

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN HECES DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax*) RECOGIDAS POR DISECCIÓN Y DECANTACIÓN

L. MOLINA¹, L. ROBAINA² y J.M. VERGARA²

¹ Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Dirección General de Universidades e Investigación. Consejería de Educación, Cultura y Deportes. Gobierno de Canarias. P.O. Box 56, 35200 Telde. Gran Canaria. España.

² Departamento de Biología. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). P.O. Box 550, 35017 Las Palmas de Gran Canaria. España.

ABSTRACT

COMPARISON OF NITROGEN CONTENTS OF EUROPEAN SEABASS (*Dicentrarchus labrax*) FAECES COLLECTED BY DISSECTION AND DECANTATION METHODS

The present work is part of a long-term study aimed to assess the environmental impact of an off-shore cage farm for the on-growing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and seabass (*D. Labrax*). The study implies a nutritional approach, including estimations of feed consumption, fish nutrient retention and excretion.

The aim of this experiment was to check the usefulness of dissection as a method to collect seabass faeces in order to determine the apparent digestibility of Nitrogen (ADC_N), in comparison with the decantation method, like a method widely used for digestibility studies.

The results of faeces nitrogen content obtained by dissection showed a progressive decrease along the gut with significantly different values in the posterior intestine. The ADC_N values obtained with faeces collected by decantation and dissection were compared and their differences discussed.

Key words: Aquaculture, nutrition, seabass, faeces, environmental impact, nitrogen.

RESUMEN

Este trabajo es parte de un estudio de impacto ambiental que se está realizando en un sistema de jaulas flotantes para engorde de lubina (*D. labrax*) y dorada (*Sparus aurata*). El estudio se realiza desde un punto de vista nutricional, incluyendo estimaciones del alimento consumido, la retención y excreción de nutrientes por los peces.

El objetivo de este experimento fue el determinar la conveniencia del uso de la técnica de disección en la determinación de digestibilidad de nutrientes en lubinas, por comparación con la técnica de decantación como método ampliamente utilizado en este tipo de estudios.

Los resultados de composición de heces obtenidas por disección mostraron una disminución progresiva en el contenido de nitrógeno conforme avanzan hacia el intestino posterior, encontrándose valores significativamente más bajos a partir de la válvula íleo-cecal. Se compararon y analizaron las diferencias entre la digestibilidad del nitrógeno obtenida a partir de las heces recogidas en esta porción del intestino y las obtenidas por decantación.

Palabras clave: Acuicultura, nutrición, lubina, heces, impacto ambiental, nitrógeno.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la composición de las heces tiene interés en cuanto que sirve como base del cálculo de los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) de los nutrientes que los peces han ingerido en el pienso. De esta manera se obtiene información acerca de la utilización por los peces de los nutrientes contenidos en dichos ingredientes y por lo tanto, sobre la formulación de un pienso.

Por otro lado, el problema del impacto ambiental de la acuicultura es debido fundamentalmente a la descarga al medio de nutrientes, especialmente Nitrógeno y Fósforo, procedentes del alimento no ingerido y de la excreción de los peces, tanto en forma de heces sólidas como de elementos en disolución, principalmente amonio, que se eliminan a través de las branquias. Por estas razones, una aproximación al impacto ambiental es la cuantificación de la cantidad de N que los peces excretan al medio, tanto en forma de heces como en forma de elementos solubles.

Estudios realizados por diferentes autores avalan la afirmación que el Nitrógeno es un elemento esencial en la dieta de los peces (Ketola, 1975; Ogino et al. 1979; Watanabe et al., 1980) y debe aparecer en el pienso en unas dosis suficientes de acuerdo a los requerimientos de la especie. Sin embargo, dosis mayores de este nutriente se eliminarían al medio en diferentes formas (Wallin y Hakanson, 1991), lo que podría producir una hipernutricación del ambiente y la consiguiente eutrofización que puede causar serios problemas, tanto al medio circundante como a la propia producción (Beveridge, 1987). De ahí el interés por la investigación relativa a la digestibilidad y excreción de este nutriente por los peces.

El presente trabajo está incluido en un proyecto que actualmente se está realizando y cuyo objetivo es el estudio de impacto ambiental de una instalación de jaulas flotantes para lubina y dorada. Por lo que se aborda el estudio de las heces, en cuanto que suponen una descarga al medio de distintos nutrientes, de esta manera el balance de masas (o ciclo de nutrientes en la granja) podría ser calculado teóricamente por diferencia (Gowen et al., 1991). Se pretendía recoger heces de los peces que se cultivan en las jaulas. Se tuvo que utilizar un método alternativo de recogida de heces ante la imposibilidad de utilizar el método de decantación, ampliamente utilizado para este tipo de estudio por dos motivos: las instalaciones de tanques para dicho sistema no podrían albergar peces del tamaño de los que hay en las jaulas y la empresa utiliza piensos comerciales en una cantidad notable, con lo cual se hacía imposible la inclusión de un marcador inerte. Como marcador interno se decidió el uso de las cenizas insolubles en ácido (CIA) por su uso en estudios similares (Wilson, 1992; Fernández y col., 1996; Kabir y col., 1998) y por la simplicidad de la técnica.

Por otro lado, los métodos de recolección fecal han supuesto un importante problema técnico en cuanto a la precisión de los resultados obtenidos. El desarrollo de un buen número de diferentes métodos con este objetivo está en relación con el hecho de que las heces en exposición al agua pueden sufrir una disolución de los elementos que contienen sobreestimándose los coeficientes de digestibilidad aparente de los mismos. Una cuidadosa selección del método más apropiado puede mejorar la exactitud y precisión de los resultados obtenidos.

El objetivo del trabajo consistió en comparar los resultados de composición de heces obtenidas mediante los métodos de decantación y disección en dos piensos comerciales para lubina uno pelletizado y otro extrusionado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una experiencia preliminar con el objetivo seleccionar el tramo del intestino adecuado para la toma de muestras. Para ello se utilizaron peces con un peso medio

inicial de 29.44 g y se colocaron en tanques cilíndricos de fibra de vidrio con 4.000 l de capacidad. Tras un período de aclimatación de una semana, fueron alimentados con pienso comercial e idéntica frecuencia alimenticia que en el experimento principal. Posteriormente los peces fueron sacrificados con sobredosis de anestésico y sus digestivos extraídos completamente para obtener heces por disección.

Para ello se subdividió el intestino en cuatro partes. Las tres primeras correspondían al intestino anterior (intentando que las subdivisiones de las regiones intestinales tuvieran longitud similar) y la última al intestino posterior (Fig. 1). A continuación se recogieron los contenidos intestinales por disección de cada uno de estos tramos, con sumo cuidado para que no hubiera mezcla de las heces de una zona con las de otra, para lo cual los tramos fueron aislados anudándolos con hilo de sutura.

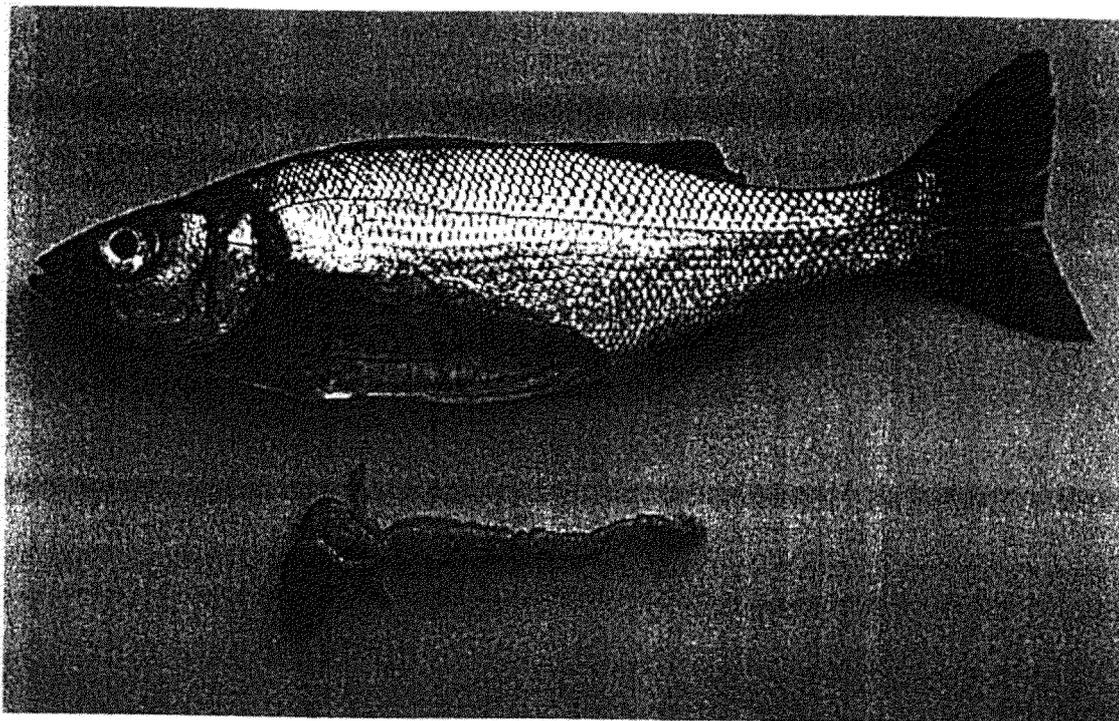


FIG. 1. Digestivo de lubina extraído completamente por disección.

Las heces así recogidas de cada una de las cuatro zonas fueron analizadas por triplicado formando un "pool" con las heces extraídas de la misma zona para distintos peces. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.

TABLA I.- Contenido en Nitrógeno (N) de heces obtenidas por disección en distintas zonas del intestino de lubinas. En las casillas se indican las medias de los datos +/- la desviación estándar; en la misma fila los valores que no se han consignado con igual letra difieren significativamente según el test de Tukey en un intervalo de confianza del 95%.

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
Nitrógeno (%)	7.72 +/- 0.09 a	6.68 +/- 0.18 b	5.04 +/- 0.66 c	4.35 +/- 0.12 c

Estos datos están de acuerdo con los reportados por Fernández et al. (1996) para dorada. De acuerdo con estos resultados, se dedujo que la absorción del N ya había terminado en el intestino posterior e incluso en la parte final del intestino anterior, pero para mayor seguridad, decidimos recoger las muestras de heces para su análisis

exclusivamente de la zona posterior del intestino (zona 4), después de la válvula ileo-rectal, con lo que se evitaría también una posible contaminación de las muestras.

Posteriormente se realizó el experimento principal que tuvo una duración de un mes y fue realizado en tres tanques diseñados a partir del sistema Guelph con una serie de modificaciones encaminadas a disminuir la rotura de las heces por manipulación y por lo tanto, el lavado de los componentes fecales (Robaina et al., 1995) (Fig. 2).

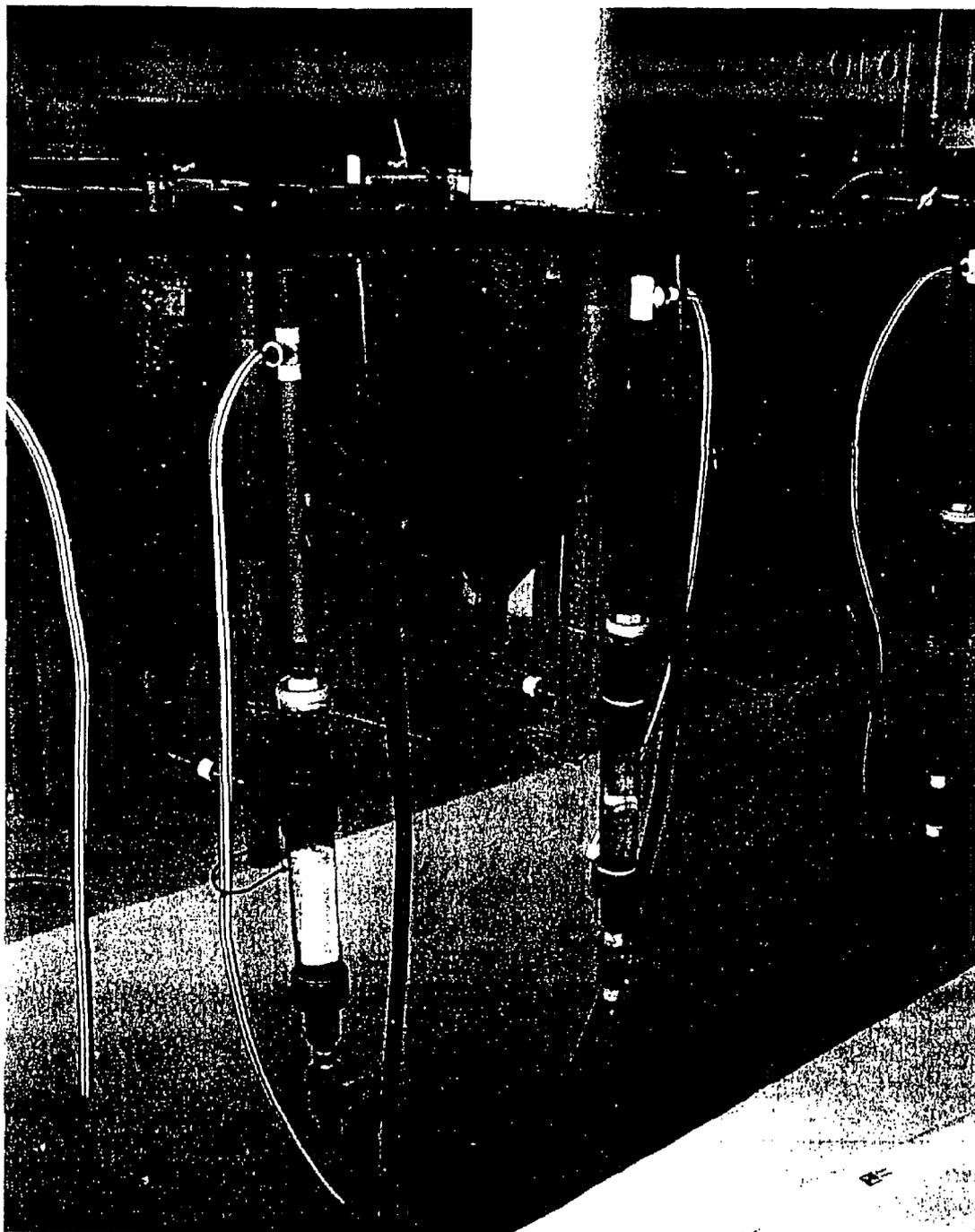


FIG. 2. Detalle de las columnas de decantación en los tanques para recogida de heces.

Se distribuyeron al azar 30 peces por tanque con un peso medio de 35.53 g . La alimentación se realizó con una dieta comercial, suministrada manualmente hasta saciedad aparente en dos tomas diarias (8.00 y 12.00 horas) y seis días a la semana.

Tras la aclimatación a los tanques se recogieron diariamente heces en las columnas de decantación hasta que se obtuvo la cantidad de muestra suficiente para los análisis a realizar.

Una vez finalizada la recogida de las heces por este método, se continuó su alimentación de idéntica manera hasta el momento en que se sacrificaron la mitad de los peces con sobredosis de anestésico, recogándose sus heces por disección de la zona antes indicada.

Se continuó el experimento con los peces restantes que eran alimentados con al misma periodicidad, pero en este caso con una dieta comercial extruída. Tras la adaptación al nuevo pienso, se recogieron diariamente heces en las columnas de decantación hasta que se obtuvo la cantidad de muestra suficiente para los análisis a realizar. Como en el caso anterior, una vez finalizada la recogida de heces por este método, se sacrificaron los peces restantes con sobredosis de anestésico y se colectaron sus heces por disección de la zona antes indicada.

Las heces obtenidas por decantación se centrifugaron durante 20 min a 10.000 rpm, se desechándose el sobrenadante, siendo el remanente pesado y liofilizado. En el caso de las obtenidas por disección sólo fueron liofilizadas. En ambos casos se conservaron a -80° hasta el momento de los análisis. Previamente a la realización del análisis las heces fueron tamizadas para eliminar las posibles escamas.

Las heces obtenidas por el método de decantación se analizaron por triplicado y las recogidas por disección por duplicado, debido a limitaciones en la cantidad de muestra obtenida, para calcular el porcentaje de Nitrógeno mediante la técnica Kjeldhal (AOAC,1985).

La cantidad de cenizas insolubles en ácido (CIA) se cuantificó mediante la técnica de Yiman (1989) que se basa en el uso de este parámetro como marcador biológico interno que permite calcular los ADC sin tener que añadir un marcador inerte a la dieta y repeletizarla, con lo que se pueden utilizar piensos comerciales tal cual, lo que resulta más sencillo y económico. Los ADC del Nitrógeno se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{ADC (\%)} = 100 - (100 \times \text{N en heces (\%)} / \text{N en dieta (\%)} \times \text{AIA en dieta (\%)} / \text{AIA en dieta})$$

Los resultados de digestibilidad obtenidos se sometieron a análisis de varianza de una entrada (ANOVA), y se compararon las diferencias entre medias con el test de Tukey en un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de heces que se recogieron por el método de decantación se encuentra dentro de unos valores similares a los que Cho et al. (1982) indican como normal. La cantidad de heces recogidas por disección fue la suficiente para llevar a cabo los análisis anteriormente indicados.

Los resultados en cuanto a los ADC obtenidos en base a los datos de las cenizas insolubles en ácido se muestran en la Tabla II.

TABLA II. Resultado de Coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) de Nitrógeno calculados a partir de heces recogidas por decantación y disección para los dos tipos de pienso. En las casillas se indican las medias de los datos +/- la desviación estándar; tanto en las columnas como en las filas los valores que no se han consignado con igual letra difieren significativamente según el test de Tukey en un intervalo de confianza del 95%; a b c indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre dietas en una columna. X Y Z indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los métodos de recogida de heces en una fila.

ADC NITRÓGENO	PIENSO PELLETIZADO		PIENSO EXTRUÍDO	
DECANTACIÓN	87.15 +/-0.39	a X	61.32 +/-0.76	b Z
DISECCIÓN	43.32 +/-1.69	c Y	50.61 +/-0.93	c Z

El coeficiente de digestibilidad aparente del Nitrógeno difiere significativamente entre las dos dietas cuando se calcula en las heces recogidas por decantación, mientras que no es así cuando las heces se recogen por disección.

Si se comparan los datos con respecto al método de recogida de heces se observa que los resultados difieren significativamente en las dos dietas. El ADC del N obtenido para las heces conseguidas en los tanques de decantación fecal son significativamente mayores que los correspondientes a heces provenientes de disección.

Ambos métodos de recolección fecal tienen sus problemas. En cuanto al uso habitual de la disección para la obtención de heces, somos conscientes que la disección plantea el problema económico de pérdida de un buen número de ejemplares. Además un factor que influye directamente en la exactitud de los datos cuando las heces son recogidas por disección es la posibilidad de contaminación con mucus o tejido intestinal. Por otro lado, es posible que se extraiga material parcialmente digerido si la absorción de nutrientes se realiza también en el intestino posterior, como apuntan Gauthier y Landis (1972) y Georgopoulou et al. (1985). Además el uso de anestésicos puede afectar a los movimientos peristálticos del intestino. Todos estos factores pueden infravalorar el ADC en cuanto a la verdadera capacidad de absorción del intestino. Thonney (1981) apunta que los niveles de AIA en dietas de peces pueden ser insuficientes para llevar a cabo análisis precisos. Asimismo, Atkinson et al. (1984) informan que algunos marcadores internos pueden ser digeridos o absorbidos, o tener una velocidad diferente a la de la digesta en el paso a través del tracto intestinal (Wetherbee and Gruber, 1993), con lo que los resultados son a menudo contradictorios (Owens y Hanson, 1992).

En lo que se refiere a la decantación, es evidente que la permanencia de las heces durante un número determinado de horas en la columna de agua puede producir la solubilización y pérdida de algunos nutrientes, con lo que se sobreestimaría los valores de ADC. Cho et al. (1985) hacen hincapié en que el porcentaje de solubilización se minimiza cuando las heces están en agua sin turbulencias, como es el caso del sistema de Guelph. Por otro lado, esta solubilización puede depender de la composición de los piensos, cuyos ingredientes pueden influir en la mayor o menor consistencia de las heces.

La sobreestimación de los ADC ha sido apuntada por otros autores como Morales (1993) con truchas (*Onkorhynchus mykiss*), aunque en este caso las heces fueron recogidas por presión abdominal; Windell y col.(1978) también obtuvieron resultados similares en cuanto a los valores de proteínas en heces recogidas por disección sin contacto con agua, y luego sometidos a permanencia en agua, en la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*); Tacon y Rodrigues (1984) también obtuvieron valores significativamente menores usando CIA frente a los obtenidos usando óxido crómico o fibra. Sin embargo, difieren de los obtenidos por Storebakken et al. (1998) para salmón

(*Salmo salar*) que no encontraron diferencias en el ADC del N en heces recogidas por distintos métodos; Kabir et al. (1998) encontraron mayores ADC al usar CIA frente a otros marcadores.

La combinación de todos estos factores podrían explicar las diferencias encontradas al compara los ADC en heces obtenidas por los dos métodos.

Ante la contradicción observada, tanto en los resultados obtenidos como los aportados por la bibliografía, no podemos definirnos con respecto al uso de estas técnicas en el proyecto que se está llevando a cabo. Futuros estudios encaminados a evaluar la digestibilidad de distintos elementos, ingredientes o dietas, podrían minimizar el error inherente a la metodología de recolección de heces para calcular los ADC, usando distintas técnicas o calculando la disolución de los nutrientes de las heces mediante experimentos paralelos que permitan aplicar un determinado factor de corrección.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC (1985). 14th edition, Washington. 1018 pp.
- ATKINSON, J.L., HILTON, J.W., SLINGER, S.J. 1984. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 41, pp: 1384-1386.
- AUSTRENG, E. 1978. *Aquaculture* 3, pp. 265-272.
- CHO, C.Y., COWEY, C.B and WATANABE, T., 1985. Ottawa, Ont., IDRC, 1985. 154 p.
- FERNÁNDEZ, F., MIQUEL, A.G., CUMPLIDO, L.R., GUINEA, J. And ROS, E. 1996. *Journal of fish Biology* 49, pp.: 735-738.
- GAUTHIER, G.F. and LANDIS S.C., 1972. *Anat. Rec.*, 172, pp. 675-701.
- GEORGOPOULOU, U., SIRE, M.F. and VERNIER, J.M. 1985. *Biology cellular*. Vol 53 nº 3. pp269-282.
- KABIR, N.M.J., WEE K.L., and MAGUIRE, G. 1998. *Aquaculture* 167 pp. 259-272.
- MORALES, A.E. 1993. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 1993.
- ROBAINA, L., IZQUIERDO, M.S., MOYANO, F.J., SOCORRO, J., VERGARA, J.M., MONTERO, D. and FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. 1995. *Aquaculture* 130 pp. 219-233
- SMITH, R.R., PETERSON, M.C. and ALLRED, A.C. 1980. *The progressive fish culturist*. Vol. 42 nº 4 . pp. 195-199.
- TACON, A.G.J. RODRIGUES, A.M.P. 1984. *Aquaculture* 43, pp: 391-399.
- THONNEY, M.L. 1981. *Proceedings of the 1981 Cornell Nutrition conference for Feed Manufacturers*. Cornell University, New York. USA pp:118-122.
- WETHERBEE, B.M. and GRUBER, S.H. 1993. *The progressive fish culturist*. Vol. 55 pp. 271-274.
- WINDELL, J.T., FOLTZ, J.W. and SAROKON, J.A. 1978. *The progressive fish culturist*. Vol. 40 nº 2 pp. 51-55.