



GLORIA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840

Informe Análisis Trazabilidad y Adaptación al Medio

Resultados 5.1 y 5.2 de la Acción 5: Análisis de la trazabilidad, seguridad alimentaria y adaptación al medio.



VICEPRESIDENCIA
CUARTA DEL GOBIERNO
MINISTERIO
PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA
Y EL RETO DEMOGRÁFICO



Unión Europea

Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)



Coordinación

Kilian Toledo Guedes

Autoría

Juan Manuel Valero Rodríguez

Frutos Marhuenda Egea

David Izquierdo Gómez

Francisca Romero Peral

Isabel Abel Abellán

Kilian Toledo Guedes



GLORiA
GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840



GOBIERNO
DE ESPAÑA
VICEPRESIDENCIA
CUARTA DEL GOBIERNO
MINISTERIO
PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA
Y EL RETO DEMOGRÁFICO



Fundación Biodiversidad



PROGRAMA
pleamar



Unión Europea

Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)



Análisis Antibióticos

1. Introducción

El uso de antibióticos conforma una práctica habitual en la administración de fármacos antimicrobianos para evitar y/o tratar enfermedades comunes en los peces de piscifactoría, como la pasteurellosis o vibriosis. Las características de los 5 más usados se muestran a continuación:

- La oxitetraciclina es un compuesto perteneciente a la familia de las tetraciclinas, y está considerado por muchos autores como el antibiótico más usado en la industria (Sapkota, 2008). Es un antibiótico de amplio espectro útil para combatir infecciones causadas por bacterias gram positivas y gram negativas de acción bacteriostática (Pubchem, PubChem Compound Summary for CID 54675779, Oxytetracycline., 2021).
- El ácido oxolínico pertenece a la familia de las quinolonas, es el segundo antibiótico más usado en los países productores de acuicultura junto con el cloranfenicol (João Rosa S. L., 2018), en medicina veterinaria tiene un papel antibacteriano y antifúngico. Es un antibiótico más efectivo contra bacterias gram negativas (Pubchem, PubChem Compound Summary for CID 4628, Oxolinic acid., 2021).
- La flumequina es un antibiótico sintético, al igual que el ácido oxolínico, es efectivo contra bacterias gram negativas. Uso limitado para tratamiento de infecciones urinarias de humanos (Pubchem, PubChem Compound Summary for CID 3374, Flumequine, 2021). El ácido oxolínico y la flumequina suelen usarse principalmente contra infecciones causadas por *Piscirickettsia salmonis*, *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio* (Burrige, 2010). Aunque el uso de ambos antibióticos está permitido en Europa, están prohibidos en países como Estados Unidos, Escocia y Canadá.
- La sulfadiazina y la trimetoprima son compuestos frecuentemente usados en medicina veterinaria por su bajo coste y su amplio rango contra bacterias gram positivas y gram negativas. Estos antimicrobianos se usan también en acuicultura, aunque de forma menos frecuente (Sapkota, 2008).

Cabe destacar que la información con respecto al uso de antibióticos en la industria de la acuicultura es escasa e incompleta, muchas veces por las medidas de protección intracorporativas tomadas por las empresas del sector.

Los antibióticos pueden bioacumularse y perfundir hacia los tejidos tras la ingesta (Streit, 1998); por ello la legislación actual regula el límite de residuos que se pueden estar presentes en alimentos comercializables para mantener la salud de los consumidores. Las sustancias farmacológicamente activas fueron clasificadas en cuatro anexos del Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos –LMR- de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Para los peces el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces (Reglamento No 37/2010 de la comisión europea., 2009). Los límites máximos de los medicamentos veterinarios de interés en peces destinados a venta al público en este estudio se muestran a continuación -Tabla 1-.

Tabla 1. LMR según el reglamento de la Unión Europea de los antibióticos de interés para peces destinados a la producción de alimentos.

Antibióticos	Tejido diana	LMR
Ácido oxolínico	Músculo	100 µg/kg
Flumequina	Músculo y piel	600 µg/kg
Oxitetraciclina	Músculo	100 µg/kg
Trimetoprima	Músculo	50 µg/kg
Sustancias pertenecientes al grupo de las sulfonamidas.	Músculo	100 µg/kg

Después de la administración de los antibióticos, los individuos deben someterse a un periodo de “supresión” –también llamado ‘withdrawal period’ en inglés- en el cual la concentración de dichos compuestos en el músculo de los peces disminuye paulatinamente al biotransformarse en otros. Este periodo es vital para asegurar una seguridad alimentaria a la altura de estándares establecidos por la UE. Sin embargo, puede verse interrumpido por los fenómenos de escape, ocasionando que peces medicados se liberen de las jaulas.

El proyecto Gloria tiene en cuenta el papel de eventos climáticos extremos en la aparición de individuos escapados. Estos peces pueden ser capturados por flotas locales o pescadores independientes y llegar a los consumidores, suponiendo un gran problema a nivel económico – precios de ejemplares escapados a nivel de individuos salvajes- e, incluso sanitarios, dadas las condiciones idóneas. El uso de antibióticos para la producción animal conlleva riesgo de desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Mattar S, 2009). La tendencia generalizada del uso rutinario de los antibióticos en el alimento de los animales destinados para el consumo humano, ya sean mamíferos, aves o peces, ha contribuido a incrementar la transferencia de las bacterias resistentes a antibióticos a consumidores humanos (Ethel Cota-Rubio, 2014). Otros potenciales efectos que pueden generarse por el uso inadecuado de antibióticos son: toxicidad aguda, carcinogenicidad, efectos negativos en la fertilidad de los individuos y reacciones alérgicas en personas susceptibles (Barthon, 2000; Gehring R, 2006).

El abuso de antibióticos y una alta prevalencia en músculo de estos en individuos procedentes de granjas pueden dar lugar también a reacciones alérgicas. En personas susceptibles las reacciones de hipersensibilidad pueden presentarse de forma leve en forma de hormigueo, hinchazón en la garganta, fiebres o urticaria, pero en los casos más extremos pueden llegar a producir daños hepáticos o anafilaxia (Bacanli, 2019). Desafortunadamente, los efectos a largo plazo sobre la salud humana del consumo de antibióticos se desconocen en detalle e investigaciones más minuciosas deben llevarse a cabo para establecer un modelo de consecuencias plausible. Así pues, el presente apéndice del proyecto pretende estandarizar una metodología empleada en otros sectores de producción animal para la detección de los antibióticos más usados en granjas piscícolas.

2. Metodología

2.1 Compuestos objetivo.

El método llevado a cabo durante el proyecto está basado en el protocolo de Chico *et al* (2008), focalizado en el análisis de antibióticos en tejidos de animales de corral. El protocolo se ajustó en base al criterio del grupo de bioquímica de la Universidad de Alicante por la especificidad del objetivo. En este caso concreto se intentaron identificar cinco antibióticos de entre los más usados en la industria acuícola (Sapkota, 2008). A saber:

- Sulfadiazina (SDZ)
- Trimetoprima (TRI)
- Flumezina (FLU)
- Ácido Oxolínico (OXO)
- Oxitetraciclina (OTC)

Sim embargo la técnica es potencialmente aplicable a otros compuestos, llegado el caso de necesitarse ante un evento de escape impredecible de una instalación determinada que use compuestos distintos.

2.2 Obtención de muestras.

En el apartado 1 *Obtención de muestras* (pág. 13) se especifica la metodología utilizada para la extracción de muestras de músculo de peces. Todas las muestras de músculo que se almacenaron en un congelador a -20°C hasta el momento de uso. De los 377 ejemplares muestreados tan solo se pudieron analizar 150 debido a constricciones logísticas. De estos últimos 72 eran lubinas, 23 doradas y 55 corvinas.

2.3 Homogenización y extracción.

Como paso previo a empezar, se tomó el material biológico congelado o lo más frío posible para facilitar la manipulación del mismo. Se llenó una caja de de corcho con nitrógeno líquido hasta medio palmo -o, en su defecto, lo suficiente como para tocar la parte baja del cuenco de mortero a utilizar- asegurando que no hubiera ninguna fuga. Dentro se depositaron el mortero y la mano y se esperó hasta que el nitrógeno se estabilizara. Después de pesar el músculo en la balanza – se requirió un mínimo de 3 gramos para el proceso- se cortó en finas láminas para facilitar los siguientes pasos. Se depositó el músculo laminado en el mortero de 2 a 3 minutos hasta que el material tuvo la consistencia de cristal quebradizo. Después se procesó lo máximo posible con la mano del mortero y la ayuda de los guantes criogénicos. Se recolectó el material en un falcon. También se pudo recolectar el músculo molido con ayuda de una bomba de vacío, aunque en este caso se necesitaron tubos y tapones de falcon con agujeros individuales para cada muestra como fungibles extra. Con ayuda de una micropipeta se añadió 200 microlitros de EDTA 0.1 M al falcon. El EDTA actuó como quelante para secuestrar cationes de Calcio y Magnesio. Esto

mejoró el proceso de extracción dado que los antibióticos suelen unirse a estos dos elementos. Posteriormente se añadió 10 ml de la solución Metanol: H₂O (en proporción 70/30 en volumen) al falcon.

Se sometió a agitación en el vórtex durante 30 segundos para facilitar el mezclado y homogeneizado. La gradilla con los falcon se sometió a un tratamiento con ultrasonidos -15 minutos- para maximizar el contacto de todo el material con los agentes extractantes. Una vez finalizado el proceso el contenido de los falcon era capaz de distinguirse en distintas fases, con el antibiótico, de haberlo, en la fase líquida superior. Se extrajeron 2 ml de la misma y se depositaron en eppendrofs que se centrifugaron 5 minutos a 13000 revoluciones. Se extrajo 1 ml del extracto de cada muestra a un falcon de menor tamaño -comparado con los anteriores- y se añadieron 4 ml de agua ultrapura para evitar precipitados (al contrario de lo que pasó con la solución Metanol: Agua). Se filtraron las muestras con jeringas y filtros de 0,45 µm. El líquido filtrado se trasladó a viales de cristal preparados para el procedimiento del UHPLC-MS (o también *ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Finalmente, los viales se conservaron en frascos de orina etiquetados en un congelador a unos -20°C hasta que llegó el momento del análisis UHPLC-MS (en grupos de 15 muestras), asegurándose dentro del frasco con papel para evitar roturas.

2.4 Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC).

2.4.1 Recta de calibrado

Para el análisis de las muestras con UHPLC se utilizó la tecnología de triple cuadrupolo (nano-LC/MS-QQQ) que posee la capacidad de actuar como un filtro de masas para monitorizar selectivamente un ión molecular específico (modo SRM) y uno o varios de sus iones fragmento. El modelo utilizado fue un Agilent 1100 series Chip-HPLC en línea con un espectrómetro de triple cuadrupolo (HPLC-Chip/QQQ-6490).

Para poder cuantificar la cantidad de antibiótico en las muestras problema se decidió realizar una recta de calibrado. Para ello se realizó un banco de diluciones cuyo disolvente utilizado fue una mezcla de acetonitrilo:H₂O (25mL:75mL). En la primera dilución se añadieron 4,5mL de disolvente y 0,5mL de la muestra inicial de antibiótico (concentración de 1000 mg/L); la concentración resultante de esta dilución fue de 100mg/L. En la segunda dilución se añadieron 4mL de disolvente y 1mL de la disolución resultante de la primera dilución, la concentración resultante fue de 20mg/L. Después todas las disoluciones fueron filtradas antes de pasarlas a los viales para UPLC, se prepararon 4 viales para cada antibiótico con 0.1, 0.2, 0.5 y 1mL de la disolución resultante de la segunda dilución. A los tres primeros viales se añadió acetonitrilo hasta llegar a 1mL.

2.4.2 Análisis de muestras.

Se analizaron las muestras según el protocolo del artículo (J. Chico, 2008) con las siguientes modificaciones: (A) Se utilizó una fase móvil binaria con gradiente de elución; para la fase móvil A se usó una solución acuosa de ácido fórmico 0.2% y ácido oxálico 1mM y para la fase móvil B

una solución de acetonitrilo y ácido fórmico 0.1%. (B) La separación en la columna se realizó a 40°C con el siguiente programa de gradiente (tiempo en minutos, % fase móvil A): (0, 95), (1, 95), (5, 75), (8.5, 10), (9.5, 10), (10, 95) y (13, 95). La columna fue reequilibrada durante 3 minutos antes de cada vuelta. La tasa de flujo de la fase móvil fue 0.3mL/min⁻¹ y fueron depositadas en el espectrómetro de masas sin fragmentar, las muestras se mantuvieron en el inyector automático a 15°C. (C) La fuente de ionización por electro pulverización se hizo funcionar en el modo positivo en las siguientes condiciones de trabajo: Voltaje capilar de +3.5 kV, temperaturas de bloqueo y de-solvatación de la fuente de 120 y 400°C, respectivamente, tasa de flujo de gas de de-solvatación y nebulizador (N2) de 650 y 50 L h⁻¹, respectivamente, y presión de argón en la celda de colisión 4 × 10⁻³ mbar.

Los valores seleccionados de tiempo de permanencia, voltaje del cono y energía de colisión optimizados para cada compuesto se dan en la Tabla 2. Los espectros de barrido completo se obtuvieron en el modo de barrido MS en un rango variable de m / z, dependiendo de la masa molecular del analito, en un ciclo de tiempo de 500ms y un tiempo de interscan de 100 ms. La adquisición de datos para la cuantificación y confirmación se realizó en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM), dividiendo la adquisición de TIC en seis ventanas para lograr una mayor sensibilidad. Se siguieron dos transiciones para la identificación, pero solo se utilizó una para la cuantificación (Tabla 2).

Tabla 2. Fragmento de Tabla 2 (J. Chico, 2008) donde se muestran los tiempos de retención de los analitos de interés y los parámetros para la espectrometría de masas.

Antibiótico	Abreviación	t _R (min)	C.V. (V)	d. t.(ms)	Transición de cuantificación (C.E., eV)	Transición de confirmación (C.E., eV)
Sulfadiazina	SDZ	3.36	28	10	251.0 > 155.8 (15)	251.0 > 91.9 (27)
Trimetoprima	TRI	4.32	38	10	290.9 > 230.0 (25)	290.9 > 122.9 (30)
Oxitetraciclina	OTC	4.54	25	10	461.1 > 426.0 (20)	461.1 > 443.1 (13)
Flumequina	FLU	7.42	30	50	262.1 > 244.0 (20)	262.1 > 201.9 (30)
Ácido oxolínico	OXO	6.61	25	50	262.0 > 244.0 (20)	262.0 > 215.9 (30)

La identificación se realizó por tiempo de retención y la confirmación se realizó de acuerdo con los criterios de relación de iones de 2002/657 / CE. En suma, la técnica usó un sistema de triple cuadrupolo para seleccionar un peso determinado de la muestra y lo fraccionó para detectar el antibiótico -cada medicamento lo hace con un patrón característico-.

3. Resultados.

De los 150 individuos analizados durante todo el proceso, solo 3 de ellos -dos doradas (Figuras 3 y 4) y una lubina (Figura 5)- emitieron una señal de antibióticos detectable, conformando el

2% del total de muestras analizadas. Los niveles de antibióticos detectados de los tres individuos nunca sobrepasaron los límites máximos de residuos /LMR establecidos por la UE.

Las rectas de calibrado de los antibióticos detectados se muestran a continuación:

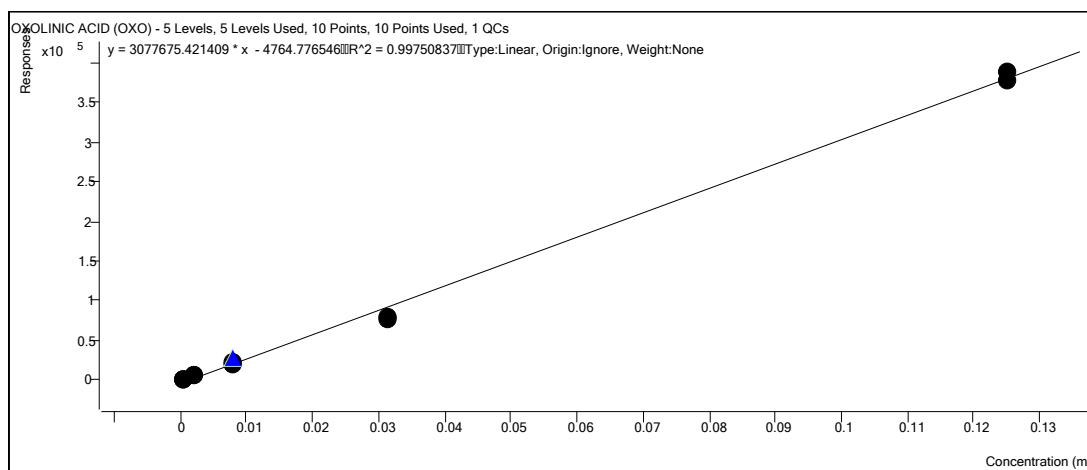


Figura 1: Recta de calibrado del ácido oxolínico elaborado con cinco datos distintos de concentración.

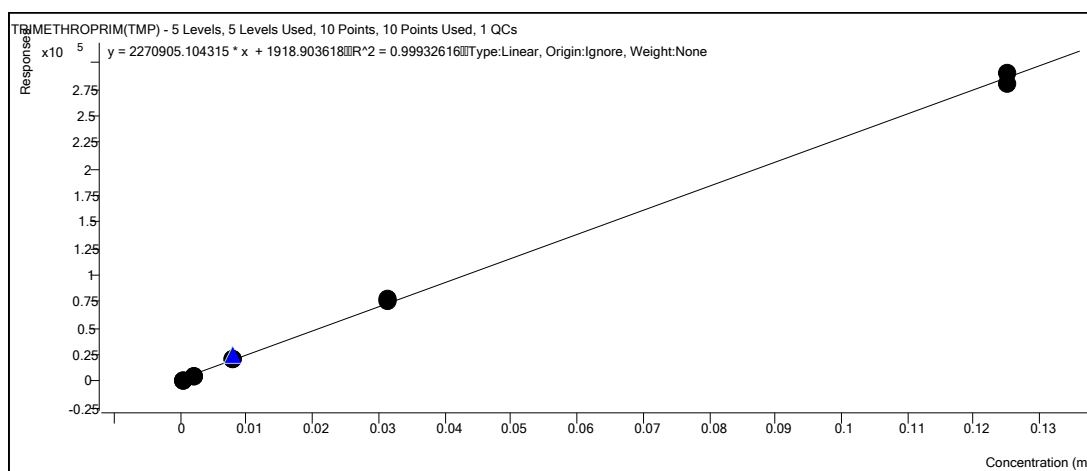


Figura 2: Recta de calibrado de la trimetoprima elaborado con cinco datos distintos de concentración.

Los picos de antibióticos detectados en las dos doradas y la lubina se muestran a continuación:

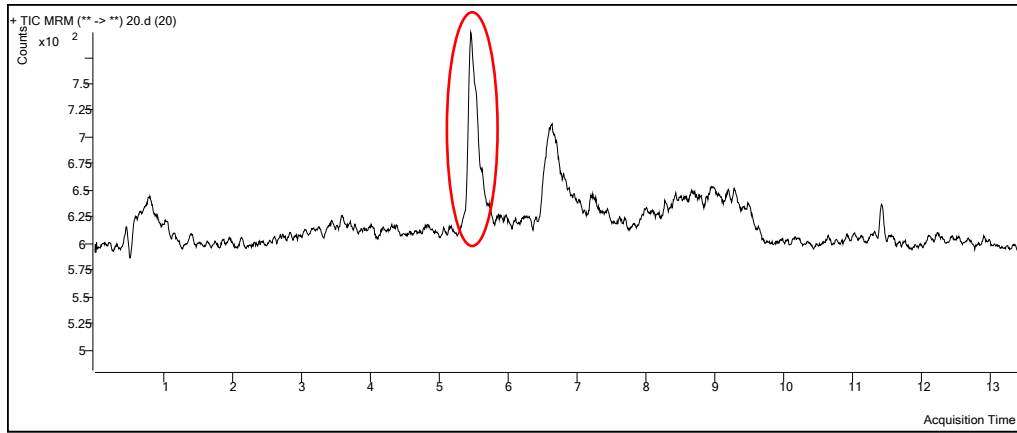


Figura 3: Medida de los picos de concentración de antibióticos del individuo SA005-E resultado del UHPLC. El individuo fue capturado el 15 de Febrero de 2020. El pico del ácido oxolínico está resaltado en un óvalo rojo.

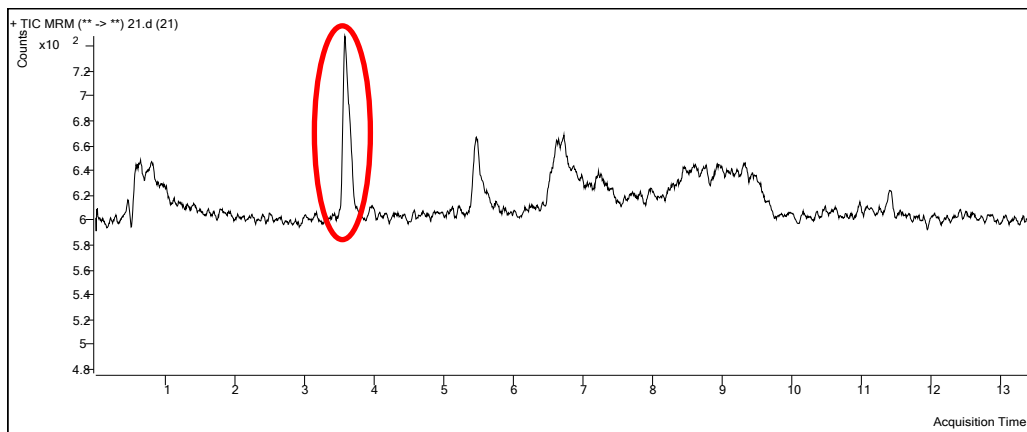


Figura 4: Medida de los picos de concentración de antibióticos del individuo SA004-E resultado del UHPLC. El individuo fue capturado el 4 de Febrero de 2020. El pico de trimetoprima está resaltado en un óvalo rojo.

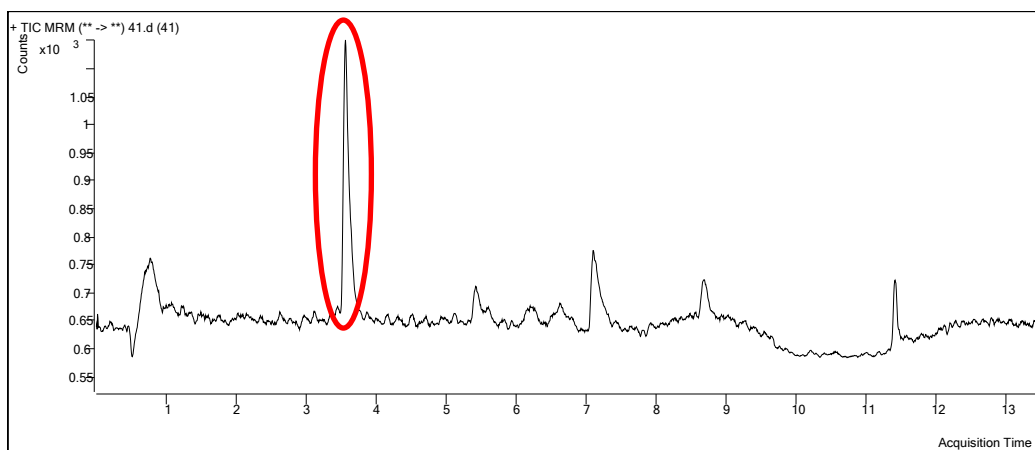


Figura 5: Medida de los picos de concentración de antibióticos del individuo DL128-S resultado del UHPLC. El individuo fue capturado el 3 de Junio de 2021. El pico de trimetoprima está resaltado en un rojo.

4. Significado de los resultados.

A pesar de que solo el 2% de las muestras analizadas emitiera una señal detectable, es necesario poner en perspectiva esta información. En un cardumen con cientos de miles de individuos ese porcentaje se traduciría en miles de individuos afectados. Sin embargo esas conclusiones son demasiado severas para extraer de los resultados del presente estudio. El hecho de que se detectaran antibióticos en ejemplares cercanos en el tiempo a un gran evento de escape y más de un año después del mismo pone de manifiesto la capacidad de la actividad acuícola para afectar a individuos, ya sean parte de su cadena comercial o no, por medio de escapes masivos o por goteo, además de la posible filtración de alimento enriquecido en medicamentos al medio susceptible de ser ingeridos por fauna autóctona o escapada. Finalmente, el método pone de manifiesto su capacidad para detectar concentraciones bajas de un mismo antibiótico en distintas especies de modo satisfactorio.

5. Limitaciones técnicas y sugerencias para el futuro.

El tamaño de muestra inicial de 150 individuos era reducido *per se*. Es necesario ampliar los análisis con un tamaño muestral mayor para establecer unas conclusiones con un nivel de validez más robusto. Es necesario un análisis de riesgo antes de abrir la posibilidad a emitir siquiera una emergencia alimentaria que pueda paralizar la comercialización de una especie a nivel nacional. Como dato adicional, el presente estudio solo se centró en los 5 antibióticos más usados a nivel comercial en la actividad acuícola. Se desconocen datos sobre posibles antibióticos administrados en cascada y dado que el método de detección es capaz de aplicarse a otros posibles medicamentos, se podría llenar este vacío de conocimiento. Es necesario obtener datos reales de la agencia nacional del medicamento y los propios acuicultores. En este último caso se necesitaría una cooperación más estrecha entre investigadores y productores para establecer de forma satisfactoria el número, naturaleza y procedencia de los medicamentos usados.

Referencias.

Burridge, L. W. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306, 7–23.

J. Chico, A. R. (2008). High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1213, Issue 2, Pages 189-199.

João Rosa, S. L. (2018). Evaluation of antimicrobials residues in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) after administration through medicated feed,. *Food Control*, Volume 86, 110-116.



GLORiA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840

Mattar S, C. A. (2009). Detección de antibióticos en leche un problema en salud pública. Revista Salud Pública., 11(4):579-590.

Sapkota, A. S. (2008). Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. Environmental International, 34,1215-1226.

Streit, B. (1998). Bioaccumulation of contaminants in fish. In: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B. (eds). . Fish Ecotoxicology, vol 86. Birkhäuser, Basel.

Análisis Adaptación al Medio

1. Procesado de las muestras

Procesado de individuos de las tres especies objetivo.

A cada individuo adquirido de productores locales, lonjas o pescadores se le aplicó el mismo procedimiento estandarizado para sacar el máximo partido de las muestras.

>Registro y etiquetado

El registro y etiquetado de las muestras se debe realizó de manera exhaustiva durante todo el análisis. Cada muestra tomada tuvo su recipiente contenedor etiquetado externa e internamente con un código identificativo. Ejemplo:

ES001-O-010120-M-#

ES: especie, se usaron las iniciales del nombre de la especie (SA para *Sparus aurata*, DL para *Dicentrarchus labrax*, AR para *Argyrosomus regius*). Tras las iniciales siguió el número de individuo en cifras correlativas.

O: origen; si el individuo era salvaje (S), cultivado (C) o escapado (E).

Fecha: en formato día/mes/año sin separadores.

M: muestra, esta parte de la etiqueta se añadió a las diferentes muestras que se obtuvieron para evitar confusión, sobre todo en bolsas de plástico -escamas y otolitos en recipientes propios: hígado (H), músculo (M), gónada (G). Algunas de estas muestras se usarán para futuras ediciones del proyecto.

#: Finalmente, se añadió un número en caso de que se obtuvieran una de las muestras con varias réplicas para distintos análisis (por ejemplo, músculo o hígado).

> Descongelación

El proceso de descongelación fue uno de los aspectos clave a la hora de manipular las muestras ya que una incompleta descongelación podría haber acarreado deterioros en las mismas. Para ello, los ejemplares se sacaron 1 día antes de su análisis, siempre y cuando el tiempo fuera suficiente para que el proceso se completara. Estos se colocaron en bandejas previamente etiquetadas con su código alfanumérico correspondiente y se dejaron durante aproximadamente 24h en el refrigerador (o fuera, dependiendo de la especie y la temperatura externa) para conseguir una descongelación lenta y progresiva.

En ningún caso se utilizó agua para acelerar el proceso ya que eso hubiera supuesto pérdidas de información y el deterioro de los ejemplares. Tampoco se volvió a congelar aquellos ejemplares cuyo estudio fuera incompleto por lo que se descongelaron sólo las muestras a trabajar en el día establecido.

→ Fase 1: Biometría y Morfometría



GLORiA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840

Antes de realizar algún tipo de toma de muestras, se realizaron estudios biométricos y morfométricos mediante fotografía y visualización in-situ. En primer lugar se pesó cada uno de los ejemplares y a continuación se colocaron en una tablilla, con diferentes patrones de colores y escalas con el flanco izquierdo al descubierto y con todas las aletas desplegadas para la toma de foto y medición. Para ello se usaron alfileres de entomología y cuñas, que permitieron mantener una posición estática durante todo el análisis, no sólo asegurando las características de posición, iluminación y enfoque de la cámara sino también la de la muestra. Posteriormente, las mediciones que se tomaron con ayuda de un ictiómetro fueron (Figura 5): longitud estándar (LE), longitud furcal (LF) y longitud total (LT), entendidas estas por Elosegi y Sabater, 2009 como:

- Longitud estándar (LE, cm): distancia entre el rostro y el hueso hipural o zona donde nacen los radios de la aleta caudal.
- Longitud furcal (LF, cm): distancia desde el rostro hasta la escotadura de los lóbulos de la aleta caudal.
- Longitud total (LT, cm): distancia entre el rostro y la proyección de ambos lóbulos de la aleta caudal plegado.

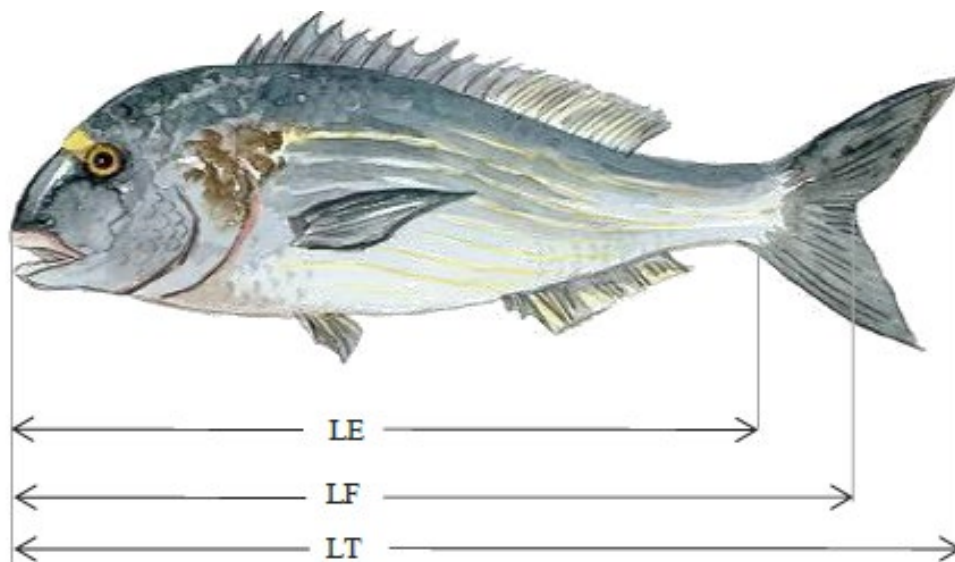


Figura 5: Medidas de longitud comunes en un pez: estándar (LE), furcal (LF) y total (LT).

-Estado general y extracción de parásitos externos.

Se evaluó el estado general del pez detectando cualquier indicador de enfermedades: presencia de úlceras, hemorragias, heridas externas, deformidades aparentes, presencia de parásitos externos en piel o en el interior de la boca, etc. Se examinó con detenimiento el ejemplar gracias a la ayuda de la lupa y cuando se detectó presencia de parásitos, estos se extrajeron con las pinzas, se etiquetaron y almacenaron para su posterior identificación.



Figura 6: Ejemplo del parásito *Cymothoa exigua* en cavidad bucal de lubina.

→ Fase 2: Muestreo de escamas, material genético y procesado de gónadas.

-Escamas

Para el estudio de las escamas se extrajeron, al menos 20 muestras de cada una de las zonas a analizar (Figura 7), es decir, de las zonas anterior dorsolateral izquierda e interior de la aleta pectoral. Una vez extraídas, estas se guardaron en dos sobres diferentes con su etiquetado correspondiente para futuros análisis.

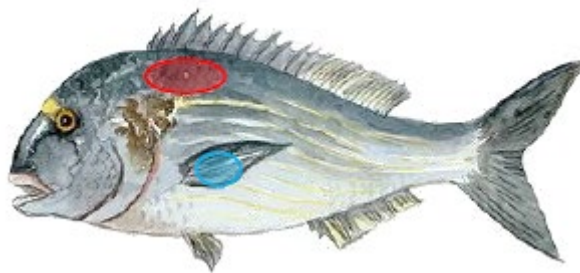


Figura 7: Zonas de análisis. Roja: Zona anterior dorsolateral izquierda. Azul: Zona interior de la aleta pectoral.

-Genética

Para el análisis genético se extrajo una muestra de la aleta pectoral y se almacenaron en un eppendorf con alcohol al 70% con su etiquetado correspondiente.

-Gónadas

En primer lugar se sexaron los ejemplares y se determinó el grado de maduración gonadal teniendo en cuenta la escala de la FAO, es decir, tomando como referencia el color y la forma de las gónadas (<http://www.fao.org/3/f0752s/F0752S05.htm>).

A continuación, se tomaron 4 muestras y a una de ellas se añadió histofix como fijador conservante. Las muestras se etiquetaron y se congelaron para su posterior análisis.

→ Fase 3. Extracción de muestras de Hígado y Contenido Estomacal.

- Hígado

Se procedió al pesaje del hígado y subdivisión de la biomasa en 3 partes para preservar en bolsas de plástico en un arcón congelador para posteriores análisis.

-Estómago e intestino

Para la extracción del tracto intestinal y estómago. Corte longitudinal del estómago para posterior preservación del contenido en un bote con Alcohol. Se exprimió con pinzas en el mismo recipiente todo el tracto intestinal. Se conservó con Etanol al 70%. Posteriormente, se realizó un corte longitudinal del intestino y demás apéndices digestivos. Se aseguró que todos los ciegos y recovecos estuvieran abiertos para mejorar el procedimiento siguiente.

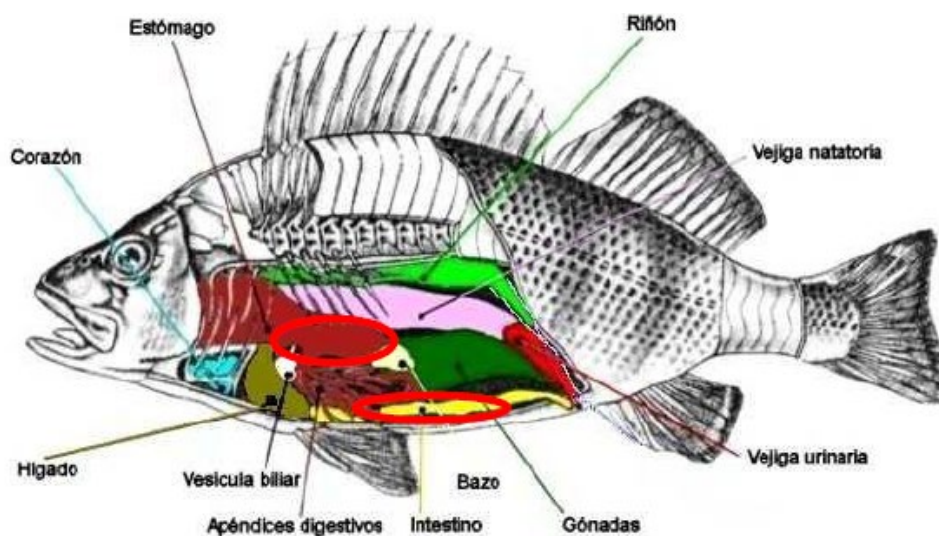


Figura 8: Fisonomía Interna de un pez Osteictio. Los círculos indican estómago e intestino, respectivamente. http://fresno.pntic.mec.es/msap0005/1eso/T12-vertebrados/tema_12.htm.

→ Fase 4. Pesaje, músculo, otolitos y mandíbula.

-Segundo pesaje

Se obtuvo el peso del individuo eviscerado.

-Músculo

Se extrajeron 3 muestras de tejido muscular dorsal y se preservaron en bolsas plásticas etiquetadas. Con bisturí/cuchillo se procedió a realizar incisiones en la zona anterior dorsolateral de donde se sacaron las escamas para extraer 3 secciones de músculo sin piel. En caso de ser un pez pequeño se tuvo que utilizar también el lado derecho del mismo. Se trató de evitar la presencia de espinas en la muestra en la medida de lo posible.



GLORiA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840



Figura 9: Focalización de la zona de extracción del músculo de los individuos a analizar. En este caso sobre un ejemplar de corvina (*A. regius*).

-Otolitos:

Los otolitos son estructuras alojadas en las cavidades auditivas de los peces, concretamente en el oído medio, que les permiten mantener el equilibrio y les brindan información acerca de la dirección y la velocidad a la que está nadando. Están constituidas por carbonato cálcico que a lo largo del tiempo se va depositando sobre una matriz de proteínas. Como se encuentran en estado embrionario, crecen y se desarrollan de manera conjunta con el pez, circunstancia que los convierte en un elemento con valiosa información sobre los eventos por los que ha pasado el ejemplar.

Para obtener los otolitos se tuvieron en cuenta la dureza de cada especie en particular a la hora de aplicar más o menos presión en el primer corte. Éste se realizó en un ángulo diagonal descendente de 45 ° en relación a un vector recto que atravesaría dorsoventralmente al individuo. El corte se abrió haciendo palanca con el cuchillo hasta dejar a la vista a los otolitos. Se extrajeron con unas pinzas y se lavaron en agua destilada antes de guardarlos secos en eppendorf/ botes con etiquetas para su posterior análisis.



Figura 10: Línea de corte para la extracción de otolitos.

-Cabeza:

La mandíbula puede proporcionar información sobre el hábito alimenticio de un ejemplar en particular. Para obtenerla, se seccionó la cabeza o, en su defecto, el área mandibular para su posterior conservación en bolsas guardadas en el arcón. Estas estuvieron destinadas para futuras ediciones del proyecto.

2. Biometría y Morfometría

Material y Métodos

Digitalización de las muestras

Cada pez fue colocado sobre una superficie blanca de poliestireno apoyada en una mesa horizontal, sobre la que se colocó una cámara fotográfica (modelo), con la ayuda de un trípode, completamente ortogonal a la superficie de poliestireno y a un metro de distancia. Para su digitalización (captura en fotografía), cada pez se orientó con su izquierdo hacia la cámara, con las aletas extendidas con alfileres y con la cabeza situada en el lado izquierdo de la imagen. Las fotografías se tomaron con una distancia focal de 50mm para evitar distorsiones de barril y/o cojín. Todo el proceso de digitalización fue llevado a cabo por la misma persona para evitar la variabilidad debida a múltiples manipuladores. En la foto, se colocó una regla y una escala de colores para el calibrado de blancos. A posteriori, las longitudes estándar de cada individuo se calcularon mediante el programa ImageJ (Abràmoff et al., 2004). Diferentes estructuras anatómicas características (landmarks) fueron identificadas sobre la superficie de los peces para capturar su forma. Concretamente 18 landmarks para la dorada (*S. aurata*) y 19 para la lubina (*D. labrax*) fueron identificadas y muestreadas sobre la superficie de cada pez mediante los programas TpsUtil (Rohlf, 2000) y TpsDig 2 (Rohlf, 2001).

Análisis morfométricos y estadísticos

La morfometría geométrica es una técnica utilizada para identificar las variaciones en la forma de los objetos de estudio, ya sea en dos o tres dimensiones (Bookstein 1991). En primer lugar, se aplica la superimposición de Procrustes (Hurley & Cattell, 1962), que busca la superposición más perfecta de cada forma analizada sobre la forma media de todas las analizadas. Dicho proceso elimina la variabilidad debida a la posición, escala y orientación. En primer lugar y para eliminar el efecto de la posición, se calculó el centroide (centro de gravedad cuya localización se obtiene calculando la media de las coordenadas x e y) y se superponen todas las formas sobre sus centroides. En segundo lugar y para eliminar el efecto de la escala, se calculó el tamaño del centroide y se normalizó ($C = 1$). El tamaño del centroide equivale a la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado entre cada landmark y dicho centroide. En último lugar, para eliminar el efecto de la orientación se determinó entre todas las rotaciones posibles, la que proporcione una menor suma de distancias al cuadrado entre cada grupo de landmarks y el landmark correspondiente de una forma objetivo (elegida de entre todas las formas analizadas; distancias Procrustes). Finalmente, se obtiene la forma media normalizada ($C = 1$), identificando la posición media x_m e y_m de cada grupo de landmarks mediante el cálculo de la media de sus coordenadas x e y, respectivamente. Aunque la superimposición de Procrustes elimina el efecto de la escala, orientación y posición del objeto de estudio en la foto, la variabilidad en la forma de los individuos debida a la talla (alometría) se conserva. Para calcular la magnitud de la alometría se utilizó una regresión multivariante entre las distancias Procrustes y el tamaño de los centroides (10000 iteraciones). Visualmente, mediante la regresión de las distancias Procrustes sobre el logaritmo de los valores de los tamaños de los centroides se determinó si el efecto de la alometría era equivalente en todos los grupos de peces estudiados. Para determinar

si existían diferencias alométricas entre los grupos analizados de peces, se realizó un análisis de la varianza de las distancias Procrustes (Procrustes ANOVA). Para visualizar la disposición espacial de los peces analizados en base a su forma, se realizó un análisis multivariante de componentes canónicos (CVA; 10000 iteraciones del test de permutación por pares). Dicho análisis permite identificar visualmente qué características morfológicas generan diferencias en la forma según el origen de los peces analizados. El factor de escala sobre las variables canónicas se multiplicó por 2 para que las diferencias de la forma de los peces de los diferentes grupos fuera más patente. Para evaluar el éxito de asignación de cada pez a su grupo de origen, se llevó a cabo un análisis discriminante Jackknife en el programa PAST 4.07b (Hammer et al. 2001), usando las distancias. El resto de análisis morfométricos expuestos anteriormente fueron realizados con el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Resultados

Dorada (*S. aurata*)

Un total de 146 peces fueron analizados; 27 control, 28 escapados y 91 salvajes. Sobre cada pez, un total de 18 landmarks fueron identificados para determinar su forma (Figura 1).

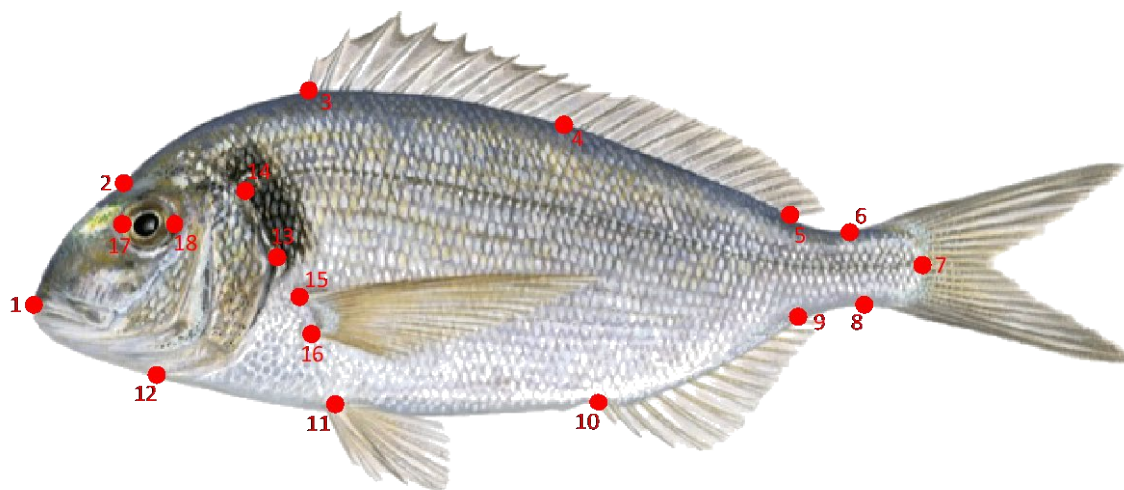


Figura 11. Landmarks situados sobre el flanco izquierdo de un ejemplar de dorada (*Sparus aurata*). 1) extremo anterior de la mandibular superior; 2) punto sobre el contorno de la cabeza alineado verticalmente con el extremo anterior de la órbita ocular; 3) inserción anterior de la aleta dorsal; 4) inserción del último de los radios espinosos de la aleta dorsal; 5) inserción posterior de la aleta dorsal; 6) punto dorsal más deprimido sobre el pedúnculo caudal; 7) intersección entre el punto más posterior del cuerpo alineado con la línea lateral; 8) punto ventral más deprimido sobre el pedúnculo caudal; 9) inserción anterior de la aleta anal; 10) inserción anterior de la aleta anal; 11) inserción de la aleta pélvica; 12) intersección del borde del opérculo y el contorno del pez; 13) punto más posterior del opérculo; 14) punto más anterior de la línea lateral; 15) inserción dorsal de la aleta pectoral; 16) inserción ventral de la aleta pectoral; 17) punto más anterior de la órbita ocular; 18) punto más posterior de la órbita ocular.



Se encontraron diferencias significativas en la forma de los peces analizados en base al origen de los mismos (i.e. control, escapados o salvajes; Tabla 3; p-valores intergrupos < 0.001). La variación debida a la talla, aunque significativa, fue de tan sólo un 3.86%. Sin embargo, dato el pequeño porcentaje y como las tendencias de las regresiones intra-grupos mostraron que la variación de la forma en cada uno de los grupos tenía el mismo comportamiento (Figura 12), dicha variación no fue tomada en cuenta.

Tabla 3. Resumen del análisis de la varianza ANOVA de las distancias Procrustes para la especie dorada (*S. aurata*).

Shape	Procrustes ANOVA:						
Effect	SS	MS	df	F	P(param.)	Pillai tr.	P(param.)
Individual	0.03039339	0.00047490	64	12.37	<.0001	1.21	<.0001
Residual	0.17573738	0.00003840	4576				

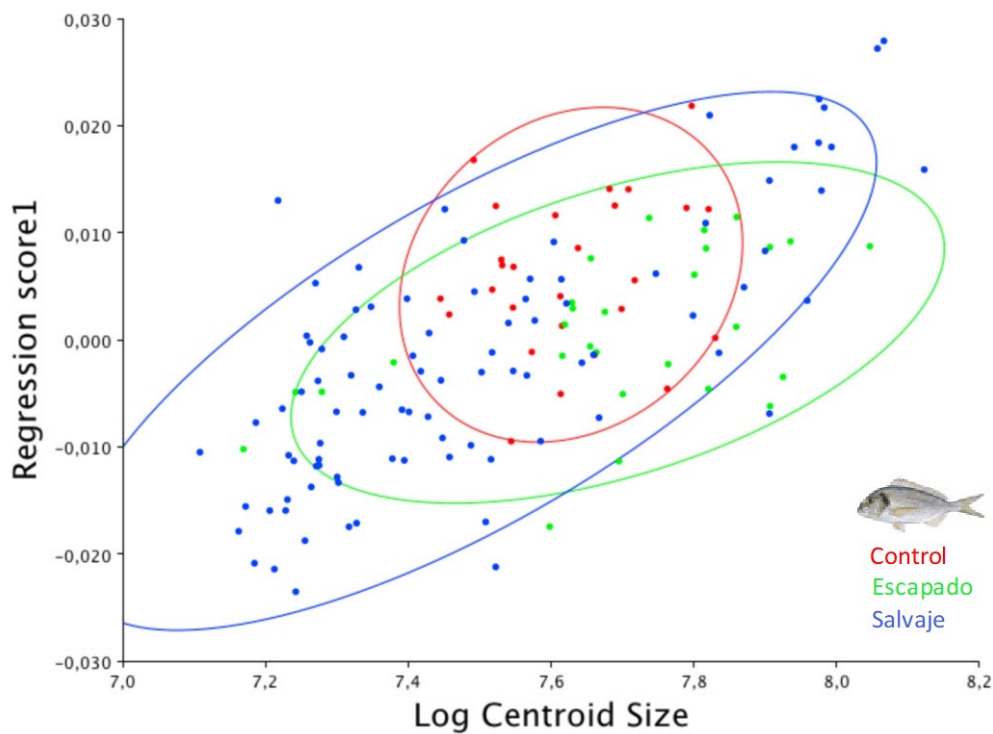


Figura 12. Diagrama de puntos representando la regresión entre las distancias Procrustes de las doradas (*S. aurata*) analizadas y sus respectivas tallas de los centroides transformadas a logaritmos. Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul.

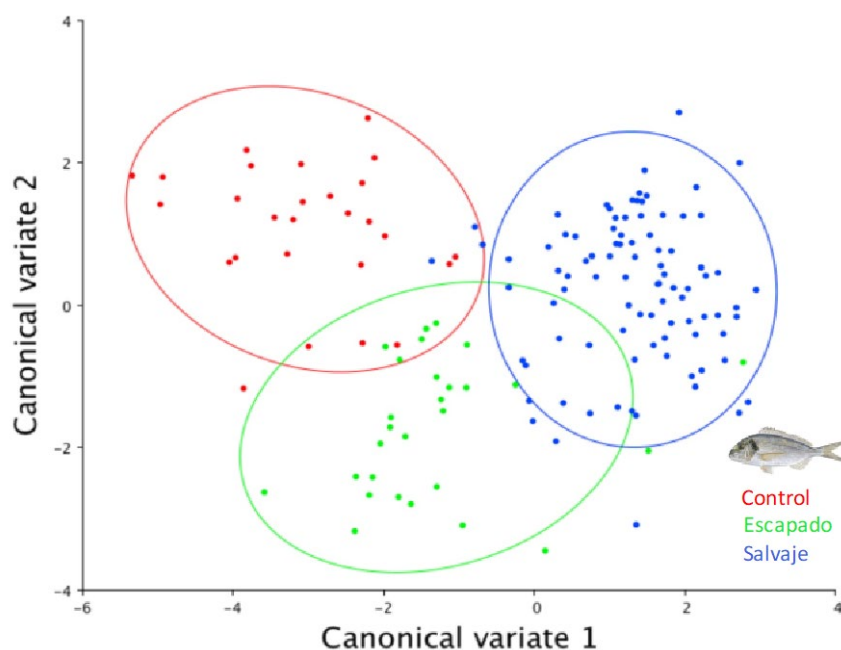


Figura 13. Diagrama de puntos del análisis multivariante de variables canónicas (CVA) de las distancias Procrustes de las doradas (*S. aurata*) analizadas. Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul.

En cuanto al análisis de variables canónicas, el eje 1 (Axis 1, Tabla 4) agrega el 79.45% de la variabilidad de la forma de los peces analizados, mientras que el eje 2 (Axis 2, Tabla 4) agrega el 20.55% de la misma. En concreto, la variable canónica 1 (CV1; Eje abscisas; Figura 14) agrega i) la variabilidad de la posición de la boca y ii) la altura corporal de los individuos (distancia dorsoventral). Sobre dicho eje de abscisas, los peces de mayor altura y boca orientada dorsalmente están representados por valores negativos (ej. -2), mientras que los peces más deprimidos ventralmente (véase el landmark 11 sobre la figura 11) y la boca orientada ventralmente, están representados por los valores positivos del CV1 (Figura 14). El CV2 agrupó mayormente la variabilidad debida a la altura de la parte dorsoposterior de los peces y, aunque en menor medida que el CV1, una parte de la variabilidad debida a la orientación de la boca.

Tabla 4. Distribución de la variabilidad entre los diferentes ejes del análisis de variables canónicas.

		Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
Axis	1	3.1747	79.45	79.45
	2	0.8211	20.55	100

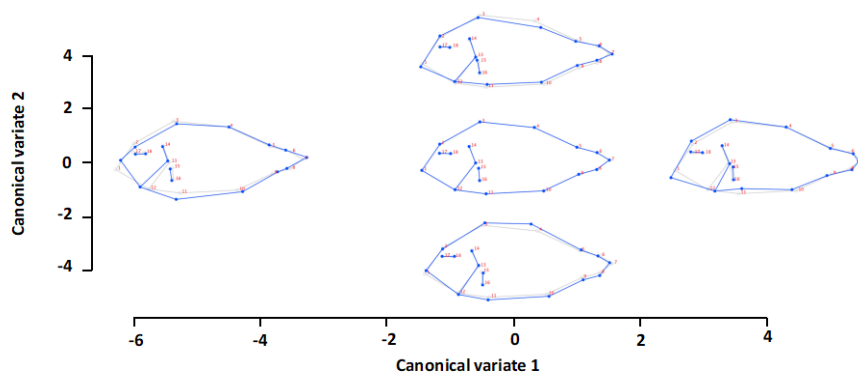


Figura 14 Representación de los principales morfotipos de dorada sobre la variable canónica 1 (CV1; Eje abscisas) y la variable canónica 2 (CV2; Eje ordenadas). El factor de escala se multiplicó por 2 para que las diferencias de la forma de los peces de los diferentes grupos fuera más patente. La línea azul clara representa la forma media (forma de referencia) de los individuos analizados y la azul oscura representa la forma de los peces con los valores de CVs correspondientes a su posición en el gráfico.

El análisis discriminante Jackknife clasificó correctamente un 78.08% de las doradas (*S. aurata*; Figura 15; Tabla 5). Sin tener en cuenta el éxito de asignación a los grupos correctos, todos los gradientes de individuos tanto bien como mal clasificados de los diferentes grupos fueron coherentes en base al origen de los peces. Del grupo control, un total de 7 doradas fueron clasificadas como escapadas y dos como salvajes. Del grupo escapados, un total de 6 doradas fueron clasificadas como control y cuatro como salvajes, mientras que, del grupo salvajes, ocho fueron clasificadas como escapadas y cinco como salvajes. El eje que mejor clasifica los peces según su origen es el uno, que coincide con el CV1 del análisis de variables canónicas (Figura 13)

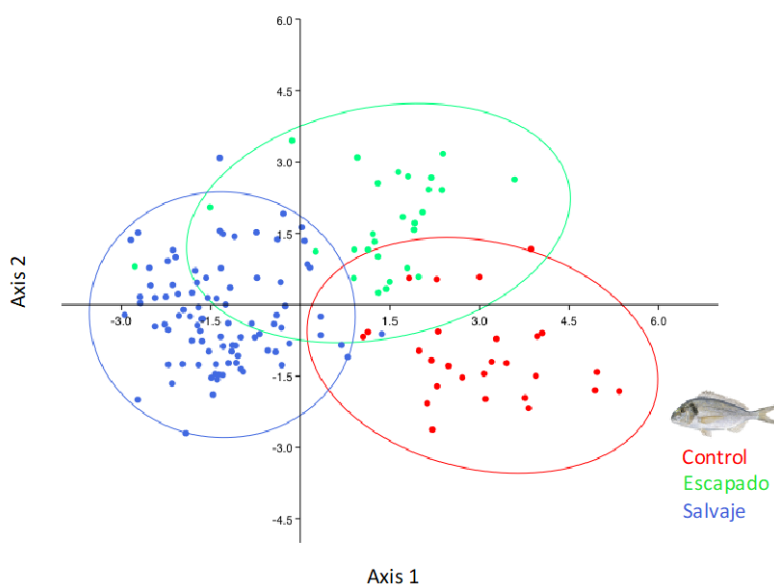


Figura 15. Diagrama de puntos correspondiente al análisis discriminante de los individuos de dorada (*S.aurata*) analizados en este estudio. Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul.

Tabla 5. Matriz de confusión del análisis discriminante para las doradas (*S. aurata*) analizadas.

	Control	Escapados	Salvajes	Total
Control	18	7	2	27
Escapados	6	18	4	28
Salvajes	5	8	78	91
Total	29	33	84	146

Lubina (*D. labrax*).

Un total de 148 peces fueron analizados; 27 control, 87 escapados y 33 salvajes. Sobre cada pez, un total de 20 landmarks fueron identificados para determinar su forma (Figura 16).

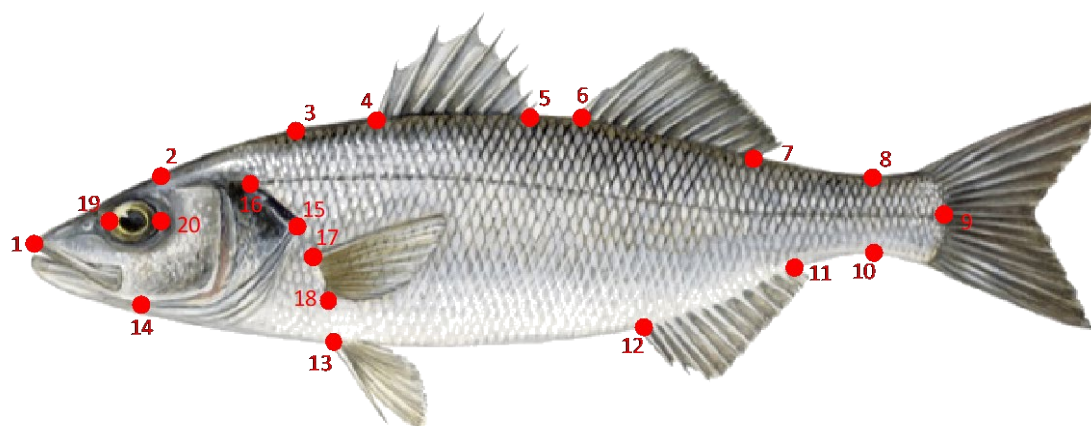


Figura 16. Landmarks situados sobre el flanco izquierdo de un ejemplar de lubina (*D. labrax*). 1) extremo anterior de la mandibular superior; 2) punto sobre el contorno de la cabeza alineado verticalmente con el extremo posterior de la órbita ocular; 3) punto sobre el contorno del dorso del pez alineado verticalmente con el punto más posterior del opérculo; 4) inserción anterior de la primera aleta dorsal; 5) inserción posterior de la primera aleta dorsal; 6) inserción anterior de la segunda aleta dorsal; 7) inserción posterior de la segunda aleta dorsal; 8) punto dorsal más deprimido sobre el pedúnculo caudal; 9) intersección entre el punto más posterior del cuerpo alineado con la línea lateral; 10) punto ventral más deprimido sobre el pedúnculo caudal; 11) inserción anterior de la aleta anal; 12) inserción anterior de la aleta anal; 13) inserción de la aleta pélvica; 14) intersección del borde del opérculo y el contorno del pez; 15) punto más posterior del opérculo; 16) punto más anterior del opérculo; 17) inserción dorsal de la aleta pectoral; 18) inserción ventral de la aleta pectoral; 19) punto más anterior de la órbita ocular; 20) punto más posterior de la órbita ocular.

La variación en la forma de los peces en base a su origen debida a la talla fue de un 5.75% y resultó significativa (Tabla 6). Se detectaron diferencias significativas entre los grupos Escapados y Control (p -valor = 0.0015) y Escapados y Salvajes (p -valor = 0.0169), pero no entre los grupos

Control y Escapados (p -valor = 0.145). Como las tendencias de las regresiones intra-grupos mostraron que la variación de la forma en cada uno de los grupos tenía el mismo comportamiento, dicha variación no fue tomada en cuenta.

Tabla 6. Resumen del Modelo ANOVA de las distancias Procrustes para la especie lubina (*D. labrax*).

Shape	Procrustes ANOVA:						
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0.01084801	0.00015067	72	2.87	<.0001	0.77	0.0001
Residual	0.2745016	0.00005259	5220				

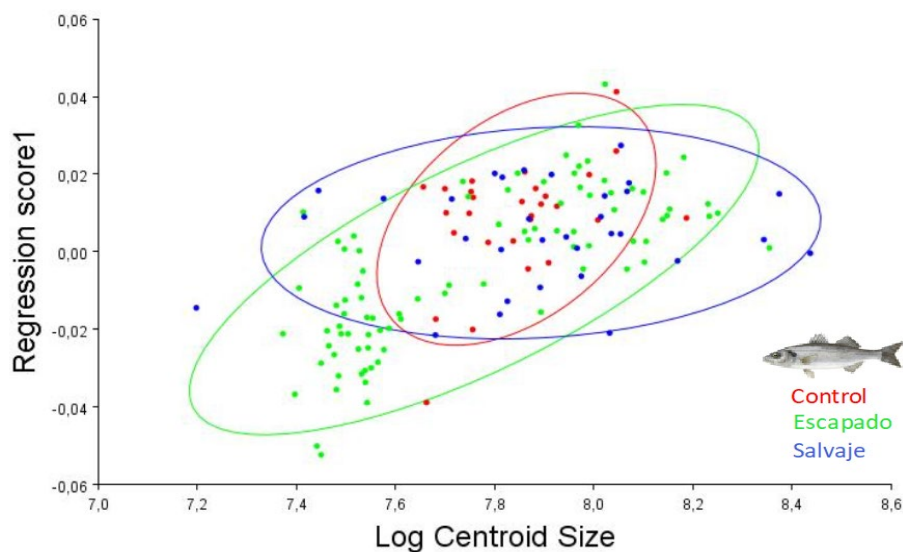


Figura 17. Diagrama de puntos representando la regresión entre las distancias Procrustes de las lubinas (*D. labrax*) analizadas y sus respectivas tallas de los centroides (logaritmos). Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul.

En cuanto al análisis de variables canónicas, el eje 1 (Axis 1, Tabla 7) agrega el 62.78% de la variabilidad de la forma de los peces analizados, mientras que el eje 2 (Axis 2, Tabla 7) agrega el 37.22% de la misma. En concreto, la variable canónica 1 (CV1; Eje abscisas; Figuras 18 y 19) agrega i) la variabilidad de la posición de la boca y ii) la longitud de la cabeza de los individuos. Sobre dicho eje de abscisas, los peces de mayor longitud cefálica y boca orientada dorsalmente fueron representados por valores negativos (ej. -2), mientras que los peces con la cabeza más corta y la boca alineada con el eje anteroposterior, estuvieron representados por los valores positivos del CV1 (Figura 13). El CV2 representó la variabilidad debida a la orientación de la boca, cuyos valores positivos representaban una ligera orientación más dorsal de la boca y los negativos una orientación de la misma más ventral.

Tabla 7. Distribución de la variabilidad entre los diferentes ejes del análisis de variables canónicas.

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
Axis 1	0.815	62.78	62.78
Axis 2	0.483	37.22	100

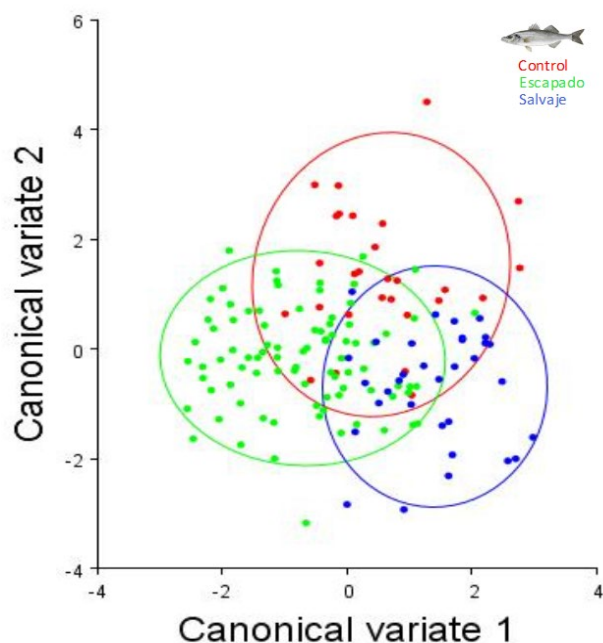


Figura 18. Representación del análisis multivariante de variables canónicas (CVA) de las distancias Procrustes (matriz de covarianzas) de las lubinas (*D. labrax*) analizadas. Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul.

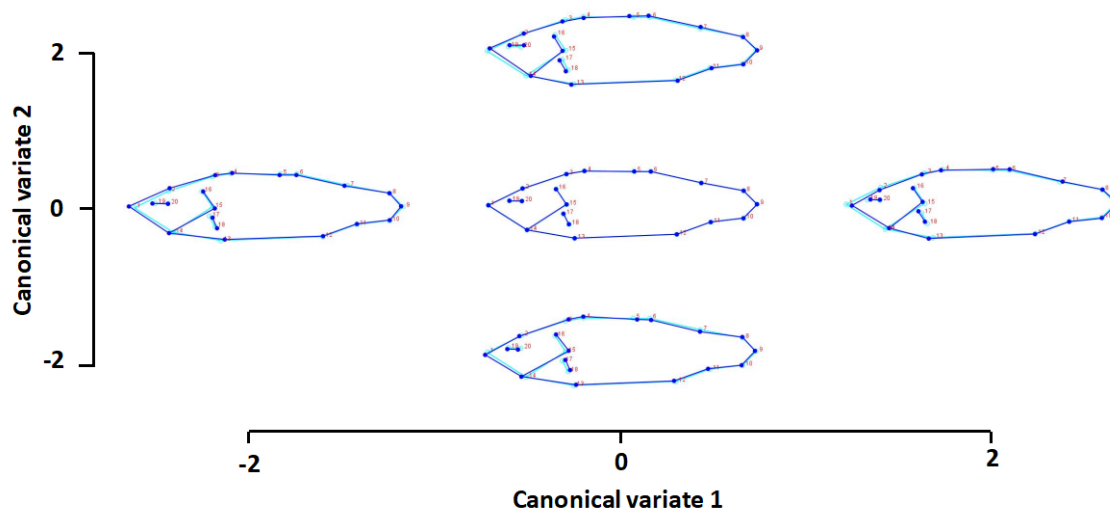


Figura 19 Representación de los principales morfotipos de lubina (*D. labrax*) sobre la variable canónica 1 (CV1; Eje abscisas) y la variable canónica 2 (CV2; Eje ordenadas). El factor de escala se multiplicó por 2 para que las diferencias de la forma de los peces de los diferentes grupos fuera más patente. La línea azul clara representa la forma media (forma de referencia) de los individuos analizados y la azul oscura representa la forma de los peces con los valores de CVs correspondientes a su posición en el gráfico.

El análisis discriminante Jackknife clasificó correctamente un 47.97% de las lubinas (*D. labrax*; Figura 20; Tabla 8). Del grupo control solo ocho lubinas fueron bien clasificadas, mientras que de entre las mal clasificadas, un total de 14 lubinas (50%) fueron clasificadas como escapadas y seis (20%) como salvajes. Del grupo escapados, un total de 48 lubinas fueron bien clasificadas, mientras que 22 (20%) fueron mal clasificadas como salvajes y 17 como control. De entre los 33 peces salvajes analizados, 15 fueron bien clasificados, mientras que 12 (35%) fueron clasificados como control y seis como escapadas. El eje que mejor clasifica los individuos es el dos, que coincide con el CV2 del análisis de variables canónicas (Figura 18).

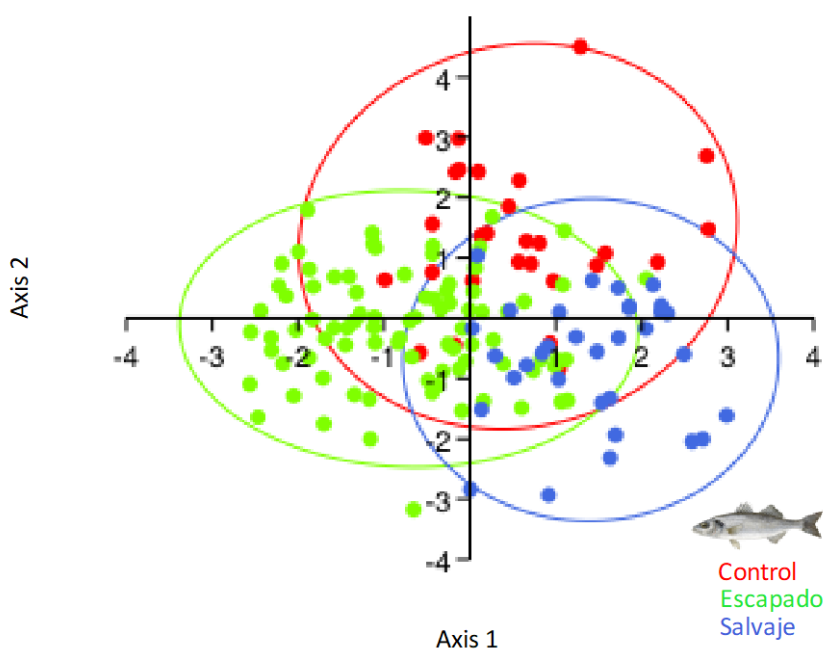


Figura 20 Diagrama de puntos correspondiente al análisis discriminante de los individuos de lubina (*D. labrax*) analizados en este estudio. Los colores corresponden a los diferentes orígenes de los peces analizados. Control = rojo, Escapados = verde y Salvajes = Azul

Tabla 8. Matriz de confusión del análisis discriminante para las lubinas (*D. labrax*) analizadas.

	Control	Escapados	Salvajes	Total
Control	8	14	6	28
Escapados	17	48	22	87
Salvajes	12	6	15	33
Total	37	68	43	148

Conclusión

Si bien las técnicas morfométricas son útiles para discernir hasta cierto punto los grupos estudiados, es también cierto que la facilidad del proceso vendrá dada por una variabilidad individual detectable en tanto y en cuanto se disponga de un tamaño muestral aceptable. Uno de los problemas de los que adolece el estudio se observa el reducido y dispar tamaño de los grupos estudiados en cada especie. Se necesita un tamaño mucho mayor para obtener resultados concluyentes, no obstante el análisis discriminante se muestra esperanzador como futura técnica de trazabilidad fiable.

3. Análisis de contenido estomacal

Metodología

Identificación del contenido estomacal

En primer lugar, se pesó el contenido estomacal y se analizó la muestra con ayuda de una placa Petri en una lupa binocular. Se identificó el contenido estomacal hasta el mínimo nivel taxonómico posible teniendo en cuenta que el nivel de digestión fue un factor determinante para la consecución exitosa de este proceso. Se pesó cada contenido estomacal identificado en un peso o en una balanza de precisión cuando fue necesario y se almacenó con alcohol al 70% en un tubo Eppendorf etiquetado.

Relevancia de las presas y diferencias dietéticas en función de la talla

En primer lugar, se calculó el porcentaje de vacuidad. Tras ello, para determinar la relevancia de las presas, se usaron las siguientes proporciones porcentuales:

Frecuencia porcentual de ocurrencia (O%): número de individuos cuyos contenidos estomacales incluyen una de las categorías de presas, expresada como un porcentaje del número total de individuos que presentan contenido estomacal (Williams, 1981). Porcentaje de frecuencia (N%): número total de individuos de una determinada categoría alimenticia en función del número total de individuos de todas las categorías.

Porcentaje en peso (W%): porcentaje numérico del peso de cada categoría de presas en relación al peso total de los contenidos estomacales. Índice de importancia relativa (IRI) (Pinkas et al., 1971): índice que combina las tres medidas descritas anteriormente, la frecuencia porcentual de ocurrencia (O%), el porcentaje de frecuencia (N%) y el porcentaje en peso (W%). Para eliminar los sesgos de estas tres técnicas por separado. $IRI = ((N\% + W\%) O\%)$. Ratio de alimentación (Q%) (Hureau, 1970): a diferencia del IRI, en este caso no se tuvo en cuenta el porcentaje de ocurrencia. Por lo que se calculó del siguiente modo: $Q\% = N\%W\%$. La importancia

de los grupos de presas se evaluó utilizando cinco categorías basadas en valores de Q y O% (Rosecchi y Nouaze, 1987): presa principal preferida o “Main preferred prey” (Q > 100, O% > 30%); presas ocasionales principales o “Main occasional prey” (Q > 100, O% < 30%); presa común secundaria o “Secondary common prey” (10 < Q < 100, O% > 10%); presa adicional secundaria o “Secondary additional prey” (10 < Q < 100, O% < 10%); y presa accidental o “Accidental prey” (Q < 10).

Resultados

>Corvina.

Tabla 9. Descripción dietética de *Argyrosomus regius* escapadas, basada en distintos índices. Frecuencia porcentual de ocurrencia (O%), porcentaje de frecuencia (N%), porcentaje en peso (W%), índice de importancia relativa (IRI), y ratio de alimentación (Q%).

Origen: Escapados de granjas acuícolas (57 individuos)						
Vacuidad 77.58%						
Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Crustacea						
Pleocyemata						
No identificado	14.29	0.01	15.38	0.10	219.89	Accidental prey
Amphipoda						
Photidae	7.14	0.01	7.69	0.09	55.05	Accidental prey
Total	21.43	0.02	23.08	0.44	494.98	Accidental prey
Teleostea						
<i>Gobius sp</i>	7.14	0.39	7.69	2.79	57.95	Accidental prey Secondary common prey
Clupeidae	7.14	49.15	7.69	351.10	433.05	Secondary common prey
No identificado	14.29	24.72	15.38	353.19	600.14	Secondary common prey
Total	28.57	74.27	30.77	530.49	3164.29	Main preferred prey Secondary additional prey
Aquafeed	7.14	12.02	7.69	85.86	147.40	prey
Plastic	42.86	0.01	46.15	0.46	1978.51	Accidental prey
Origen: Controles de granjas acuícolas (18 individuos)						
Vacuidad 88.89%						
Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Crustacea						
<i>Amphipoda</i>						
Ischyroceridae	50.00	0.10	50.00	5.16	2505.16	Accidental prey
Teleostea						
No identificado	50.00	30.40	50.00	1520.17	4020.17	Main preferred prey

Se obtuvieron menores números de presas en los individuos del grupo control. En estos últimos a pesar de tener una alta vacuidad (>88%) se aprecia la aparición de anfípodos de fouling propio de las jaulas y teleosteos como presa principal, lo cual coincide con el grupo de peces escapados (>28% en número). En este último además, se aprecia la presencia de pienso y plástico (>42% N), Y la aparición ocasional de crustáceos.

>Lubina.

Tabla 10. Descripción dietética de *D. labrax*, basadas en distintos índices. Frecuencia porcentual de ocurrencia (O%), porcentaje de frecuencia (N%), porcentaje en peso (W%), índice de importancia relativa (IRI), y ratio de alimentación (Q%).

Origen: Controles de granjas acuícolas (32 individuos)

Vacuidad 53.13%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Decapoda						
Dendrobranchiata						
No identificado	1.49	0.001	6.67	0.001	9.96	
Pleocyemata						
No identificado	1.49	0.03	6.67	0.04	10.14	
Total	2.99	0.03	13.33	0.09	40.19	Accidental prey
Tanaidacea						
Apeudidae	1.49	0.002	6.67	0.003	9.96	
No identificado	1.49	0.0001	6.67	0.0001	9.95	
Total	2.99	0.002	13.33	0.01	39.83	Accidental prey
Amphipoda						
Caprellidae	1.49	0.003	6.67	0.004	9.97	
Corophiidae	1.49	0.0002	6.67	0.0003	9.95	
Dexaminidae	1.49	0.002	6.67	0.002	9.96	
Ischyroceridae	25.37	0.02	20	0.46	507.82	
No identificado	41.79	0.03	20	1.46	836.52	
Total	71.64	0.06	33.33	4.09	2389.96	Accidental prey
Isopoda						
No identificado	2.99	0.003	6.67	0.01	19.92	Accidental prey
Teleostea						
No identificado	1.49	0.03	6.67	0.05	10.18	Accidental prey
Aquafeed	7.46	57.64	33.33	430.13	2169.98	Main preferred prey
Plastic	4.48	0.04	6.67	0.17	30.10	Accidental prey
Algae	4.48	0.03	6.67	0.13	30.04	Accidental prey
Briozoa	1.49	0.02	6.67	0.03	10.09	Accidental prey

Origen: Escapados de granjas acuícolas (88 individuos)

Vacuidad 54.54%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Decapoda						
Dendrobranchiata						
Penaeidae	0.23	0.02	2.50	0.01	0.63	
Pleocyemata						
No identificado	0.11	0.0001	2.50	0.00001	0.29	
Total	4.48	0.02	13.33	0.11	60.02	Accidental prey
Amphipoda						
Amphilochidae						
Aoridae	0.23	0.0003	5.00	0.0001	1.14	
Gammaridae	3.77	0.07	7.50	0.25	28.78	
Ischyroceridae						
Leucothoidae	17.26	0.16	17.50	2.72	304.76	Secondary common prey
Liljeborgiidae	1.71	0.005	2.50	0.01	4.30	
Photidae	0.11	0.003	2.50	0.0004	0.29	
No identificado						
	13.26	1.86	35.00	24.70	529.22	Secondary common prey
Total	97.60	3.48	60.00	339.87	6064.94	Main preferred prey
Teleostea						
Clupeidae						
No identificado	0.11	11.04	2.50	1.26	27.88	
Total						
	0.46	29.41	0.46	13.44	223.97	Secondary additional prey
Aquafeed						
Plastic	0.11	0.05	2.50	0.01	0.41	Secondary common prey
Algae	0.11	0.11	2.50	0.01	0.55	Accidental prey
Magnoliopsida						
Cymodocea sp.						
	0.11	0.16	2.50	0.02	0.69	
Posidonia sp.						
	0.11	0.12	2.50	0.01	0.59	
Total	0.23	0.29	5.00	0.07	2.57	Accidental prey

Los individuos procedentes de granjas de lubina tienen una alta presencia en peso de pienso (>57% W), además de apariciones accidentales de crustáceos, trozos de plástico y algas.

Las lubinas escapadas, por su parte, depredan principalmente anfípodos de origen relacionado con el fouling (97.6% N), teleosteos (> 223 IRI) y pienso (>481 IRI). Además de aparecer fanerógamas, plásticos, algas o decápodos.



Origen: Salvajes (34 individuos)

Vacuidad 61.76%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Decapoda						
Dendrobranchiata						
Penaeidae	13.64	0.43	7.69	5.92	108.23	
Pleocyemata						
No identificado	4.55	0.32	7.69	1.48	37.46	
Total	4.48	0.76	15.38	3.40	80.55	Accidental prey
Isopoda						
No identificado	4.55	0.0001	7.69	0.0005	34.97	Accidental prey
Teleostea						
Clupeidae	4.55	25.46	7.69	115.71	230.78	
Gobiidae	4.55	12.47	7.69	56.69	130.91	
No identificado	27.27	13.54	15.38	369.16	627.82	Secondary common prey
Total	45.45	51.48	38.46	2340.21	3728.43	Main preferred prey
Polychaeta						
No identificado	4.55	0.04	7.69	0.18	35.26	Accidental prey
Aquafeed	18.18	5.19	30.77	94.40	719.19	Accidental prey
Algae	9.09	1.25	15.38	11.34	159.05	Accidental prey

Finalmente, el grupo de lubinas salvajes se decanta por los teleósteos (~45% N), con dietas variadas ocasionales de crustáceos, poliquetos, algas e incluso pienso.

>Dorada

Tabla 11. Descripción dietética de *S aurata*, basadas en distintos índices. Frecuencia porcentual de ocurrencia (O%), porcentaje de frecuencia (N%), porcentaje en peso (W%), índice de importancia relativa (IRI), y ratio de alimentación (Q%).

Origen: Controles de granjas acuícolas (28 individuos)

Vacuidad 78.57%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Amphipoda						
Ischyroceridae	9.09	0.33	16.67	3.01	157.03	
No identificado	9.09	0.001	16.67	0.01	151.53	
Total	18.18	0.33	33.33	6.03	617.12	Accidental prey
Pleocyemata						
Goneplacidae	45.45	3.31	16.67	150.39	812.72	Main occasional prey
No identificado	9.09	0.12	16.67	1.05	153.45	
Total	54.55	3.42	33.33	186.78	1932.32	Main preferred prey
Magnoliopsida						
Cymodoceaceae	9.09	3.14	16.67	28.57	203.90	Secondary common prey
Bivalvia						
No identificado	9.09	0.15	16.67	1.35	154.00	Accidental prey
Feather	9.09	4.14	16.67	37.60	220.44	Secondary common prey



GLORIA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840

Origen: Escapados de granjas acuícolas (25 individuos)

Vacuidad 56%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Amphipoda						
Leucothoidae	2.94	0.001	9.09	0.002	26.74	Accidental prey
Magnoliopsida						
Cymodoceaceae	11.76	11.78	72.73	138.56	1712.14	Main preferred prey
Algae	2.94	0.64	18.18	1.90	65.20	Accidental prey
Echinoidea						
No identificado	1.47	12.73	9.09	18.72	129.10	Secondary additional prey
Polychaeta						
Serpulidae	77.94	24.19	9.09	1885.27	928.45	Main occasional prey
Teleostea						
No identificado	1.47	3.18	9.09	4.68	42.30	Accidental prey
Ascidiacea						
Ascidiidae	1.47	6.37	9.09	9.36	71.24	Accidental prey

Origen: Salvajes (94 individuos)

Vacuidad 24.46%

Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias
Amphipoda						
Caprellidae	0.07	0.003	1.41	0.0002	0.11	
Leucothoidae	0.07	0.25	1.41	0.02	0.45	
Total	0.14	0.25	2.82	0.04	1.11	Accidental prey
Decapoda						
Dendrobranchiata						
Penaeidae	0.36	4.18	1.41	1.51	6.40	
No identificado	0.36	0.80	5.63	0.29	6.52	
Total	0.72	4.98	7.04	3.59	40.15	Accidental prey
Pleocyemata						
Dromiidae	0.07	0.02	1.41	0.001	0.13	Accidental prey
Goneplacidae	0.14	1.50	1.41	0.22	2.32	Accidental prey
Paguridae	26.82	7.84	25.35	210.26	878.70	Accidental prey
No identificado	12.62	16.14	36.62	203.61	1052.98	Main preferred prey
Total	39.65	25.50	28.17	1011.12	1835.28	Main occasional prey
Decapoda Unid.	1.23	0.44	8.45	0.54	14.06	
Total	41.60	30.92	69.01	1286.16	5004.73	Main preferred prey
Magnoliopsida						
Cymodoceaceae	1.08	0.36	9.86	0.39	14.24	Accidental prey
Algae	0.72	0.23	14.08	0.16	13.36	Accidental prey
Echinoidea						
No identificado	0.72	5981.62	14.08	4312.63	84258.29	Main occasional prey
Presa	N%	W%	O%	Q	IRI	Preferencias



GLORiA

GLObal Change Resilience
in Aquaculture

Departamento de Ciencias del Mar y Biología
Aplicada. Universidad de Alicante
Carretera San Vicente del Raspeig s/n 03690
San Vicente del Raspeig, Alicante
965909840

Polychaeta						
Serpulidae	0.14	0.0003	2.82	0.00004	0.41	
Unidentified	0.07	0.01	1.41	0.001	0.12	
Total	0.22	0.01	4.23	0.003	0.97	Accidental prey
Sipunculidae	2.74	0.18	7.04	0.49	20.56	Accidental prey
Gastropoda						
Aclididae	0.22	0.01	1.41	0.001	0.31	
Cerithiidae	1.37	0.13	8.45	0.18	12.71	
Columbellidae	0.07	0.001	1.41	0.00	0.10	
Costellariidae	2.31	0.11	4.23	0.25	10.20	
Litiopidae	2.67	0.19	9.86	0.50	28.17	
Littorinidae	0.43	0.08	1.41	0.03	0.72	
Muricidae	0.07	0.11	1.41	0.01	0.26	
Nassariidae	1.15	0.04	4.23	0.04	5.04	
Naticidae	0.50	0.03	4.23	0.02	2.27	
Neritidae	0.07	0.004	1.41	0.0003	0.11	
Patellidae	0.50	0.03	4.23	0.01	2.26	
Phasianellidae	0.07	0.01	1.41	0.0005	0.11	
Plesiotrochidae	4.97	0.44	15.49	2.21	83.96	
Triphoridae	0.50	0.02	4.23	0.01	2.23	
Trochidae	0.50	0.25	1.41	0.12	1.06	
Turritellidae	10.38	1.18	12.68	12.26	146.57	Secondary common prey
No identificado	3.82	0.48	14.08	1.82	60.51	
Total	29.63	3.10	54.93	91.94	1798.12	Secondary common prey
Teleostea						
No identificado	0.43	1.20	8.45	0.52	13.83	Accidental prey
Bivalvia						
Arcidae	1.30	0.59	2.82	0.77	5.32	
Cardiidae	4.33	6.20	30.99	26.82	326.16	Secondary common prey
Donacidae	0.22	0.20	4.23	0.04	1.75	
Hiatelidae	0.07	0.02	1.41	0.001	0.13	
Mactridae	3.97	0.75	8.45	2.99	39.88	
Mytilina	0.22	2.07	2.82	0.45	6.44	
Pectinidae	0.94	2.06	4.23	1.93	12.66	
Pteriidae	0.29	0.07	1.41	0.02	0.50	
Semelidae	0.14	0.01	1.41	0.001	0.21	
Veneridae	5.05	3.99	30.99	20.13	279.94	Secondary common prey
No identificado	5.62	8.57	38.03	48.21	539.87	Secondary common prey
Total	22.13	24.53	69.01	542.84	3220.15	Main preferred prey
Scaphopoda	0.36	0.08	4.23	0.03	1.85	Accidental prey
Briozoa	0.07	0.02	1.41	0.001	0.13	Accidental prey
Plastic	0.07	0.01	1.41	0.0004	0.11	Accidental prey
Isopoda						
Gnathiidae	0.07	0.002	1.41	0.0002	0.11	Accidental prey

Las doradas son animales voraces con gustos variados cuyo comportamiento se refleja en su dieta. Incluso los individuos procedentes de cultivo tienen como presa principal crustáceos (1932.32 IRI), seguido en importancia por fanerógamas (203.9 IRI). La dieta de éstos se complementa con anfípodos (>18 % N) o bivalvos (9.09% N).

Las escapadas de jaulas tienen preferencia por fanerógamas (11.76% N), aunque se alimentan también de erizos o poliquetos (129 y 928 IRI, respectivamente). Su dieta la complementan teleósteos, anfípodos y ascidias.

Finalmente, las doradas salvajes tuvieron como presa principal a los decápodos (41.6% N) y a los bivalvos (22.13% N); como presas secundarias a gasterópodos (29.63% N) como presa ocasional a erizos (14.08% N). Sus datos accidentales evidencian el amplio rango de presas en el que se mueven (poliquetos, briozoos, isópodos, anfípodos, etc.), siendo este grupo de individuos el que tiene un rango predatorio más diverso de todo el estudio.

Conclusiones

A pesar del tamaño muestral bajo de algunos grupos y de las características inherentes de algunas especies en el momento de la pesca –las corvinas tienden a regurgitar el contenido estomacal ante situaciones de estrés elevado-, los datos de dieta siguen unos patrones que casan con el comportamiento históricos de estas especies. Los resultados muestran que los individuos son capaces de adaptarse al medio en caso de tener un origen escapado y que son capaces de alimentarse de presas parecidas a sus contrapartidas salvajes. Por otro lado, los peces de cultivo también pueden alimentarse de algo más que pienso, como algas, fanerógamas y principalmente, organismos del fouling como por ejemplo anfípodos.

4. Análisis de los otolitos

Introducción

El escape de peces de jaulas de cultivo puede llegar a suponer una amenaza para el hábitat natural en función de, entre otros, la magnitud del escape, el potencial de explotación de recursos de la especie en particular o la condición de los individuos tras el evento. Sin embargo, su transición al nuevo medio requiere y da lugar a cambios progresivos, tanto a nivel comportamental como físico. Los peces se enfrentan a un umbral de adaptación fijado por las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio. El éxito de la población escapada en conjunto depende de su capacidad de plasticidad fenotípica, es decir, de su aptitud para adecuar rasgos físicos y conductuales a las nuevas condiciones ambientales. De este modo, el metabolismo y desarrollo del organismo son influenciados, desencadenando en cambios sobre la morfología externa y el crecimiento de estructuras duras como son las escamas o los otolitos.

En este contexto, la identificación de organismos fugados es una herramienta de alta trascendencia a la hora de realizar estudios de impacto tanto a nivel local y focalizado como de extensión y alcance del escape (Hansen y Jacobsen, 2003). A partir de los años 80, ligado a la expansión de la acuicultura, aumentó el interés por establecer y mejorar criterios que permitiesen diferenciar la población escapada de la natural. Los primeros métodos de identificación se basaban en diferencias morfológicas y morfométricas (Shepherd, 1991; Turan,

1999) y las primeras investigaciones tenían como especies objetivo el salmón atlántico (*Salmo salar*) y el salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) (Winans, 1984; Swaine *et al.*, 1991). Se hacía uso de patrones de crecimiento o de la presencia/ausencia de ciertos caracteres morfológicos como el perfil de las aletas caudal, pectoral y anal, el acortamiento de la cobertura de las agallas, las deformaciones en la mandíbula inferior o el nivel de pigmentación del organismo. Sin embargo, los patrones morfológicos estaban sujetos a cambios ambientales (Clayton, 1981). Por otro lado, desde los años 90 evolucionaron técnicas de morfometría aplicada a estructuras biológicas duras para determinar la edad de los peces (Lund y Hansel, 1991; Popper *et al.*, 2005). Dichos procedimientos trataban de establecer el patrón natural de crecimiento de estructuras como escamas u otolitos de una especie en cautividad y encontrar diferencias con la morfología de las extraídas de ejemplares escapados. Tanto escamas como otolitos poseen un modelo de desarrollo radial y discontinuo. Es decir, crecen formando anillos concéntricos a distinta velocidad según las condiciones metabólicas del organismo, influenciadas por las condiciones del medio y su genética principalmente (Geffen, 1992; Morales-Nin, 2000). De este modo, en periodos favorables se distinguen bandas de poca densidad o zonas hialinas (translúcidas), debido al alto depósito de materia orgánica, y en periodos desfavorables se aprecian bandas de alta densidad (zonas opacas) a causa del bajo depósito de materia orgánica (**Fig. 21**).

La estructura morfológica del otolito y su patrón de crecimiento han sido empleados para diferenciar poblaciones de la misma especie separadas geográficamente (Ramírez *et al.*, 2010) así como para distinguir entre peces de cultivo y peces salvajes (Fernandez-Jover y Sanchez-Jerez, 2014). También se han analizado las diferencias en la forma física y condiciones corporales de peces de cultivo frente a peces salvajes (Fleming *et al.*, 1994). Las escamas y otolitos han sido empleado para discriminar peces salvajes de cultivados (Arechavala-Lopez *et al.*, 2012). Es bien conocido el potencial de la estructura interna y química de los otolitos para datación y como indicador de cambios ambientales (Elsdon y Gillanders, 2004; Sturrock *et al.*, 2012). No obstante, existe un vacío en cuanto a cómo la estructura externa del otolito puede exponer la adaptación de organismos escapados,

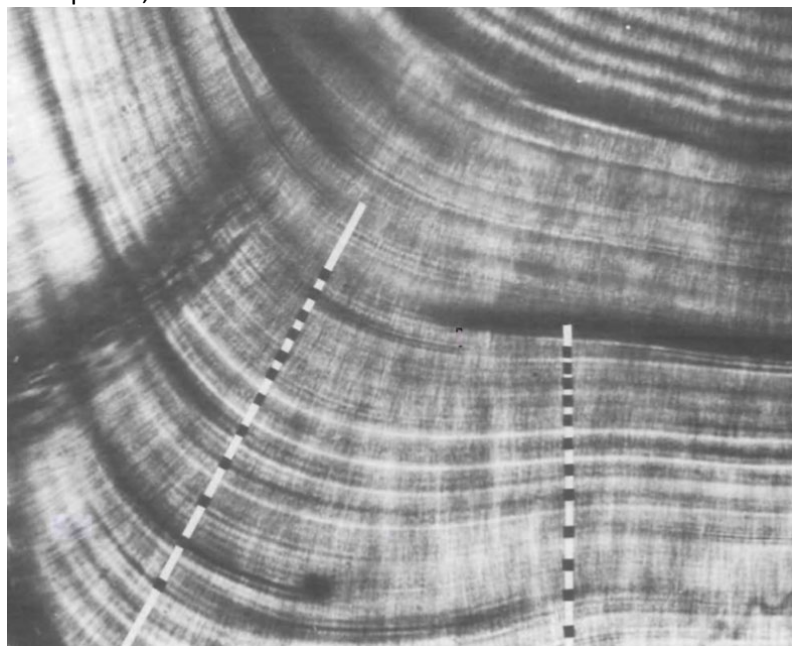


Figura 21. Bandas de crecimiento concéntricas con alta y baja densidad de deposición mineral. [Extraído de Campana *et al.*, 1992].

cómo refleja su asilvestramiento. En el proceso de asilvestramiento de un individuo fugado confluyen la plasticidad fenotípica (Meyer, 1987) y la selección natural. Dicho de otra manera, el abanico de adaptaciones metabólicas que es capaz de realizar el individuo frente a nuevas condiciones físicas, químicas y biológicas (reflejadas en la transformación de sus rasgos fenotípicos) (Wainright, 1996; DeWitt *et al.*, 1998) y el propio umbral que supone el medio (alimentación, competencia interespecífica, factores climáticos...).

Los patrones de crecimiento presentes en escamas y otolitos son empleados para datar transiciones entre hábitats, estaciones o fases vitales de los peces, pudiendo indicar su procedencia y evolución. Siendo consideradas estructuras estables, el contorno y morfometría de los otolitos podrían ser empleados en estudios de trazabilidad. El presente estudio realiza un contraste entre otolitos procedentes de individuos salvajes, escapados y cultivados de diferentes especies de interés para el sector acuícola (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* y *Argyrosomus regius*) en base a variables descriptoras de contorno básicas y descriptores elípticos de Fourier (EFDs) de otolitos. El principal objetivo fue la identificación de posibles diferencias en la estructura externa de otolitos de peces de diferente origen y la validación del otolito como herramienta de trazabilidad.

Material y Métodos

Zona de estudio y muestreo

Un total de 147 doradas (*Sparus aurata*), 154 lubinas (*Dicentrarchus labrax*) y 86 corvinas (*Argyrosomus regius*) fueron recolectadas de diversas lonjas y supermercados de la Comunidad Valenciana y Murcia durante el periodo comprendido entre septiembre 2019 y agosto 2021. Según la clasificación basada en análisis de morfometría corporal, la distribución por origen de doradas fue 91 salvajes, 28 escapadas y 28 de cultivo; en el caso de las lubinas: 34 salvajes, 88 escapadas y 32 cultivadas; y de las corvinas: 68 escapadas y 18 cultivadas. Tras los procesos de etiquetado, toma de biometría y pesado, la fracción más grande de los otolitos, el par de sagittae (ejemplares izquierdo y derecho), fue extraído de los individuos y almacenado.

Tratamiento de muestras

Los otolitos fueron revisados en busca de posibles imperfecciones en la estructura externa como mellas o fracturas. Las piezas que presentaron signos de desgaste, degradación o rotura originados durante la extracción o conservación fueron descartadas, el resto fueron inventariadas. El número total de muestras en buen estado fue de 131 en dorada, 135 en lubina y 76 en corvina; siendo la distribución de las muestras por especie y grupo de origen (salvajes (S), escapadas (E), cultivadas (C)): 91S / 20E / 20C para dorada, 30S / 78E / 27C para lubina y 59E / 17C para corvina.

Considerando ambas piezas (izquierda y derecha) análogas (Islam *et al.*, 2009), en las subsiguientes fases de procesamiento se hizo uso del ejemplar izquierdo del par de acuerdo con el estándar empleado en estudios anteriores (Arechavala-Lopez *et al.*, 2012, Gharred *et al.*, 2020). Los otolitos fueron pesados y fotografiados exponiendo el sulcus acusticus (cara interna) y con el rostrum hacia abajo (**Fig.22-B**). Para ello se empleó una lupa (Optech LFZtrioocular) de luz reflejada y un fondo oscuro acompañado de una escala milimétrica. Las fotografías fueron tomadas utilizando una cámara digital (uEye UI-1460SE-C-HQ) acoplada a la lupa y el software asociado uEye Cockpit (**Fig.23**). Para el proceso de fotografiado se empleó iluminación externa

desde diferentes ángulos para aumentar el contraste de la pieza sobre el fondo y resaltar el contorno de los otolitos (**Fig.22**).

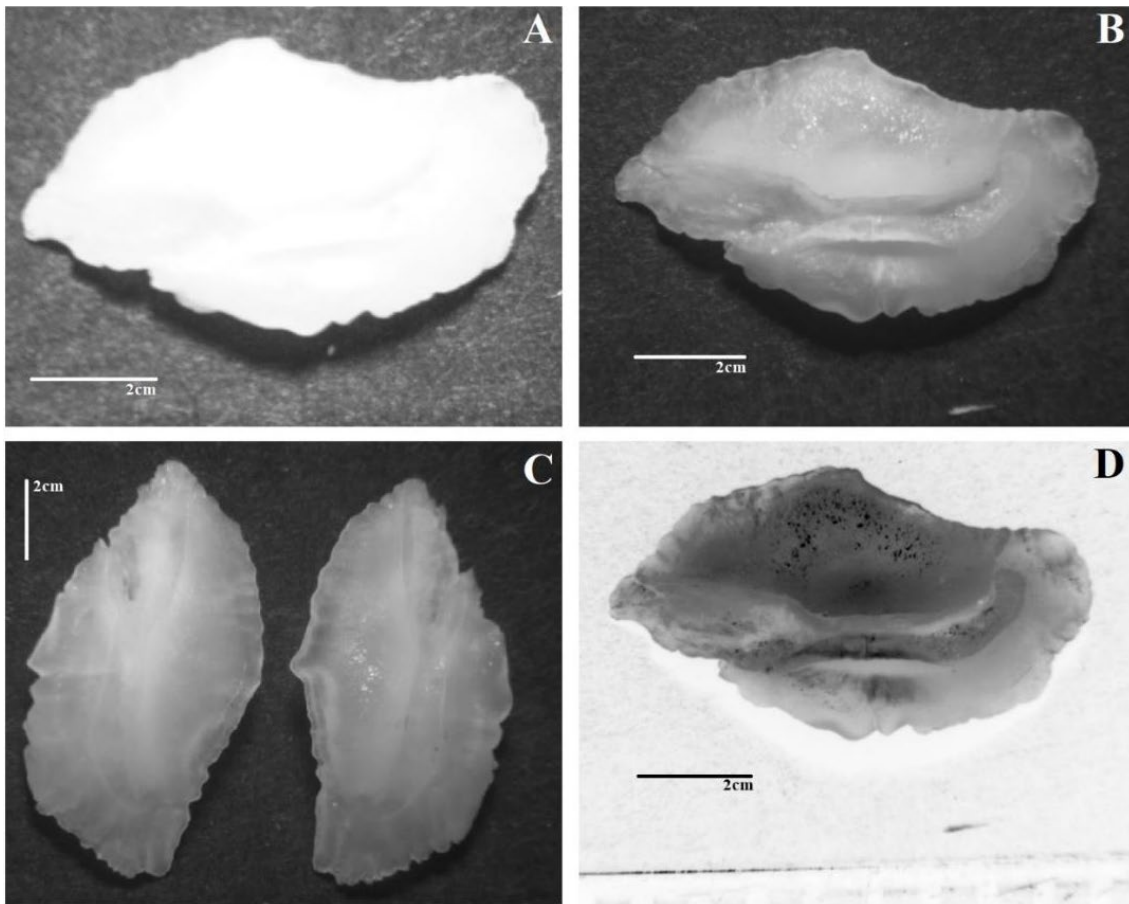


Figura 22. Perfiles de imagen empleados durante el proceso de fotografiado de otolitos de *Sparus aurata*. A: resalte de contorno; B: resalte de surco acústico; C: ejemplo de par de otolitos estándar; D: resalte de surco en negativo. *Escala = 2 cm



Figura 23. Izquierda: software de selección de perfil UEyeCockPit: Derecha: Lupa con cámara acoplada y plantilla milimetrada.

Procesado de imágenes

Posteriormente, las imágenes recibieron dos tratamientos distintos: (1) extracción de variables descriptoras de contorno y (2) análisis de Fourier basado en Descriptores Elípticos de Fourier (EFDs). Para el primer (1) tratamiento se hizo uso del software ImageJ. Empleando sus herramientas de medición de morfometría se extrajeron variables descriptoras de contorno básicas: área, perímetro, redondez, circularidad, longitud de los ejes mayor y menor y ratio de aspecto de las figuras bidimensionales. El segundo (2) tratamiento constó de una sucesión de pasos descritos originalmente por Kuhl y Giardina (1982). Brevemente, la técnica de EFDs descompone siluetas cerradas en una serie de elipses o armónicos. La cantidad de elipses empleadas puede ser predeterminada. Un mayor número de armónicos implica un mayor poder de análisis y una mayor similitud entre el objeto original y el contorno resultante del procesado (**Fig.24**). Haciendo uso de software aplicado como SHAPE, desarrollado por Iwata y Ukai (2002), los EFDs pueden ser normalizados y traducidos a coeficientes numéricos (a, b, c, d). Dichos coeficientes describen las irregularidades de componente simétrico (a, d) y asimétrico (b, c). En el presente estudio, el número de armónicos predeterminado fue de 30 y el método de normalización empleado se basó en el primer armónico, siguiendo la sugerencia de los desarrolladores.

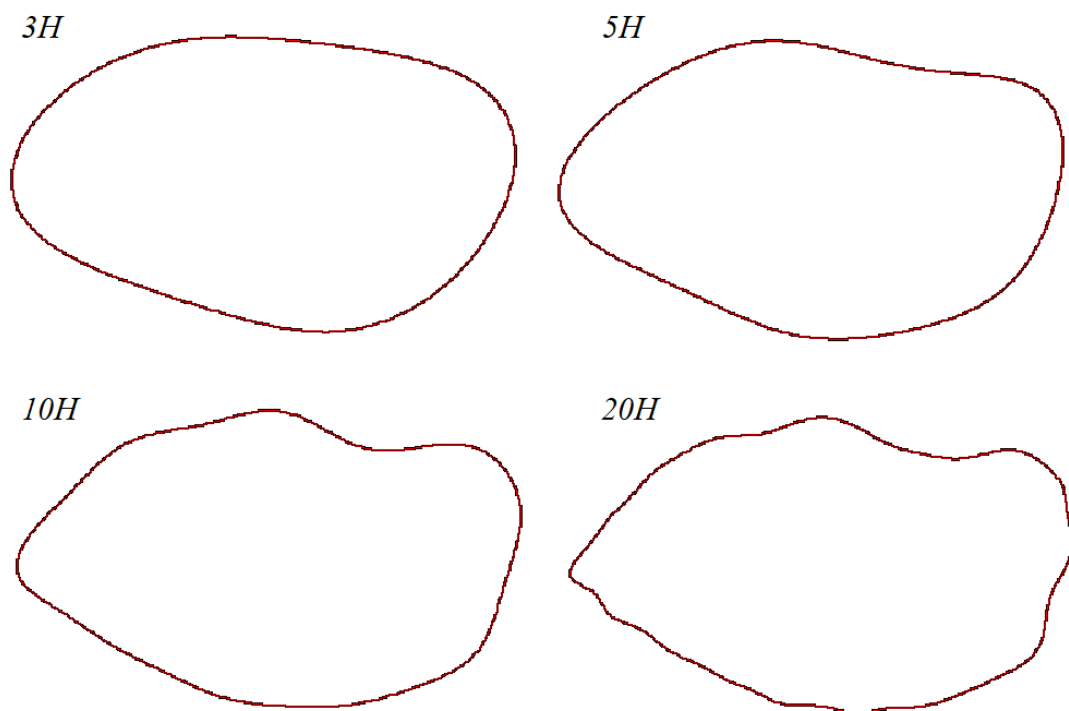


Figura 24. Contornos generados a partir de Descriptores Elípticos de Fourier haciendo uso de diferente número de armónicos (3, 5, 10 y 20).

Análisis de datos

Previo al análisis estadístico eliminó el efecto de la alometría sobre las mediciones empleando el software Past statistics. Para ello se aplicó una normalización de Burnaby vs Standard basada en la longitud total del individuo (Gould, 1966; Leonart, 2000).

Con el objetivo de analizar las posibles diferencias morfológicas entre los otolitos pertenecientes a los grupos de origen (salvajes (S), escapadas (E), cultivadas (C)), se llevaron a cabo tres test estadísticos: (1) Análisis de Componentes Principales (PCA) y (2) Análisis de Función Discriminante (DFA) a partir de variables descriptoras de contorno básicas; y (3) Análisis de Componentes Principales basado en los coeficientes de EFDs (a, b, c, d). El PCA se utiliza para explorar diferencias entre datos en base a variables no correlacionadas. El DFA es empleado para generar una función capaz de clasificar por grupos los datos de un conjunto uno por uno según su semejanza con el resto. Posteriormente, es posible contrastar la clasificación realizada por la función con la categorización originalmente establecida.

Resultados

Los diversos análisis de componentes principales realizados en base las variables descriptoras de contorno básicas (**Fig. 25, 26, 27**) y descriptores de Fourier (**Fig. 28, 29, 30**) permitieron diferenciar los conjuntos “salvaje”, “escape” y “cultivo” en tres elipses. La representación gráfica expone visualmente el grado de solapamiento de las elipses y la variabilidad de contornos examinados. En la mayoría de los casos, los otolitos pertenecientes al grupo de doradas salvajes presentan una menor diversidad de siluetas y perfiles más regulares en comparación con los individuos de cultivo o escapados. Además, los conjuntos de datos “escape” y “cultivo” poseen dispersiones semejantes.

Por otra parte, el contorno reconstruido por los descriptores elípticos de Fourier concuerda con las especificaciones de referencias como el atlas de Tuset *et al.* (2008). Brevemente, el otolito de dorada posee una forma entre pentagonal y elíptica, bordes serrados y dos regiones de mayor estrechamiento del perfil en la zona superior derecha (post cauda) y en la zona inferior izquierda (apertura rostrum-antirostrum del ostium). El otolito de lubina posee un contorno entre fusiforme y rectangular, con bordes redondeados, un rostrum ancho y corto, y una región posterior redonda-oblicua. Por último, el otolito de corvina presenta un contorno elíptico-ovalado, de bordes suaves, rostrum largo y ancho, y región posterior entre redonda y aplanada.

Las diferencias observadas en los análisis de componentes principales de dorada se atribuyen esencialmente a variaciones en la apertura del ostium, la angularidad de la región post-cauda (PC1) y el grado de redondez del otolito (PC2) (**Fig.31 S.aurata**). En lubina, las variaciones en el contorno se originan en la región post-cauda (PC1) y en el ángulo que toma el rostrum (PC2) (**Fig.31 D.labrax**). En el caso de la corvina, las diferencias principales provienen de la angularidad de la región post-cauda (PC1) y de la presencia de suaves irregularidades laterales (PC2) (**Fig.31 A.regius**).

Por último, el análisis de función discriminante (DFA) clasificó los datos en tres subgrupos a partir de las variables descriptoras de contorno básicas. La precisión media en el caso de *Sparus aurata* fue del 62.5%, en *Dicentrarchus labrax* fue del 58.5%, y en *Argyrosomus regius* fue del 77% (**Tabla 12**). Asimismo, un 16% y un 20% de los otolitos de individuos salvajes de *S. aurata* y *D. labrax* respectivamente fueron clasificados como pertenecientes al grupo de cultivo.

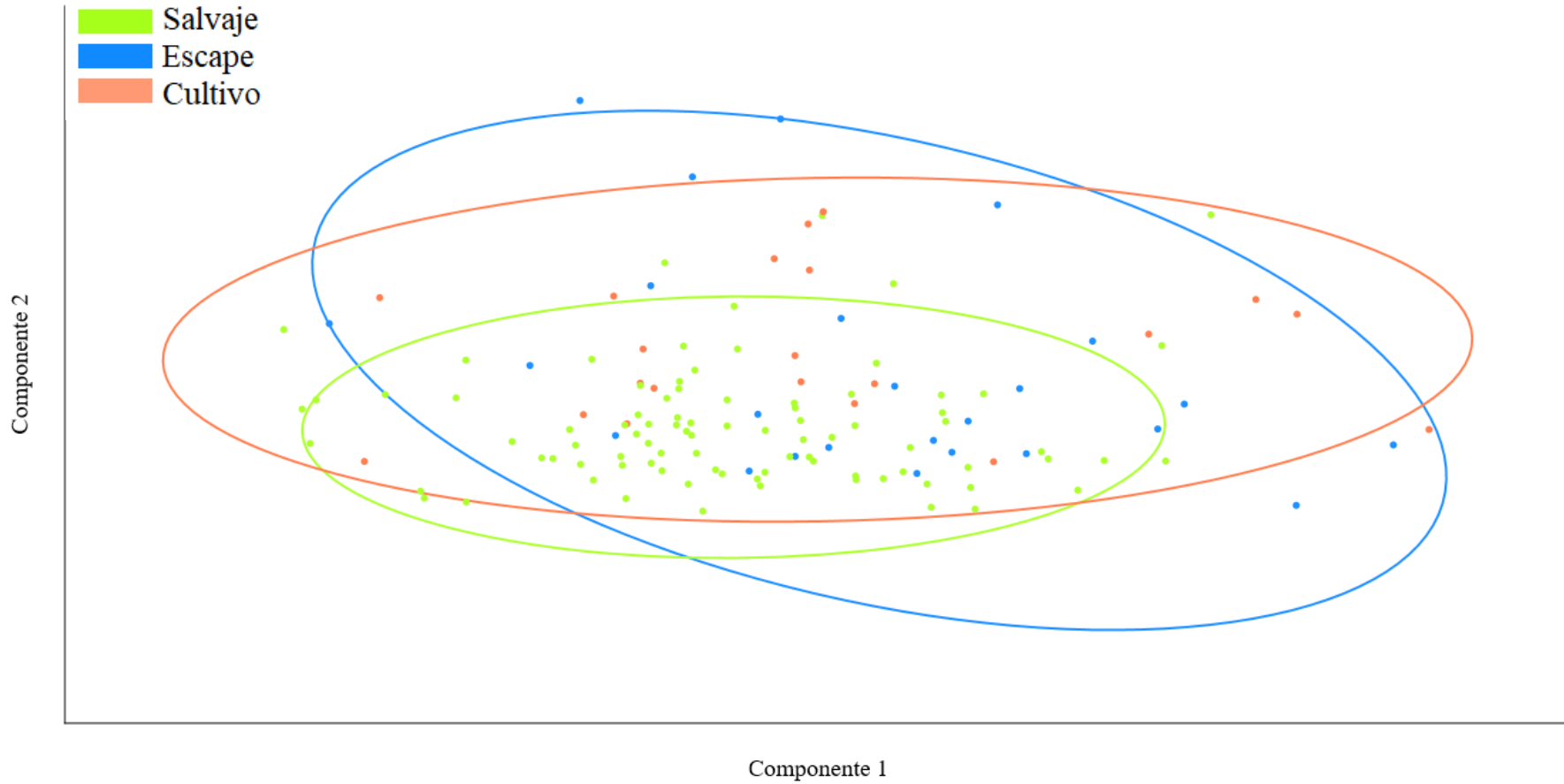


Figura 25. Análisis de componentes principales en base a variables descriptoras de contorno básicas para *Sparus aurata*.

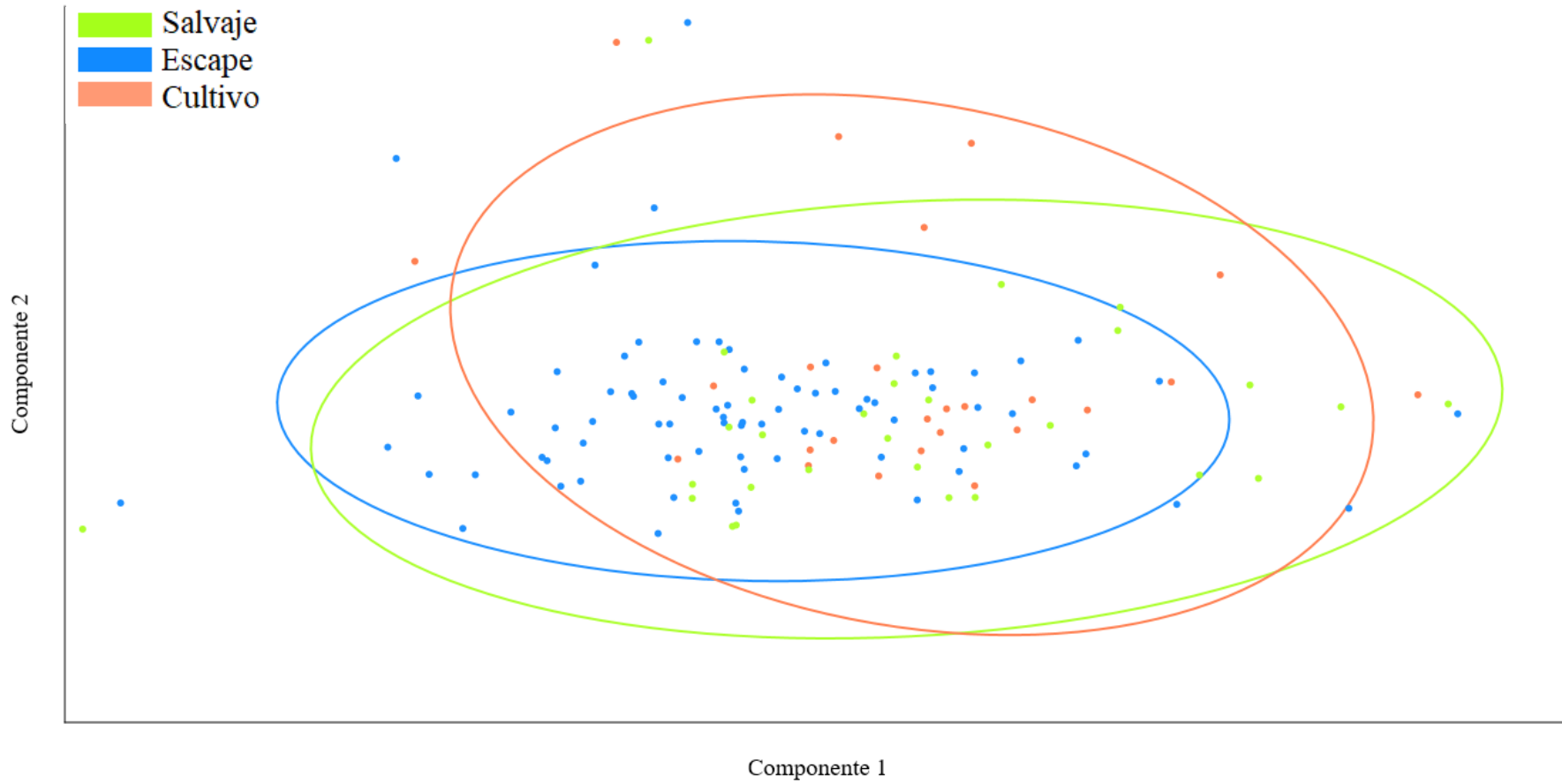


Figura 26. Análisis de componentes principales en base a variables descriptoras de contorno básicas para *Dicentrarchus labrax*.

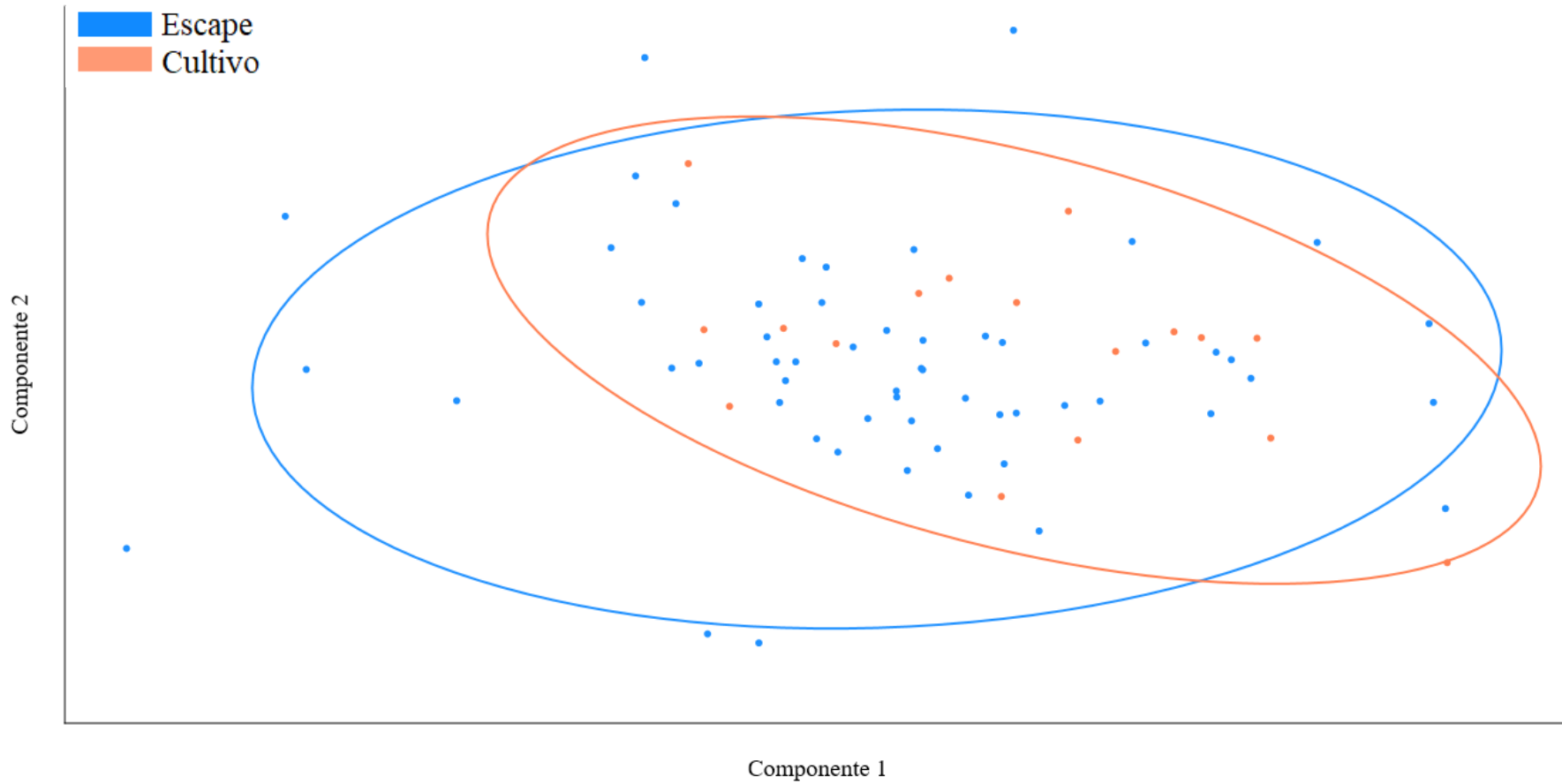


Figura 27. Análisis de componentes principales en base a variables descriptoras de contorno básicas para *Argyrosomus regius*.

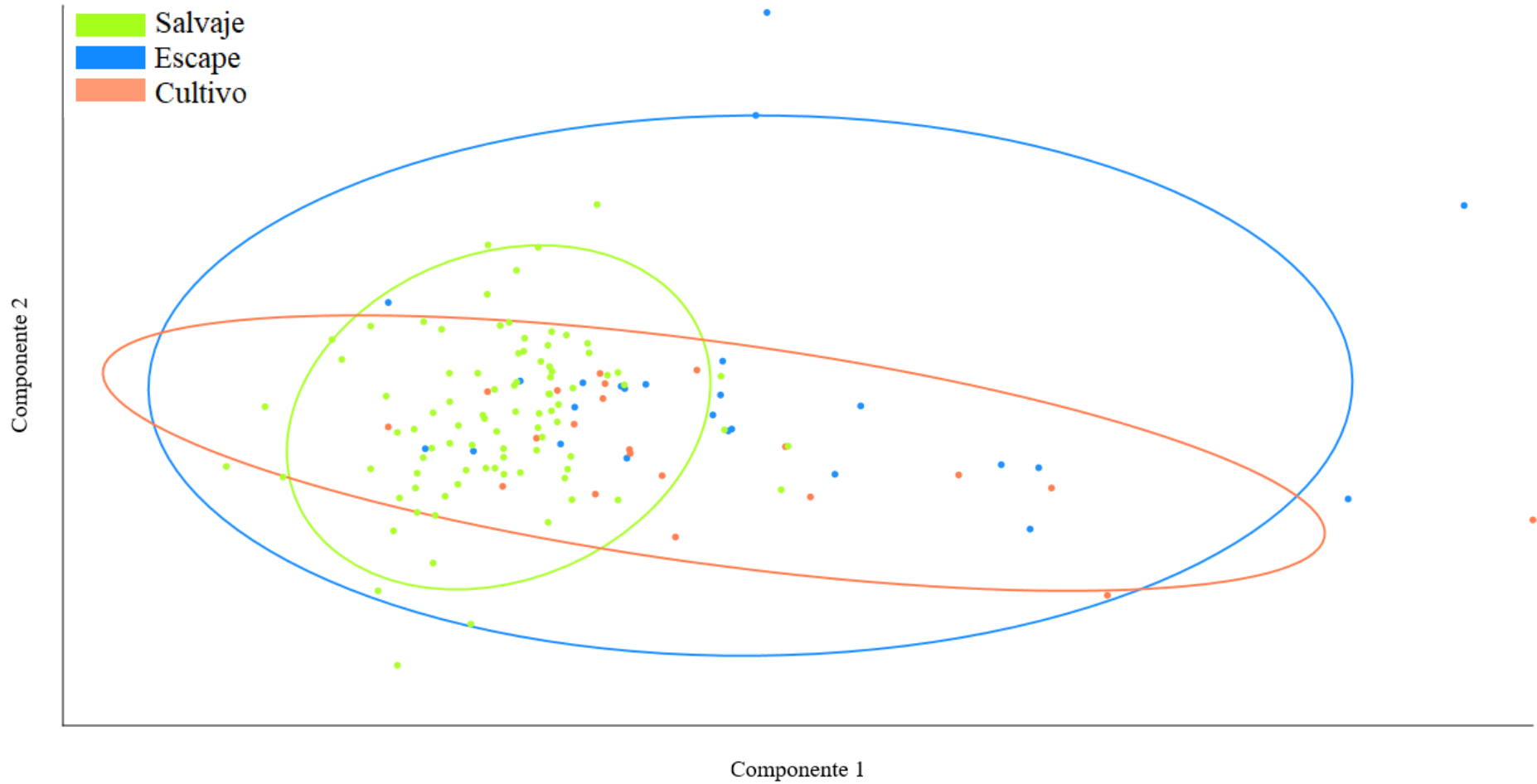


Figura 28. Análisis de componentes principales en base a los descriptores de contorno de Fourier (EFDs) para *Sparus aurata*.

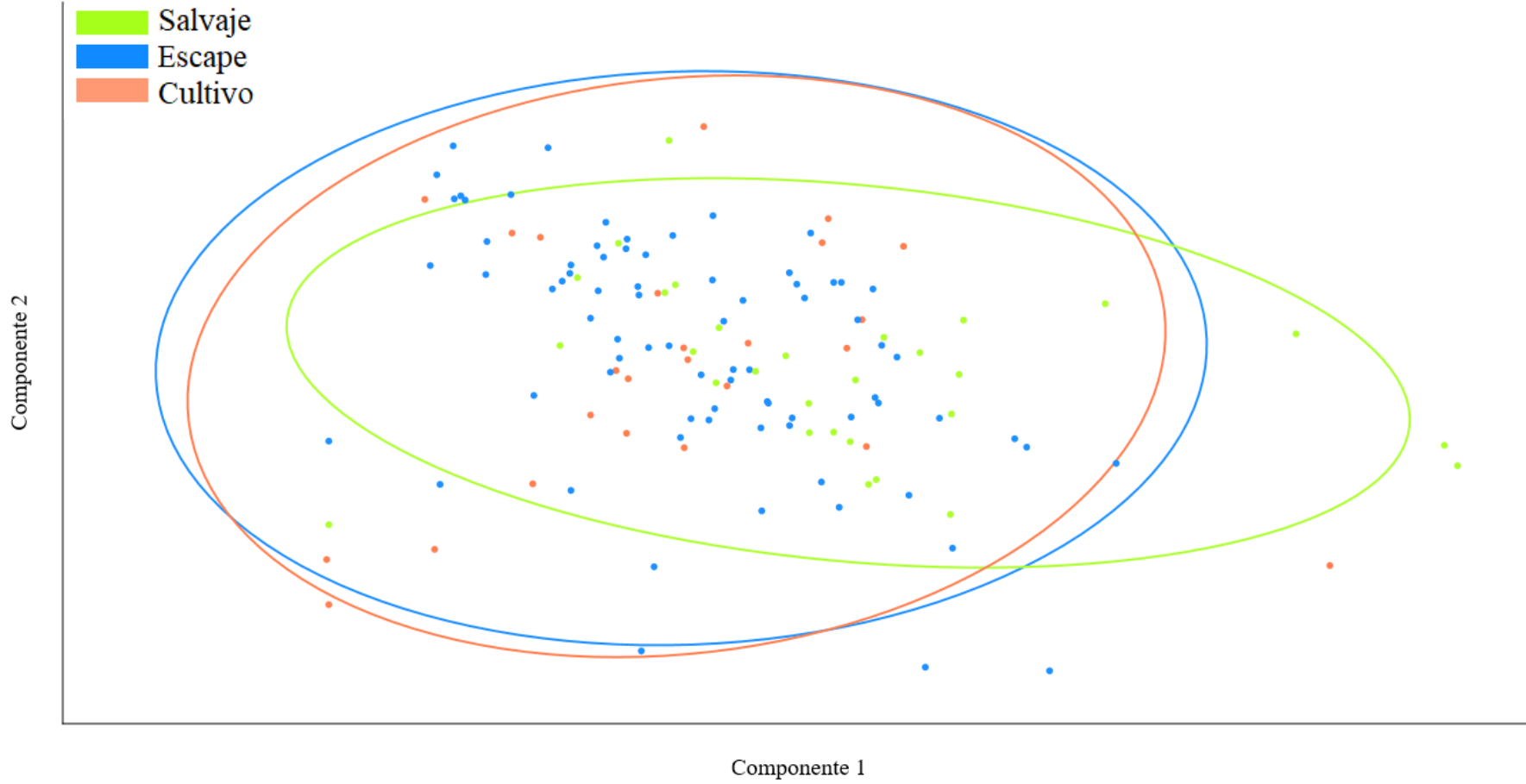


Figura 29. Análisis de componentes principales en base a los descriptores de contorno de Fourier (EFDs) para *Dicentrarchus labrax*.

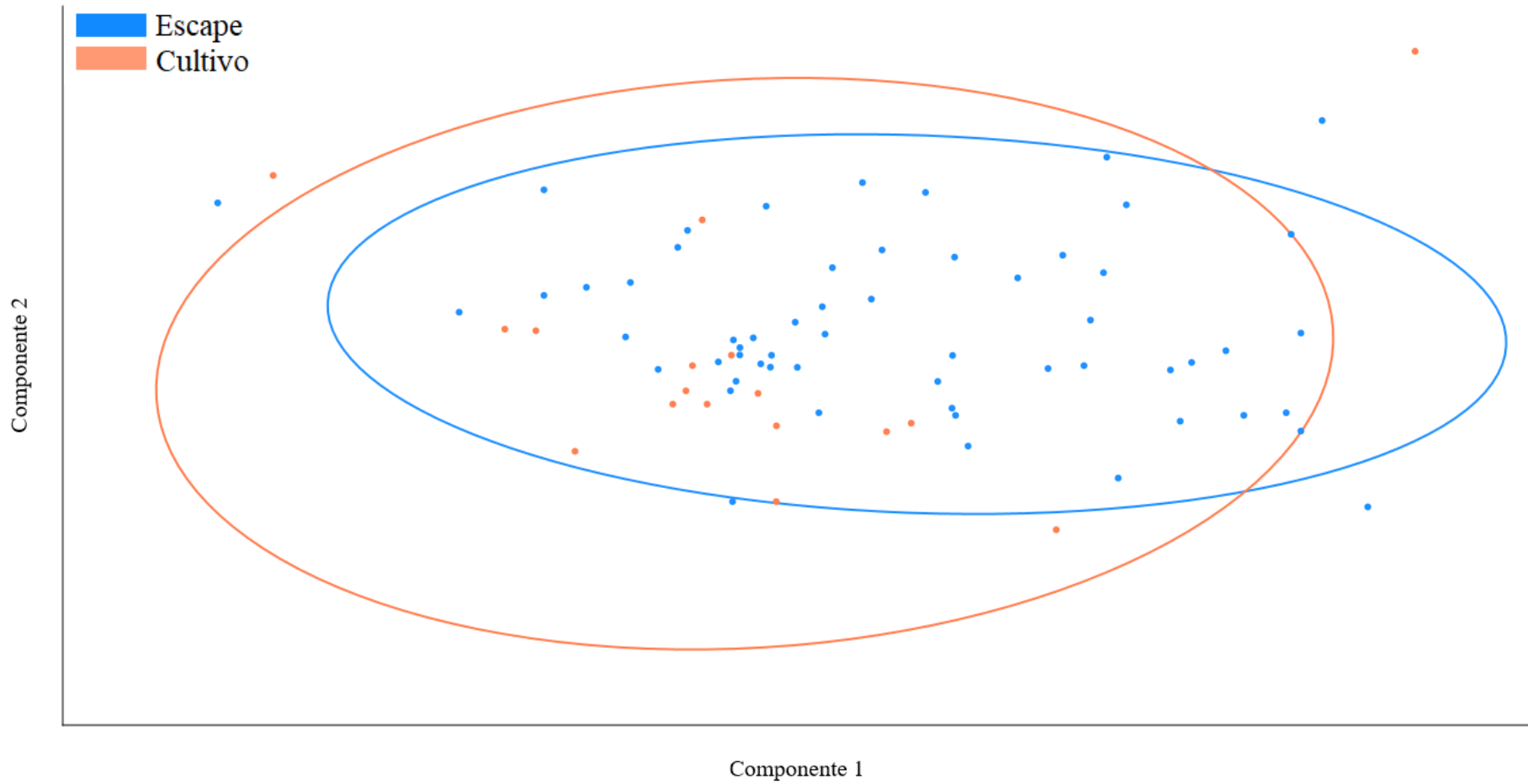


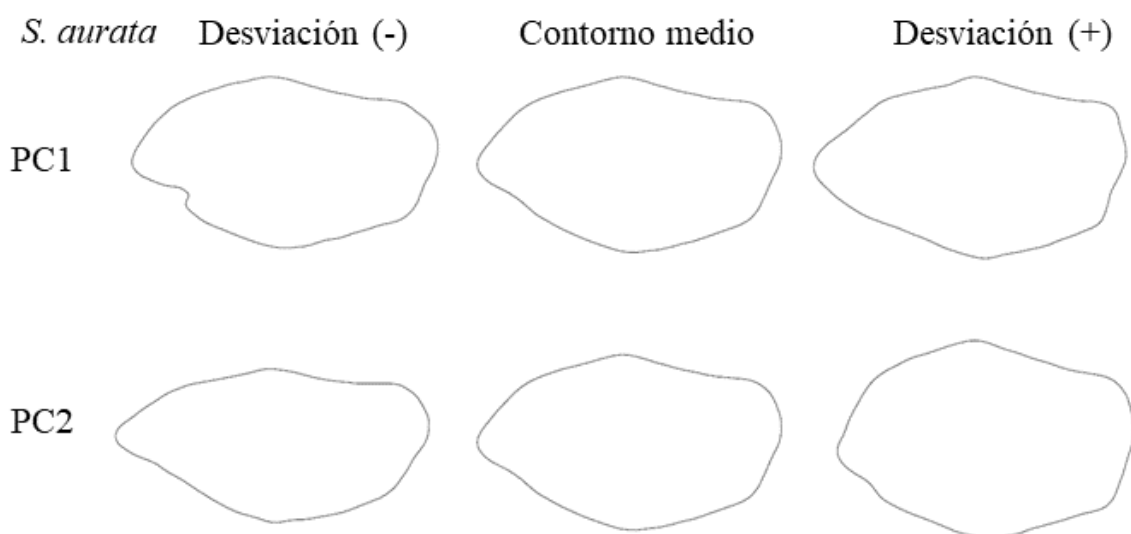
Figura 30. Análisis de componentes principales en base a los descriptores de contorno de Fourier (EFDs) para *Argyrosomus regius*.

Análisis de Función Discriminante de <i>Sparus aurata</i>					
Categoría Original	ESCAPE	SALVAJE	CULTIVO	N Total	Precisión (%)
SALVAJE	12	62	14	88	70,5
ESCAPE	15	5	5	25	60,0
CULTIVO	4	5	12	21	57,1

Análisis de Función Discriminante de <i>Dicentrarchus labrax</i>					
Categoría Original	ESCAPE	SALVAJE	CULTIVO	N Total	Precisión (%)
SALVAJE	9	15	6	30	50,0
ESCAPE	48	18	12	78	61,5
CULTIVO	4	5	16	25	64,0

Análisis de Función Discriminante de <i>Argyrosomus regius</i>					
Categoría Original	ESCAPE	-	CULTIVO	N Total	Precisión (%)
ESCAPE	45	-	13	58	77,6
CULTIVO	4	-	13	17	76,5

Tabla 12. Clasificación en grupos por análisis de función discriminante en base a variables descriptoras de contorno básicas. La precisión indica el porcentaje de individuos cuya clasificación por DFA coincide con la categorización original.



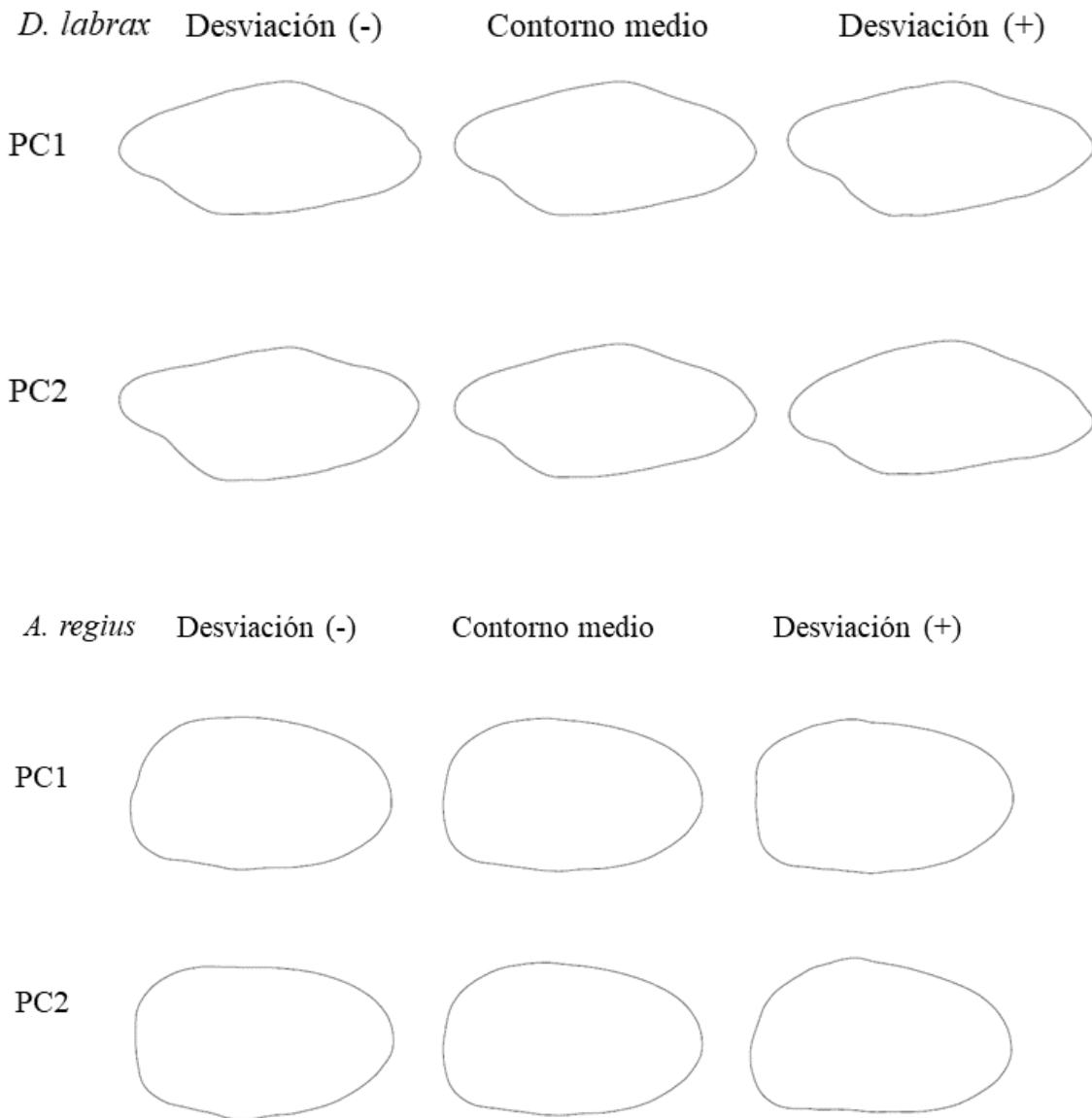


Figura 31. Representación gráfica de los dos primeros componentes principales extraídos a partir de análisis de Fourier para *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* y *Argyrosomus regius* respectivamente. La desviación negativa (-) y positiva (+) expresan el rango de variación del contorno para el componente principal.

Discusión

Según los análisis de componentes principales, tanto para variables descriptoras de contorno como para EFDs, no se encontraron diferencias evidentes entre el contorno de los otolitos pertenecientes a los tres grupos (S, E, C). No obstante, sí es posible distinguir las elipses solapadas (Fig. 25 a 30) y diferencias entre la dispersión de sus respectivos datos. Generalmente y omitiendo outliers, los conjuntos “escape” y “cultivo” poseen dispersiones mayores que “salvaje”, siendo además más semejantes entre sí.

Como se ha anotado anteriormente, en su transición al medio salvaje los individuos se adaptan sufriendo cambios fisiológicos; este fenómeno se conoce como asilvestramiento. El éxito o fracaso en su proceso de adaptación depende de su plasticidad fenotípica o, dicho de otro modo, de la capacidad de su genotipo para expresar fenotipos adecuados para la supervivencia en un nuevo medio. Al contrario que en condiciones salvajes, en medios de cultivo es razonable encontrar una mayor diversidad de fenotipos debido al reducido efecto de la selección natural (ausencia de depredadores, recursos tróficos abundantes, tratamientos profilácticos...). Este hecho podría justificar las diferencias en la dispersión de los grupos “salvaje” y “cultivo”. Por otro lado, la similitud observada entre “escape” y “cultivo” indica la leve o nula modificación de la estructura externa del otolito en el evento de escape. En consecuencia, el otolito se presenta como un elemento relativamente sólido que sufre leves modificaciones en su morfología durante los eventos de escape estudiados en el presente proyecto. Aun así, existen casos aislados en que regiones delgadas y frágiles como la post-cauda y la apertura del ostium (**Fig.32**) se encuentran degradadas, dando lugar a outliers dispersos en los extremos del Componente 1 en los análisis de componentes principales. Las alteraciones observadas en dichas regiones implican anomalías en la deposición mineral de la estructura y pueden encontrarse relacionadas, por ejemplo, con fenómenos puntuales como son los escapes o con las condiciones artificiales de cultivo o bien con el propio desarrollo del órgano auditivo. Para esclarecer la naturaleza de las anomalías advertidas en el contorno es necesario realizar un análisis a largo plazo del crecimiento de la estructura, así como un contraste de la incidencia en función de las condiciones origen del organismo. En definitiva, el patrón de solapamiento entre elipses y el gradiente existente entre ellas advertidos en los análisis de componentes principales reflejan el efecto combinado de la plasticidad fenotípica y la presión ambiental. No obstante, el análisis morfométrico de otolitos puede ser empleado como una herramienta de trazabilidad a medio plazo, siendo más estable que la morfología externa, aunque más variable a largo plazo que la genética de los organismos.

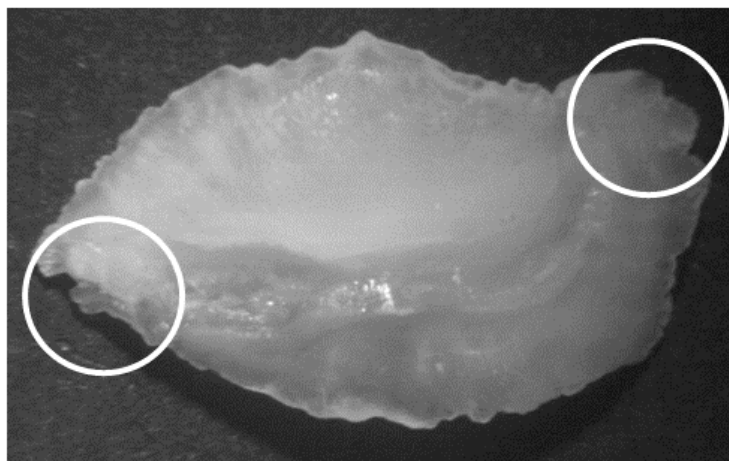


Figura 32. Detalle de otolito: regiones con mayor influencia sobre la variación del contorno en el componente principal 1 de los PCAs realizados. Izquierda: Apertura del ostium. Derecha: Región post-cauda.

Respecto a los resultados de los análisis de función discriminante, la precisión media de la clasificación fue relativamente baja, especialmente en el caso de la lubina. Además, un 16 y 20% de doradas y lubinas salvajes fueron clasificadas como cultivadas. Este hecho puede encontrarse justificado por el diferente tamaño muestral de los grupos de origen, por la equívoca clasificación en base a morfología corporal y/o por procesos de crecimiento o degradación

causantes de anomalías morfométricas, mencionados anteriormente. Nuevamente, la revisión y perfeccionamiento de las técnicas de clasificación morfométrica resultan necesarios en aras de validar su uso y mejorar su precisión. Para ello, es esencial la continua recolección de muestras durante periodos temporales más prolongados que asegure un tamaño muestral mínimo para cada grupo de origen y representativo.

Conclusiones

1. La estructura externa del otolito de dorada posee una naturaleza sólida y relativamente estable frente a transiciones de medio de cultivo a medio salvaje durante periodos temporales a medio plazo. Este hecho lo convierte en un potencial trazador biológico para las especies estudiadas, tratándose de una herramienta de trazabilidad intermedia entre análisis de morfología externa y estudios genéticos.
2. La morfometría de la región post-cauda, de la apertura del ostium y la redondez del otolito son los factores de mayor peso sobre las diferencias entre los grupos de origen Salvaje, Escape y Cultivo. Es necesario realizar un análisis en profundidad sobre el crecimiento somático de la estructura y la posible degradación de dichas regiones.
3. Las técnicas de clasificación morfométrica todavía precisan de perfeccionamiento y validación durante periodos temporales extensos, a fin de obtener un tamaño muestral equilibrado y representativo para cada grupo de origen.

Referencias

- Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Sfakianakis, D. G., y Somarakis, S. (2012). Discriminating farmed gilthead sea bream *Sparus aurata* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* from wild stocks through scales and otoliths. *Journal of Fish Biology*, 80(6), 2159-2175.
- Campana, S. E. (1992). Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 117, 59-71.
- Clayton, J. W. (1981). The stock concept and the uncoupling of organismal and molecular evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1515- 1522.
- DeWitt, T. J., Sih, A. y Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in ecology & evolution*, 13, 2: 77-81.
- Eldson, T. S. y Gillanders, B. M. (2004). Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313(2), 269-284.
- Fernandez-Jover, D. y Sanchez-Jerez, P. (2014). Comparison of diet and otolith growth of juvenile wild fish communities at fish farms and natural habitats. *ICES Journal of Marine Science*, 72, 3: 916-929.

Fleming, I. A., Jonsson, B. y Gross, M. R. (1994). Phenotypic divergence of sea-ranched, farmed, and wild salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(12), 2808-2824.

Geffen, A. J. (1992). Validation of otolith increment deposition rate. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 101, 113.

Gharred, T., Mannai, R., Belgacem, M., y Jebali, J. (2020). Incidence of morphometry variation, growth alteration, and reproduction performance of the annular sea bream (*Diplodus annularis*) as effective tools to assess marine contamination: how useful is a multi-biotimarkers approach?. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 4075-4088.

Gould, S. J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, 41, 4: 587-638.

Hansen, L. P. and Jacobsen, J. A. (2003). Origin and migration of wild and escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in oceanic areas north of the Faroe Islands. *ICES Journal of Marine Science*, 60, 1: 110-119.

Islam, M. S., Ueno, M., y Yamashita, Y. (2009). Otolith microstructure of Japanese sea bass larvae and juveniles: interpretation and utility for ageing. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(4), 423-427.

Iwata H. y Ukai Y, (2002) SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93: 384385.

Kuhl, F. P., y Giardina, C. R. (1982). Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics and image processing*, 18(3), 236-258.

Lleonart, J., Salat, J. y Torres, G. J. (2000). Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 205, 1: 85-93.

Lund, R. A. y Hansel, L. P. (1991). Identification of wild and reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using scale characters. *Aquaculture Research*, 22, 4: 499-508.

Meyer, A. (1987). Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, cichlidae) and their implication for speciation in cichlid fishes. *Evolution* 41: 1357-1369.

Morales-Nin, B. (2000). Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, 46, 1-3: 53-67.

Popper, A. N., Ramcharitar, J. y Campana, S. E. (2005). Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Marine and freshwater Research*, 56, 5: 497-504.

Ramírez-Pérez, J. S., Quiñonez-Velazquez, C., Garcia-Rodriguez, F. J., Felix-Uraga, R. y Melo-Barrera, F. N. (2010). Using the shape of sagitta otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan and Starks, 1895). *Journal of fisheries and aquatic Science*, 5, 2: 82-93.

Shepherd, G. (1991) Meristic and morphometric variation in Black Sea Bass North of Cape Hatteras, North Carolina. *Am. J. Fish. Manag.* 11: 139-149.

Sturrock, A. M., Trueman, C. N., Darnaude, A. M. y Hunter, E. (2012). Can otolith elemental chemistry retrospectively track migrations in fully marine fishes? *Journal of Fish Biology*, 81, 2: 766-795.

Swaine, D. P., Ridell, B. E. y Murray, C. B. (1991). Morphological differences between hatchery and wild populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): environmental versus genetic origin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1783-1791.

Turan, C. (1999). A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: the truss system. *Turkish Journal of Zoology*, 23(3), 259-264.

Tuset, V. M., Lombarte, A., y Assis, C. A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72(S1), 7-198.

Wainwright, P. C. (1996). Ecological explanation through functional morphology: the feeding biology of sunfishes. *Ecology*, 77(5), 1336-1343.

Winans, G. A. (1984). Multivariate Morphometric Variability in Pacific Salmon - Technical Demonstration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1150-1159.

Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data* Cambridge University Press. New York.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Hurley, J. R., & Cattell, R. B. (1962). The Procrustes program: Producing direct rotation to test a hypothesized factor structure. *Behavioral science*, 7(2), 258.

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.

Rohlf, F. J. (2000). TpsUtil-TPS utility program. State University at Stony Brook, Stony Brook, NY.

Rohlf, F. J. (2001). TpsDig, version 1.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York, USA.

Elosegui y Sabater, 2009. Elosegi Ay Sabater S. *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundación BBVA. Abril de 2009.

Pinkas, L.; Oliphant, M. S.; Iverson, I. L. K., 1971: Food habits of albacore bluefin tuna and bonito in California waters. *Cal. Dept. Fish Game Fish Bull.* 152, 1–105

Rosecchi, E.; Nouaze, Y., 1987: Comparaison de cinq indices alimentaires utilisés dans l'analyse des contenus stomacaux. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 49, 111–123.

Williams, M. J. (1981). Methods for analysis of natural diet in portunid crabs (Crustacea:Decapoda:Portunidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 52(1): 103–113. doi: 10.1016/0022-0981(81)90174-X.