- Le Vay L. & Gamboa-Delgado J. (2011) Naturally occurring stable isotopes as direct

- measures of larval feeding efficiency, nutrient incorporation and turnover. *Aquaculture* **315**, 95-103.
- Lochman R. & Gatlin D. (1993) Essential fatty acid requirement of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **12**, 221-235.
- Logan J., Haas H., Deegan L. & Gaines, E. (2005) Turnover rates of nitrogen stable isotopes in the salt marsh mummichog, *Fundulus heteroclitus*, following a laboratory diet switch. *Oecologia* **147**, 391–395.
- Malpica-Cruz L., Herzka S.Z., Sosa-Nishizaki O., Lazo J.P. & Trudel M. (2012) Tissue-specific isotope trophic discrimination factors and turnover rates in a marine elasmobranch: empirical and modeling results. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **69**, 551–564.
- Martínez del Río C., Wolf N., Carleton S.A. & Gannes L.Z. (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* **84**, 91-111.
- National Research Council (NRC) (2011) Nutrient requirements of fish and shrimp, Editorial National Academics Press, Washington, D.C. USA.
- Parés-Sierra G., Durazo E., Ponce M.A., Badillo D., Correa-Reyes G. & Viana M.T. (2014) 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. *Aquaculture Research* **49**, 1459-1469.
- Phillips D.L. (2012) Converting isotope values to diet composition: the use of mixing models. *Journal of Mammalogy* **93**, 342–352.

- |
- Post D.M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**, 703–718.
- Robbins C.T., Felicetti L.A. & Sponheimer M. (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* **144**, 534–540.
- Robaina L., Izquierdo M.S., Moyano F.J., Cocorro J., Vergara J.M. & Montero D. (1995) Soyabean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* **130**, 219–233.
- Rueda-López S., Lazo J.P., Correa-Reyes G. & Viana M.T. (2011) Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juveniles *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* **319**, 385-390.
- Sealey W.M., Hardy R.W., Barrows F.T., Pan Q. & Stone D.A. (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*. *Journal of the World Aquaculture Society* **42**, 46-55.
- Trueman C.N., McGill R.A.R. & Guyard P.H. (2005) The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 3239–3247.
- Vanderklift M.A. & Ponsard S. (2003) Sources of in consumer-diet $\delta^{15}\text{N}$ enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* **136**, 169-182.

- Varela J.L., de la Gándara F., Ortega A. & Medina A. (2012) ^{13}C and ^{15}N analysis in muscle and liver of wild and reared young-of-the-year (YOY) Atlantic bluefin tuna. *Aquaculture* **355**, 17–21.
- Wilson R. (2002) Amino Acids and Proteins. In: Halver JE, Hardy RW (Eds.), *Fish Nutrition*. Third Edn. Academic Press, San Diego, CA.
- Xia B., Gao Q.F., Li H., Dong S.L. & Wang F. (2013) Turnover and fractionation of nitrogen stable isotope in tissues of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* with emphasis on the role of growth and metabolism. *Aquaculture Environment Interactions* **3**, 177-186.
- Zhou P., Zhang W., Davis D.A. & Lim C. (2010) Growth response and feed utilization of juvenile hybrid catfish fed diets containing distillers' dried grains with solubles to replace a combination of soybean meal and corn meal. *North American Journal of Aquaculture* **72**, 298–303.

Table 1 Ingredients (g Kg^{-1}), proximate composition (% dry weight basis), $\delta^{15}\text{N}$ values and amino acid composition (% of dry weight basis) of the four experimental diets containing different levels of substitution of fish meal with poultry by-products meal (PBM; 0, 33, 67 and 100% replacement) used to feed juveniles totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

<i>Ingredients (g Kg⁻¹)</i>	Experimental Treatments			
	0PBM	33PBM	67PBM	100PBM
Poultry by-product meal (PBM) ^a	0	225.0	450.0	672.0
Fishmeal ^b	652.0	433.3	215.0	0
Corn meal	55.0	55.0	55.0	55.0
Fish oil	29.2	19.5	9.7	0
Cornstarch	166.4	169.8	172.9	175.6
Gelatin	60.0	60.0	60.0	60.0
Rovimix for carnivorous fish ^c	30.0	30.0	30.0	30.0
Stay C ^c	4.0	4.0	4.0	4.0
Sodium benzoate	2.3	2.3	2.3	2.3
Choline chloride	1.0	1.0	1.0	1.0
Tocopherol	0.1	0.1	0.1	0.1
Total	1000	1000	1000	1000
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>				
Moisture	2.3	2.3	2.5	2.5
Crude protein	51.1	51.6	51.6	51.1
Crude fat	7.9	8.0	8.1	8.0
Ash	13.9	12.0	10.0	9.3
NFE ^d	27.1	28.4	30.3	31.6
<i>Diet isotopic composition</i>				
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	15.3	11.5	7.7	4.7
<i>Essential amino acids (% of dry diet)</i>				
LYS	4.2	3.7	3.4	3.4
MET	1.2	1.2	0.9	1.0
THR	2.1	2.2	2.0	2.2
ARG	2.4	2.1	2.2	2.4
PHE	2.0	2.0	1.9	2.0
HIS	1.0	0.9	0.9	1.0
ILE	2.1	2.0	1.8	2.0
LEU	4.5	4.1	3.9	4.1
VAL	2.6	2.5	2.3	2.4
<i>Non essential amino acids (% of dry diet)</i>				
ALA	5.8	5.2	5.0	5.1

ASP	3.5	3.3	4.1	2.7
GLY	6.5	7.7	8.7	8.2
GLU	5.4	4.9	5.1	5.7
SER	1.7	2.5	2.5	2.5
PRO	4.9	4.9	5.2	4.9
TAU	0.5	0.5	0.5	0.5
TYR	0.7	1.7	1.0	0.9

^a“Pet food grade” supplied by the National Renderers Association, USA.

^bSardine fishmeal from Proteínas Marinas y Agropecuarias SA de CV, Guadalajara, México.

^cRovimix[®]; Stay-C donated by DSM, Guadalajara, México.

^d NFE (%) = 100 - (% crude protein + % total lipid + % ash)

Table 2 Main fatty acid composition (% of total fatty acids) of the four experimental diets containing different levels of substitution of fishmeal with poultry by-products meal (PBM; 0, 33, 67 and 100% replacement) used to feed juveniles totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

FA	Experimental Treatments			
	0PBM	33PBM	67PBM	100PBM
14:0	8.18	7.35	3.48	1.19
15:0	0.74	0.65	0.39	0.16
16:0	22.70	26.75	25.33	25.57
16:1n7	7.53	7.79	6.08	6.22
17:0	0.60	0.50	0.41	0.21
18:0	4.10	5.23	7.43	7.44
18:1n-9	14.07	20.07	24.28	31.68
18:2n-6	3.14	7.10	13.89	19.52
18:3n-6	0.27	0.26	0.23	0.20
18:3n-3	0.79	0.74	0.80	0.80
18:4n-3	1.80	1.23	0.58	nd
20:1n-9	1.13	0.89	0.50	0.27
20:4n-6	1.64	1.18	2.61	2.42
20:5n-3	11.66	6.95	3.77	0.51
22:5n-3	1.57	0.82	0.51	0.17
22:6n-3	12.40	5.97	4.15	0.57
∑ Saturated	36.32	40.48	37.04	34.57
∑ MUFA	22.73	28.75	30.86	38.17
∑ PUFA	33.27	24.25	26.53	24.18
EPA+DHA	24.07	12.92	7.92	1.08
n-3/n-6	5.59	1.84	0.59	0.09

Table 3 Biological indices for juvenile totoaba (*Totoaba macdonaldi*) fed four experimental diets containing different levels of substitution of fishmeal with poultry by-products meal (PBM; 0, 33, 67 and 100% replacement).

Biological indices	Initial	Experimental Treatments			
		0PBM	33PBM	67PBM	100PBM*
Initial weight (g; IW)		2.7±0.2	2.7±0.1	2.7±0.0	6.4±0.2
Final weight (g; FW)		26.0±1.9 ^c	34.0±6.0 ^b	53.2±1.8 ^a	20.7±3.4
Weight gain (% of initial)		868.6±69.8 ^c	1174.4±232.2 ^b	1902.3±72.6 ^a	224.2±57.2
FW/IW		9.6	12.6	19.7	3.2
TGC **		0.7±0.0 ^b	0.8±0.1 ^b	1.1±0.2 ^a	0.5±0.1
Survival (%)		76.0±10.6	78.7±10.1	89.3±2.4	52.4±3.8

Values are given as means and (±) standard deviation (SD), (n=3). Values within the same row with different superscripts letters means significant differences (P<0.05).

* Biological indices from this treatment were calculated for 72 days and therefore were not considered in the statistic.

** TGC = ((FBW $\frac{1}{3}$ - IBW $\frac{1}{3}$) / Σ (T x D) x 1000 (Thermal Growth Coefficient, Jobling, 2003)

Table 4 Proximate (% of diets) and main fatty acid composition (% of total fatty acids) from muscle tissue of juvenile totoaba (*Totoaba macdonaldi*) fed four experimental diets containing different levels of substitution of fish meal with poultry by-products meal.

Biological indices	Initial	Experimental Treatments			
		0PBM	33PBM	67PBM	100PBM*
<i>Proximate composition of muscle tissue (% dry matter)</i>					
Humidity	82.1±1.3	80.0±1.2	80.2±0.5	80.8±0.0	80.5±0.6
Crude Protein	82.7±0.6	81.1±1.3	82.6±0.7	81.3±1.1	82.2±0.2
Lipids	1.3±0.2	2.2±0.4	2.2±0.9	2.1±0.1	2.3±0.7
Ash	8.9±0.4	4.8±0.1 ^b	5.6±0.2 ^a	6.1±0.1 ^a	5.9±0.3
NFE **	7.0	11.9	9.6	10.5	9.6
<i>FA (% of total)</i>					
14:0		2.23±0.36	0.93±0.28	1.66±1.05	0.60±0.4
16:0		18.50±0.47	18.21±0.76	18.57±1.79	15.74±2.41
16:1n7		5.20±0.80	3.52±0.00	5.78±0.98	4.66±0.62
17:0		0.45±0.06	0.31±0.12	0.22±0.06	0.15±0.00
18:0		7.83±0.65	9.50±0.41	7.30±0.71	8.51±0.30
18:1n-9		13.49±1.73 ^b	20.94±4.95 ^a	23.92±0.46 ^a	28.35±0.10
18:1n-7		2.90±0.99	2.64±0.28	2.43±0.02	2.22±0.17
18:2n-6		4.18±0.25 ^b	13.80±6.52 ^a	19.52±1.85 ^a	24.70±1.16
18:3n-6		0.19±0.02 ^b	0.24±0.00 ^a	0.27±0.05 ^a	0.35±0.01
18:3n-3		0.70±0.07	0.55±0.02	0.82±0.22	0.65±0.08
18:4n-3		0.84±0.19	0.32±0.18	0.33±0.07	0.26±0.00

20:1n-9	0.68±0.09	0.67±0.02	0.64±0.25	1.46±1.20
20:4n-6	3.96±0.05	4.43±0.08	3.58±0.30	4.44±0.68
20:5n-3	13.62±0.65 ^a	6.60±3.30 ^b	4.37±0.23 ^b	1.57±0.70
22:5n-3	2.60±0.36 ^a	1.78±0.64 ^a	1.06±0.18 ^b	0.74±0.51
22:6n-3	21.08±3.66 ^a	14.73±6.61 ^a	8.89±0.83 ^b	4.09±0.95
24:1n-9	0.62±0.13	0.46±0.05	0.43±0.20	0.68±0.14
Σ Saturated	29.01±0.06	28.95±0.67	27.75±2.12	25.00±2.64
Σ MUFA	22.28.±3.54 ^b	27.79±4.56 ^a	33.20±1.18 ^a	37.37±0.65
Σ PUFA	47.14±3.33 ^a	42.35±4.10 ^{ab}	38.87±3.02 ^b	36.70±1.64
EPA+DHA	34.70±3.40 ^a	21.33±9.89 ^b	13.26±0.94 ^b	5.66±1.57
n-3/n-6	2.23±0.36	0.93±0.28	1.66±1.05	0.60±0.4

Values are given as means and (±) standard deviation (SD), (n=3). Values within the same row with different superscripts letters means significant differences (P<0.05).

*100PBM treatment was performed during 72 days and therefore results are not considered in the statistic.

** NFE (%) = 100 - (% crude protein + % total lipid + % ash).

Table 5 Nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) of muscle and liver tissue (n=3) and trophic discrimination values for juvenile totoaba (*Totoaba macdonaldi*) fed four experimental diets containing different levels of substitution of fish meal with poultry by-products meal.

	Experimental Treatments			
	0PBM	33PBM	67PBM	100PBM
<i>Isotope ratios at equilibrium with the diet</i>				
Muscle	18.1±0.0 ^a	16.3±1.6 ^b	11.9±0.2 ^c	9.6±0.3
Liver	16.5±1.2 ^a	12.8±2.3 ^b	9.9±0.3 ^b	9.1±0.6
<i>Trophic discrimination factors</i>				
Muscle	2.8±0.0 ^c	4.8±0.3 ^a	4.2±0.2 ^b	4.9±0.3
$\frac{V_{\text{Liver}}}{a}$	1.2±0.6 ^b	1.3±1.0 ^b	2.2±0.2 ^a	4.4±0.6

Values are given as means and (±) standard deviation (SD) (n=3). Values within the same row with different superscripts letters means significant differences (P<0.05).

*100PBM treatment was performed during 72 days and therefore results are not considered in the statistic.

Table 6 Percentage of nitrogen retention by totoaba (*Totoaba macdonaldi*) fed formulated diets with two levels (33 and 67%) replacement of fishmeal with poultry by-product meal (PBM). Nitrogen retention was estimated using a two-source isotope-mixing model based on measurements of isotopic measurements of muscle and liver tissue and using (a) the isotopic composition of diets formulated with only fish meal poultry by-product meal and (b) the isotopic composition of the fish meal and poultry by-product meal.

Treatment	33PBM		67PBM	
	Muscle %	Liver %	Muscle %	Liver %
(a) Diet-based endpoints				
Fishmeal-based diet	78.8	50.0	27.1	10.8
PBM-based diet	21.2	50.0	72.9	89.2
(b) Meal-based endpoints				
Fishmeal	76.2	52.9	33.8	21.7
PBM	23.8	47.1	66.2	78.3