

Facultad de ciencias
Departamento de Ciencias de la Navegación y de la Tierra
Área de Paleontología

Utilización del estudio de isótopos estables de C y N en heces de mamíferos en condiciones controladas para la determinación de dieta en animales silvestres

Utilización do estudo de isótopos estables de C e N en feces de mamíferos en condicións controladas para a determinación de dieta en animais silvestres

Using the study of stable isotopes of C and N in feces of mammals under controlled conditions for determining diet in wild animals



María Martínez García

Trabajo de fin de grado

Fecha de defensa: 29 de julio de 2015

Dirigido por: Dra. Aurora Grandal Danglade - Esther Valderrábano Cano

ÍNDICE

Resumen / Summary

1. Introducción	1
1.1. Avances en la investigación	1
1.2. Los isótopos estables.....	1
2. Objetivo: estudio en Marcelle	3
3. Material y métodos.....	4
3.1. Material	4
3.1.1. Especies objeto de estudio	4
3.1.2. Muestras utilizadas.....	11
3.2. Métodos	12
3.2.1. IRMS	14
4. Resultados.....	15
5. Discusión	20
6. Conclusiones / Conclusions	22
7. Bibliografía	24
8. Anexo	26

RESUMEN

Para un estudio de alimentación controlada con herbívoros rumiantes y no rumiantes en cautividad, se realizó un análisis isotópico de carbono y de nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en heces, pelo y alimento. Se utilizó heces y pelo porque proporcionan información diferente (reflejan el consumo del animal a corto y a largo plazo, respectivamente). Con este tipo de análisis se pretende observar si la señal isotópica de las dietas se refleja en ambos tipos de muestras. La composición isotópica de C y de N en el pelo y en las heces es distinta en relación a la dieta.

En el pelo se produce un enriquecimiento de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (+3,07‰ y +4,55‰), coincidiendo con otros estudios. Mientras que en las heces se produce un empobrecimiento para el $\delta^{13}\text{C}$ (-1,51‰), cuyos valores no se ajustan a otros trabajos, y un enriquecimiento para el $\delta^{15}\text{N}$ (+2,35‰). En las heces, el valor de $\delta^{15}\text{N}$ es ligeramente mayor en rumiantes, a excepción del dromedario, que presenta un valor inferior. Una posible explicación a estos resultados puede ser la propia fisiología de los animales y el porcentaje de proteína que contienen las dietas. En el caso de $\delta^{13}\text{C}$, el fraccionamiento es menor en rumiantes, acusado especialmente en el dromedario, donde se plantea que puede ser debido a una variación puntual en las proporciones de su dieta. La causa del resto de variaciones que se observan no se pudo determinar.

ABSTRACT

For a controlled feeding study with ruminants and non-ruminant herbivores in captivity, an isotopic analysis of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) it was performed in feces, hair and food. Feces and hair was used because they provide different information (animal consumption reflect short and long term, respectively). With this type of analysis is aimed to observe if the isotopic diets signal is reflected in both types of samples. The isotopic composition of C and N in the hair and feces is different in relation to the diet.

Hair is enriched in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ (+ 3.07 ‰ and + 4.55 ‰), coinciding with other studies. Whereas the feces are depleted for $\delta^{13}\text{C}$ (-1.51 ‰), values that do not fit into other works, and enriched in the $\delta^{15}\text{N}$ (+ 2.35 ‰). In the feces, the value of $\delta^{15}\text{N}$ is slightly higher in ruminants, except dromedary, which has a lower value. A possible explanation for these results can be own physiology of animals and the percentage of protein that diets contain. In the case of $\delta^{13}\text{C}$, fractionation is lower in ruminants, particularly marked in the dromedary, in which it raises, that may be due to a specific variation in the proportions of its diet. The cause of the other variations observed could not be determined.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN

Los métodos convencionales para estudiar la dieta de los animales silvestres, como por ejemplo la observación directa o ver el contenido estomacal, han servido como base para nuestra actual comprensión sobre las estrategias de forrajeo que toman los distintos animales (Crawford et al., 2008).

Existen técnicas de investigación que utilizan muestras de heces y que aumentaron su uso con el transcurso de los años, debido a que la recogida de las muestras suele ser fácil y no invasiva. Para distinguir las muestras de heces se usan las guías de campo, las cuales disponen de información acerca del tamaño, color y forma para identificarlas (Litvaitis, 2013). En el caso de muestras de herbívoros, se puede identificar de manera macroscópica el material parcialmente digerido como semillas y frutos. Sin embargo, se utilizan otro tipo de análisis como el microhistológico, donde se identifican características celulares y estructuras del alimento ingerido (cutículas, pared celular, estomas, glándulas...), las cuales sobreviven al proceso de masticación y digestión (Litvaitis, 2013).

No obstante, estos métodos presentan limitaciones y sesgos bien descritos (Crawford et al., 2008). Las causas de estas limitaciones pueden ser muy diversas: los transmisores de los satélites son demasiado voluminosos para adaptarse a las especies más pequeñas, falta de personal cualificado, problemas con la vegetación densa que dificulta las observaciones, carencia de financiación, técnicas muy laboriosas, etc (Crawford et al., 2008; Kelly, 2000). Por eso se han ido desarrollando técnicas nuevas y han ido mejorando otras con el paso de los años, como el uso de los isótopos estables.

Los isótopos estables de carbono (C) y de nitrógeno (N) se han utilizado para estudiar la ecología de los animales desde finales de 1970 y su uso ha ido creciendo rápidamente (Kelly, 2000).

El análisis de los isótopos estables se basa en que las proporciones de isótopos estables del C ($\delta^{13}\text{C}$) y del N ($\delta^{15}\text{N}$) en los diferentes tejidos (músculo, hueso, pelo...) reflejan las señales isotópicas de las fuentes de las cuales derivan, es decir, su dieta (Codron y Codron, 2009) y los primeros en demostrar que la composición de isótopos de carbono y de nitrógeno en un individuo (consumidor) era un reflejo directo de su dieta fueron DeNiro y Epstein en 1978, 1981.

1.2. LOS ISÓTOPOS ESTABLES

Los análisis de isótopos estables pueden aportar una gran variedad de información, como las tendencias migratorias que muestran las distintas poblaciones, el comportamiento que presentan a la hora de alimentarse, las dinámicas de las poblaciones, es decir, este tipo de análisis es una herramienta muy útil para el estudio de los individuos (Crawford et al., 2008). De manera que puede proporcionar información que ayude a la hora de hacer frente a problemas asociados con programas de conservación, tanto vida silvestre como cautiva, tales como la

utilización de los recursos, la manipulación de los hábitats, en intervalos a corto y a largo plazo (Codron et al., 2005b).

Los átomos que componen la materia tienen un número fijo de protones y de electrones en cada uno de los elementos, denominado número atómico. Un isótopo es cada uno de esos diferentes átomos de un mismo elemento químico, con un número diferente de neutrones. Los isótopos estables se caracterizan porque no se desintegran con el tiempo (Panarello et al., 2006-2009).

En este estudio se utilizó isótopos estables de carbono y de nitrógeno. El carbono existe en la naturaleza en forma de tres isótopos, denominados como ^{12}C (ligero), ^{13}C (pesado) y ^{14}C (radiactivo, inestable); todos con seis protones y seis, siete y ocho neutrones, respectivamente. En el caso del nitrógeno, en la naturaleza existen dos isótopos, ^{14}N y ^{15}N , de los cuales el más ligero (^{14}N) es el más abundante.

Debido a su diferencia de masa, estos isótopos se comportan de manera diferente en muchos procesos ambientales y fisiológicos, lo que resulta en variaciones en su abundancia relativa (Crawford et al., 2008). La proporción de isótopo ligero y pesado de un compuesto cambia en la transición de un estado físico a otro, o de una composición química a otra, lo que se conoce como fraccionamiento isotópico. La abundancia relativa del isótopo pesado con respecto al ligero se denomina señal isotópica.

La solución para expresar esta señal es mediante la notación delta (δ), que indica cuánto varía la relación isotópica de nuestra muestra con respecto a unos valores estándar. El valor estándar para el carbono procede de una roca denominada Pee Dee Belemnite (PDB) y para el nitrógeno procede del nitrógeno atmosférico (AIR) (Kelly, 2000).

Para calcular la notación δ :

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \times 1000$$

Dónde δ expresa la relación isotópica de la muestra con la estándar y R_{muestra} es la relación del isótopo pesado con el isótopo ligero del elemento. Dado que suelen dar valores muy bajos, se multiplica por 1000 para que los números sean sencillos de manejar (Kelly, 2000).

Si δ da valores positivos, indica que la muestra está enriquecida con el isótopo pesado en relación al estándar, y si δ da valores negativos, indica que la muestra está empobrecida en el isótopo pesado en relación al estándar (Crawford et al., 2008).

Un gran número de estudios sobre alimentación controlada han demostrado coherencia entre $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta y de las heces (Codron y Codron, 2009). Es decir, que la señal isotópica de las heces refleja la dieta de los mamíferos herbívoros y además, el tipo de plantas que consumen, distinguiendo entre plantas C3 (herbáceas, arbustivas y arbóreas de climas templados) y plantas C4 (herbáceas tropicales).

El proceso primario que crea las señales de isótopos de carbono es la fotosíntesis. El carbono fijado por las plantas C3 (con valores $\delta^{13}\text{C}$ más negativos) puede distinguirse del fijado por las plantas C4, porque contienen una menor proporción de isótopo ^{13}C . Esta diferencia se debe a la discriminación de isótopo ^{13}C por la enzima fijadora de CO_2 , la enzima Rubisco presente en las plantas C3. Mientras que las plantas C4, la principal enzima de la fijación del CO_2 es la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que no discrimina los isótopos de ^{13}C con tanta fuerza como las C3, de ahí que tengan valores de $\delta^{13}\text{C}$ más positivos (Kelly, 2000). Además, se ha encontrado que el carbono es generalmente enriquecido entre 1-2‰ cada vez que subimos en los niveles tróficos (Schoeninger y DeNiro, 1984 en Kelly, 2000).

En el caso del nitrógeno, las plantas terrestres lo toman de dos formas, o bien pueden establecer una relación simbiótica con organismos que fijan el nitrógeno del entorno radicular, o bien obtenerlo luego de que se haya fijado por bacterias del suelo. Las primeras se conocen como plantas fijadoras, en cuyo caso el N_2 se fija con poco o ningún fraccionamiento isotópico, y por lo tanto tendrá valores de la $\delta^{15}\text{N}$ próximos a 0‰. Mientras que cuando el N_2 es fijado por las bacterias, su incorporación se efectúa con un importante fraccionamiento, que lleva al enriquecimiento (Panarello et al., 2006-2009). Sin embargo, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de una planta pueden variar en gran medida debido a factores fisiológicos (como los mecanismos de captura del nitrógeno, las diferentes vías de asimilación y reciclaje del N) y factores abióticos (Sponheimer et al., 2003b). Los estudios de Ambrose (1991) (en Codron et al., 2005a) revelan que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ muestran un enriquecimiento gradual del 3-4‰ a lo largo de los diferentes niveles tróficos terrestres.

2. OBJETIVO: ESTUDIO EN MARCELLE

En este trabajo se realizó un estudio de alimentación controlada con animales protegidos en el parque zoológico de Marcelle, dónde se aplicó un análisis isotópico de carbono y nitrógeno en muestras de pelo y heces, para observar si se refleja la dieta en esas muestras.

Se utilizaron heces y pelo porque proporcionan diferente información alimenticia. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ fecales reflejan el consumo de un animal durante un período corto de tiempo, lo que da la oportunidad a los investigadores de poder estudiar las fluctuaciones posibles en la dieta (a corto plazo). Mientras que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de pelo, muestran información de la dieta durante periodos más largos de tiempo (Sponheimer et al., 2003a). Además, las heces también tienen la ventaja de ser fáciles de recolectar en el campo, el muestreo no interfiere en la vida del animal y no es necesaria la muerte de los individuos, es decir, son técnicas no invasivas (Codron y Codron, 2009). Sin embargo, pueden incluir restos de alimentos no digeridos y diversas pérdidas endógenas, como por ejemplo, microbios intestinales, tejido epitelial escamado, enzimas...por lo que las variaciones en su composición isotópica pueden derivar de efectos no dietéticos (Codron et al., 2012).

Para ello se seleccionaron individuos de distintas especies de herbívoros y una especie omnívora, los cuales, se clasificaron en rumiantes y no rumiantes. Los rumiantes presentan fermentación en el intestino anterior, de manera que las

comunidades microbianas del rumen posibilitan el reciclado de los desechos nitrogenados resultantes del metabolismo animal, para sintetizar proteínas nuevas (reciclado de la urea); sintetizan vitamina B y aminoácidos esenciales (Hill et al., 2006). Mientras que los no rumiantes presentan fermentación en el intestino grueso, donde el colon y el ciego contienen comunidades microbianas, las cuales van a formar ácidos grasos (Hill et al., 2006).

Así, clasificándolos de esta manera se pretende ver si los distintos procesos metabólicos pueden llegar afectar o no de alguna manera a la discriminación isotópica de carbono y de nitrógeno, reflejadas en las heces con respecto a la dieta ingerida.

Los resultados de este estudio pueden resultar interesantes ya que pueden contribuir al conocimiento sobre la alimentación y la fisiología de los distintos animales que están incluidos en programas de conservación o en programas de cría en cautividad, como los que se llevan a cabo en el zoo, e incluso con vistas a su futura reintroducción en el medio natural.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

El lugar de estudio fue el parque zoológico de Marcelle, que se encuentra situado en San Martín de Guillar, Outeiro de Rei, Lugo (43°04'09.7"N 7°37'42.0"W). Es un área de gran extensión donde se puede observar hasta 50 especies animales procedentes de una gran variedad de lugares.

Este parque forma parte de la Asociación Ibérica de Zoo y Acuarios (AIZA), y tiene como objetivos principales conservación, investigación y divulgación. Además de colaborar en proyectos como el estudio del control ecológico de los parásitos en fauna salvaje, campañas de sensibilización promovidas por el Instituto Jane Goodall, La fundación AAP (Centro de rescate de animales exóticos), Programa de cría en cautividad (ESB), Estación experimental de zonas áridas (EEZA) y muchos más.

3.1.1. Especies objeto de estudio

Algunos de los ejemplares muestreados en este parque están amenazados o en peligro de extinción por lo que forman parte de algún programa de conservación. Por un lado, el grupo de rumiantes que está integrado por, Ciervo del Padre David, Cobo de agua, Dromedario, Eland o Alce africano, Gacela de Cuvier y Wapití; y por otro, el grupo de no rumiantes formado por Burro africano, Burro común, Cebrá de Burchell, Falabella y Jabalí (tabla 1: clasificación taxonómica).

A continuación se hace una breve descripción (página oficial Parque Zoológico Marcelle Natureza; Dorst y Dandelot, 1973) de cada uno de los animales empleados para realizar el estudio.

Burro africano (*Equus asinus*): mamífero perisodáctilo, con un peso entre 200-300Kg. Es el ancestro del burro doméstico (imagen 1). Su hábitat es variable, encontrándose en montañas, territorios frágosos y llanuras herbáceas. Es monogástrico y se alimenta

básicamente de pastos y de ramoneo. Actualmente sus poblaciones están en declive debido a la caza, degradación del hábitat, competencia con el ganado, e hibridación con asnos domésticos.



Imagen 1: tomada por María Martínez García

Burro común (*Equus asinus*): mamífero perisodáctilo, con una altura de 1'10m y un peso muy variado, entre 180-400Kg. El burro común es un animal doméstico (imagen 2) y puede estar presente prácticamente en cualquier hábitat. Es monogástrico y su alimentación puede ser tanto de ramoneo como de pasto. Actualmente se puede encontrar en cualquier parte del mundo.

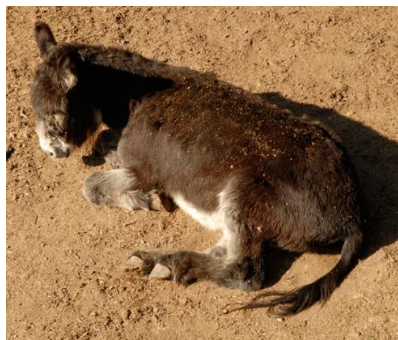


Imagen 2: tomada de la página oficial de Marcelle

Cebra de Burchell (*Equus quagga burchellii*): mamífero artiodáctilo, con una altura de 1'27-1'50m y un peso entre 230-300Kg. Su coloración es blanca con rayas, y presentan rayas más débiles de color marrón entre las de color marrón oscuro, lo que la hace característica y la diferencia de las demás (imagen 3).

Habita en llanuras herbáceas y zonas boscosas con suelos bien cubiertos de hierba. Es un animal monogástrico que principalmente pasta hierba (C4), pero ocasionalmente ramonea hojas de los árboles y de los matorrales (C3). Se encuentra distribuida en toda África.



Imagen 3: tomada de la página oficial de Marcelle

Ciervo del Padre David (*Elaphurus davidianus*): mamífero artiodáctilo, que pesa entre 150-200Kg. Se caracteriza por tener una cabeza y un morro afilado, con orejas de pequeño tamaño (imagen 4).

Originario de China, se ignora cuál era su distribución original en estado salvaje, porque ya se había extinguido en libertad cuando fue estudiado por primera vez en Occidente. Es un animal rumiante que probablemente se encontraba en zonas pantanosas y húmedas, alimentándose de hierba y posiblemente de plantas acuáticas.



Imagen 4: tomada de la página oficial de Marcelle

Cobo de agua (*Kobus ellipsiprymnus*): mamífero artiodáctilo, que puede llegar a medir 1'35m de altura y pesar entre 220-270Kg (imagen 5). Está presente en zonas boscosas, habitualmente nunca lejos del agua y suele pastar en zonas abundantes en hierba y con cobertura vegetal. Son animales rumiantes que se pueden encontrar en Kenia, Tanzania, Etiopía y Sudán.



Imagen 5: tomada de la página oficial de Marcelle

Dromedario (*Camelus dromedarius*): mamífero artiodáctilo, con una altura entre 1´8-2m, llegando a pesar hasta 500-700Kg. Presentan adaptaciones morfológicas a climas desérticos y áridos (imagen 6).

Pueden ramonear arbustos y herbáceas o pastar hierba, incluso plantas salobres. Es originario de Arabia e introducido en Asia occidental y en África septentrional, pero se encuentra extinto en estado salvaje.

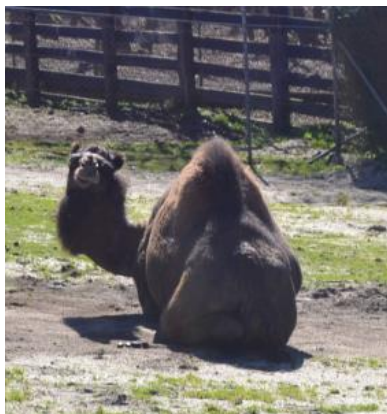


Imagen 6: tomada por María Martínez García

Eland o Alce Africano (*Taurotragus oryx*): es un mamífero artiodáctilo, que puede llegar a medir 1´78m de altura y puede pesar entre 600-700Kg, siendo el antílope más grande (imagen 7). Están presentes en todo tipo de hábitats, como sabanas, llanuras abiertas, selvas claras y praderas montañosas.

Especie rumiante, ramoneador que se alimenta de hojas y arbustos, aunque pueden alimentarse del algún fruto o alguna gramínea ocasionalmente. El animal resulta interesante porque engorda fácilmente y sus productos (carne, leche) son excepcionales, de ahí que se quiera domesticar en lugares con pocos recursos alimenticios.



Imagen 7: tomada de la página oficial de Marcelle

Falabella (*Equus ferus caballus*): mamífero perisodáctilo, con una altura entre 70-75cm y un peso de 70-80Kg (imagen 8). En realidad son verdaderos caballos (monogástricos) pero en miniatura (fruto de cruzamientos y selección de animales de talla pequeña) y no un poni como se puede pensar, presentando una gran variedad según la raza utilizada.

Es originario de Argentina y habitan en zonas donde esté el ser humano, siendo probablemente pastadores de plantas herbáceas.



Imagen 8: tomada de la página oficial de Marcelle

Gacela de Cuvier (*Gazella cuvieri*): mamífero artiodáctilo, que puede pesar hasta los 35Kg (imagen 9). Rumiante presente en sabanas, aunque pueden aparecer en selvas abiertas y zonas montañosas, pastando hierba. Se pueden encontrar en Marruecos, Túnez y Argelia.

Este animal está amenazado por lo que el parque ha firmado un acuerdo con EEZA para el programa de recuperación. El principal objetivo de este programa es la cría en cautividad de 4 especies extinguidas de ungulados procedentes del Norte de África, entre ellos la gacela de Cuvier.



Imagen 9: tomada de la página oficial de Marcelle

Jabalí (*Sus scrofa*): mamífero artiodáctilo, con una altura de 80cm y un peso variado, entre 40-90Kg, dependiendo del sexo (imagen 10).

Presentes en cualquier hábitat donde haya una mínima cobertura vegetal y alimento. Se caracteriza por ser omnívoro monogástrico, ya que presenta una alimentación variada como raíces, maíz, trigo, fruta, peces, crustáceos, insectos, etc.



Imagen 10: tomada por María Martínez García

Wapití (*Cervus canadensis*): mamífero artiodáctilo. Rumiante que puede pesar hasta 300-350Kg (imagen 11).

Están presentes en regiones montañosas con zonas de bosque y pastos, suelen ser animales que pastan, alimentándose preferentemente de hierba. Se pueden localizar desde el sur de Canadá hasta el norte de México.

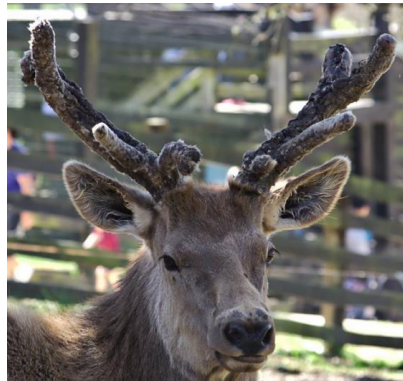


Imagen 11: tomada de la página oficial de Marcelle

Tabla 1: clasificación taxonómica de los animales muestreados en Marcelle (Nowak, 1999).

ORDEN ARTIODACTYLA

- Suborden Cetruminantia (Rumiantes)
 - Familia Bovidae
 - Subfamilia Bovinae
 - *Taurotragus oryx* PALLAS 1766 (Eland o Alce africano)
 - Subfamilia Reduncinae
 - *Kobus ellipsiprymnus* OGILBY 1833 (Cobo de agua)
 - Subfamilia Antilopinae
 - *Gazella cuvieri* OGILBY, 1841 (Gacela de Cuvier o del Atlas)
 - Familia Cervidae
 - Subfamilia Cervinae
 - *Cervus canadensis* ERXLEBEN 1777 (Wapití)
 - *Elaphurus davidianus* MILNE-EDWARDS 1866 (Ciervo del P. David)
- Suborden Tylopoda
 - Familia Camelidae
 - Subfamilia Camelinae
 - *Camelus dromedarius* LINNAEUS 1758 (Dromedario)
- Suborden Suina
 - Familia Suidae
 - Subfamilia Suinae
 - *Sus scrofa* LINNAEUS 1758 (Jabalí)

ORDEN PERISSODACTYLA (Owen, 1848)

- Suborden Hippomorpha Wood, 1937
 - ✓ Superfamilia Equoidea
 - Familia Equidae
 - Subfamilia Equinae
 - *Equus ferus caballus* LINNAEUS 1758 (Caballo Falabella)
 - *Equus asinus* HEUGLIN & FITZINGER 1866 (Asno salvaje africano)
 - *Equus asinus* LINNAEUS 1758 (Asno doméstico)
 - *Equus quagga burchellii* GRAY 1824 (Cebra de Burchell)

3.1.2 Muestras utilizadas

Las muestras de heces y pelo se recolectaron en el parque, durante la mañana del 6 de marzo del año 2015, utilizando botes y bolsas de plástico herméticos para su guardado. Las heces que se escogieron fueron las más frescas posibles y se obtuvieron muestras de cada una de las especies. Sin embargo, en el caso del pelo no fue posible, ya que su obtención es más dificultosa, debido a que muchos de los animales no son muy accesibles (tabla 2).

Tabla 2: muestras de heces y pelo recogidas de los animales objeto de estudio.

Especies	Heces	Pelo
Ciervo del Padre David	Si	Si
Cobo de agua	Si	No
Dromedario	Si	Si
Eland	Si	No
Gacela de Cuvier	Si	Si
Wapití	Si	Si
Burro africano	Si	Si
Burro común	Si	Si
Cebra de Burchell	Si	No
Falabella	Si	Si
Jabalí	Si	Si

Cada animal se encuentra en su respectivo recinto, con el alimento y el agua disponible de manera “ad libitum”, es decir, ninguno de los ejemplares presenta una alimentación con cantidades estrictas. El alimento fue muestreado en el propio parque a excepción de la fruta, verdura y pan, que son de origen comercial, al igual que los utilizados en el parque (tabla 3).

Tabla 3: listado de los alimentos muestreados y anotaciones de su procedencia.

Alimento	Procedencia
Espinaca	Comercial
Heno (sin ensilar)	Parque de Marcelle
Hierba	Parque de Marcelle
Manzana	Golden del país, comercial
Pan	Blanco comercial
Pera	Conferencia, comercial
Pienso de équido	Parque de Marcelle
Pienso de rumiante	Parque de Marcelle
Pienso de suido	Parque de Marcelle
Zanahoria	Comercial

Posteriormente se anotó las dietas correspondientes a cada una de las especies, que distan mucho de la dieta en estado salvaje (Tabla 4).

Tabla 4: datos de la alimentación de cada uno de los ejemplares muestreados.

Especie	Alimentación en Marcelle
Ciervo Padre David	Pienso de rumiante, heno, hierba
Cobo de agua	Pienso de rumiantes, heno, hierba
Dromedario	Pienso de rumiante, heno
Eland	Pienso de rumiante, heno, hierba
Gacela Cuvieri	Pienso de rumiante, heno, hierba
Wapití	Pienso de rumiante, heno, hierba
Burro africano	Pienso de équido, heno, pan, fruta de temporada (esporádica)
Burro común	Pienso de équido, heno, verdura y/o fruta de temporada (esporádica)
Cebra de Burchell	Pienso de équido, heno
Falabella	Pienso de équido, heno
Jabalí	Pienso de suido, fruta y verdura de temporada (cada dos días)

3.2 MÉTODOS

Una vez que se obtienen todas las muestras de heces, pelos y alimentos se realizaron los siguientes tratamientos para poder llevar a cabo el análisis IRMS.

Los alimentos y las heces, las cuales se examinaron para limpiar y eliminar cualquier resto de partícula inorgánica, se colocaron en una estufa a 80°C durante 48 horas aproximadamente para desecarlas (Codron et al., 2005a). Como algunas muestras de alimentos (manzana, pera y zanahoria) tardaron en desecar, estuvieron 48 horas más a 35°C y posteriormente, para facilitar su procesado, estuvieron un día en congelación.

Una vez que las muestras estuvieron secas, tanto heces como alimento se pulverizaron con un mortero de piedra (puesto que otro tipo de material puede contaminar la muestra) y se pasaron a través de un tamiz (imagen 12), para obtener una mayor homogeneización (requisito para el posterior análisis). Sin embargo, el heno se cortó con unas tijeras (imagen 13), ya que la utilización del mortero no era adecuada por su consistencia fibrosa.



Imágenes 12 y 13, respectivamente: tomadas por María Martínez García

Una vez que se obtuvieron todas las muestras pulverizadas (imagen 14) se colocaron en tubos Eppendorf (imagen 15) y se pesaron para tener una referencia de la cantidad de muestra obtenida.



Imágenes 14 y 15, respectivamente: tomadas por María Martínez García

En el caso del pelo se realizó un tratamiento previo modificado (Hobson y Quirk, 2014) para eliminar cualquier resto de suciedad, sustancias ajenas o sustancias propias del animal como la grasa animal, de forma que sólo quede la queratina, proteína que se utilizará para medir la señal isotópica.

Se seleccionaron de 2 a 3 pelos (quitándoles la raíz) de cada ejemplar y se colocaron en un tubo de cristal. Se realizaron dos lavados de 1 hora con ultrasonidos (utilizando una solución preparada, Metanol : Cloroformo proporción 2:1), de manera que siempre que se acaba un lavado que reemplazar la solución por una nueva. Finalizado los lavados, se retiró la solución del tubo y en su lugar se añadió agua destilada, y se volvieron a lavar los pelos dos veces más con ultrasonidos durante 20 min (imagen 16). A continuación se retiró el agua de los tubos y se colocaron en una estufa (a 35°C) para que se secan.

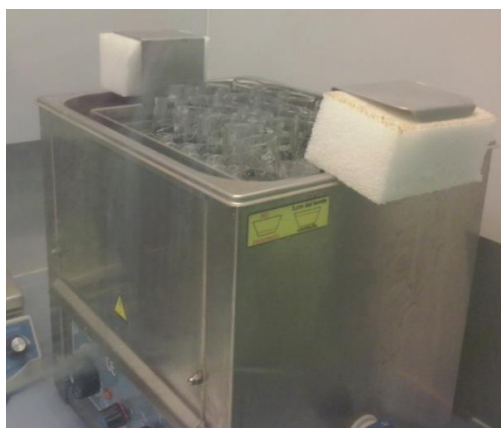


Imagen 16: tomada por María Martínez García.

Después de preparar todas las muestras de heces, pelos y alimentos se mandaron a analizar a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Coruña, para realizar el análisis IRMS y obtener los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de cada muestra.

3.2.1 IRMS

La espectrometría de masas para la medida de relaciones isotópicas de isótopos estables (IRMS) permite obtener información sobre la abundancia isotópica del carbono y del nitrógeno.

Las muestras pulverizadas se colocan en cápsulas de estaño (se conoce el peso del contenido) y por combustión se liberan los distintos gases que componen la muestra. Los gases serán ionizados y posteriormente separados por un analizador magnético.

El campo magnético se mantiene fijo y al final de la trayectoria de cada haz iónico se colocan colectores múltiples de copa de Faraday, donde se verán cuantificadas las señales producidas por los isótopos ligeros y pesados. Por lo tanto, en el espectrómetro de masas se medirá la relación entre las señales producidas por los haces iónicos que corresponden a los isótopos ligeros y pesados de la muestra gaseosa y la de la referencia (estándar).

En este caso, se analizaron los gases CO_2 y N_2 resultantes para relaciones de isótopos de carbono y nitrógeno estables, respectivamente, utilizando este sistema. Cada muestra se midió por duplicado. Las relaciones $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ se expresaron en notación delta convencional (δ) en partes por mil (‰) en relación con los estándares de PDB y N_2 , respectivamente.

4. RESULTADOS

A continuación se reflejan en 3 tablas los resultados obtenidos de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para las muestras de heces (tabla 5), alimento (tabla 6) y pelo (tabla 7). Los valores son la media de las dos mediciones efectuadas.

Tabla 5: resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para muestras de heces.

Muestras	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Ciervo del Padre David	-28,30	6,57
Cobo de agua	-28,74	4,93
Dromedario	-30,14	4,60
Eland	-28,68	4,38
Gacela de Cuvier	-27,30	5,27
Wapití	-29,68	4,55
Burro africano	-29,96	5,17
Burro común	-29,92	4,71
Cebra de Burchell	-29,70	5,04
Falabella	-30,03	6,85
Jabalí	-26,60	4,90

Para la muestra de heces de rumiantes, la media de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ es de $-28,81 \pm 1,01$ y de $\delta^{15}\text{N}$ es de $5,1 \pm 0,81$. En cambio, para la muestra de no rumiantes, la media de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ es de $-29,24 \pm 1,48$ y de $\delta^{15}\text{N}$ es de $5,33 \pm 0,86$.

Tabla 6: resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para muestras de alimento.

Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Espinaca (ESPI)	-27,08	4,27
Heno	-29,79	3,90
Hierba	-32,04	-0,39
Manzana (MANZ)	-28,07	1,84
Pan	-23,46	4,02
Pera	-29,02	1,71
Pienso de équido (P. EQUI)	-24,64	2,73
Pienso de rumiante (P. RUMI)	-23,32	3,26
Pienso de suido (P. CERDO)	-23,51	3,51
Zanahoria (ZANA)	-27,75	2,94

Tabla 7: resultados de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para muestras de pelo

Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Ciervo Padre David	-24,07	7,99
Dromedario	-23,98	7,09
Gacela de Cuvier	-22,70	7,80
Wapití	-24,53	7,53
Burro africano	-24,86	7,00
Burro común	-28,04	-
Falabella	-26,44	6,89
Jabalí	-23,14	7,62

Si se representan los datos de las tablas 5,6 y 7 mediante un gráfico de dispersión, en el cual se refleja $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) en el eje horizontal y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) en el eje vertical, se obtienen las siguientes gráficas (figura 1, 2 y 3).

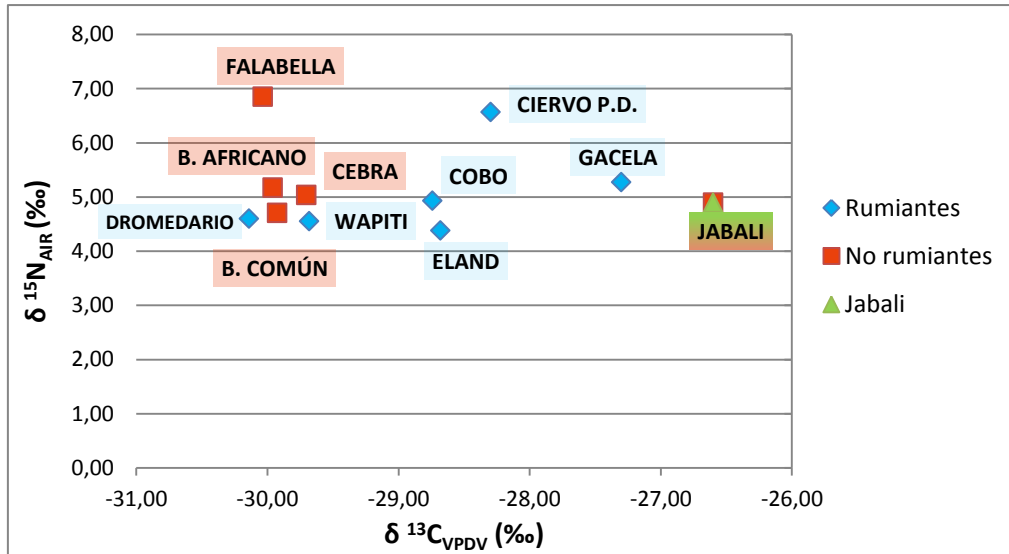


Figura 1: representación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) vs $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para heces. Los símbolos azules representan a los animales rumiantes y los símbolos rojos, los no rumiantes. El jabalí aparece con dos colores, rojo por ser no rumiante y verde por su carácter omnívoro.

Los valores son muy similares y no hay ninguno que destaque; el grupo de no rumiantes tiende a agruparse en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$, a excepción del Jabalí. Mientras que los datos de los animales rumiantes no siguen ninguna tendencia, aparecen dispersados.

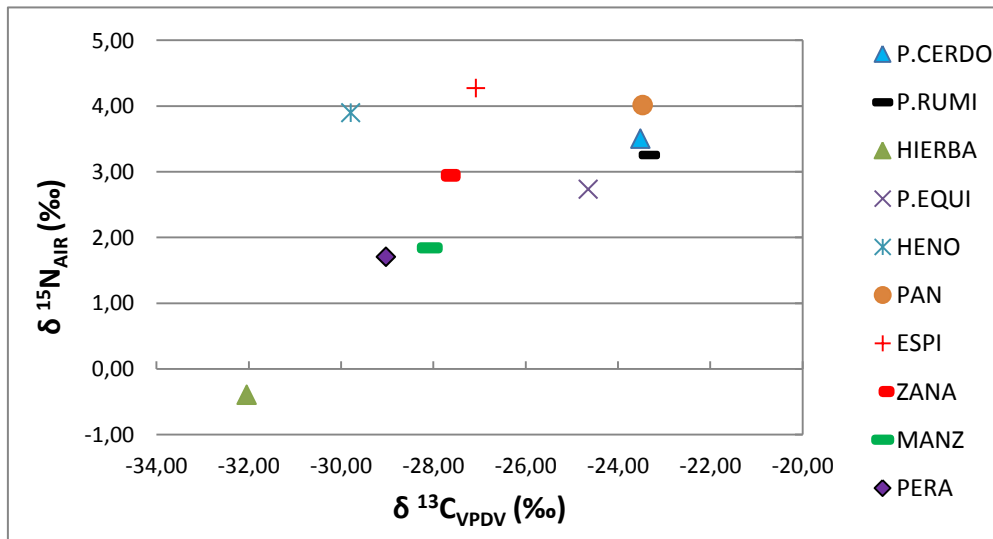


Figura 2: representación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) vs $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para alimento. Cada símbolo representa un alimento distinto.

Los valores de δ son muy similares entre los distintos alimentos, salvo el dato de la hierba, que tiene un valor más negativo para el $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y el $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰).

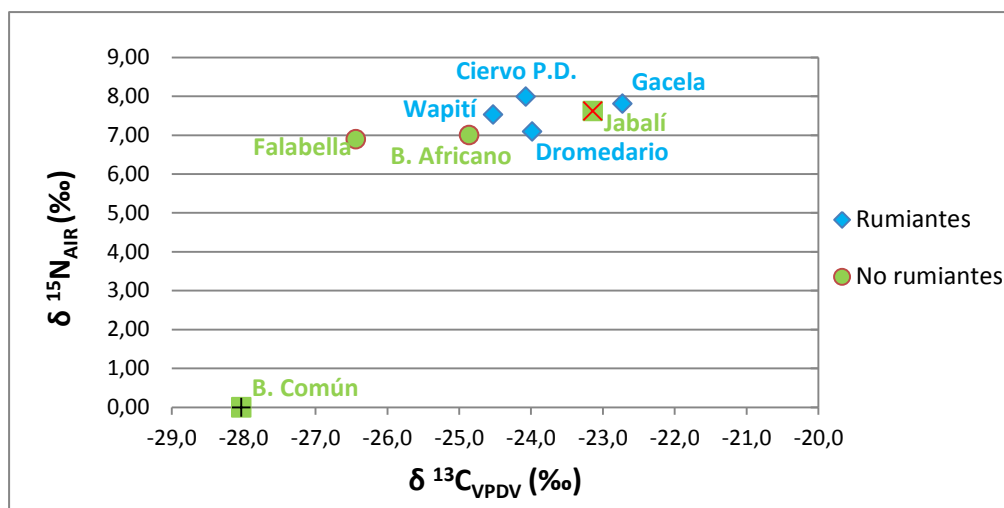


Figura 3: representación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) vs $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para pelo. Los símbolos azules son los animales rumiantes y los símbolos verdes los no rumiantes. El burro común aparece representado sólo en el eje horizontal porque no se obtuvo datos del $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) y el jabalí presenta una x roja por su carácter de omnívoro).

Cada individuo tiene una dieta distinta, que se refleja en la tabla 4, anteriormente comentada. La mayoría de las dietas presentan las mismas proporciones de alimentos (50% para cada componente de la dieta, es decir, se hace una media con todos los valores de los componentes de la dieta). Sin embargo el burro común, el burro africano y el jabalí, presentan una pequeña variación ya que son las dietas más variadas de entre los individuos, por lo que se realiza un cálculo según la proporción de cada tipo de alimento (tabla 8).

Tabla 8: cálculo de las proporciones de los componentes de las dietas. Los datos de la verdura y de la fruta proceden de la media de los valores de zanahoria + espinaca y manzana + pera, respectivamente.

Especie	Proporciones (%)
Burro africano	Pienso équido (35%), heno (35%), pan (20%), fruta (10%) $\delta^{13}\text{C} = (-24,64 \times 0,35) + (-29,79 \times 0,35) + (-23,46 \times 0,2) + (-28,55 \times 0,1) = -26,59$ $\delta^{15}\text{N} = (2,73 \times 0,35) + (3,90 \times 0,35) + (4,02 \times 0,2) + (1,76 \times 0,1) = 3,31$
Burro común	Pienso équidos (45%), heno (45%), verdura (5%), fruta (5%) $\delta^{13}\text{C} = (-24,64 \times 0,45) + (-29,79 \times 0,45) + (-27,41 \times 0,05) + (28,55 \times 0,05) = -27,29$ $\delta^{15}\text{N} = (2,73 \times 0,45) + (3,90 \times 0,45) + (3,61 \times 0,05) + (1,78 \times 0,05) = 3,25$
Jabalí	Pienso suido (50%), fruta (25%), verdura (25%) $\delta^{13}\text{C} = (-23,51 \times 0,5) + (-28,54 \times 0,25) + (-27,41 \times 0,25) = -25,74$ $\delta^{15}\text{N} = (3,51 \times 0,5) + (1,76 \times 0,25) + (3,61 \times 0,25) = 3,10$

Una vez calculados los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) de la dieta (tabla 9), se representan en dos gráficos los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de heces, pelo y dieta. En uno de los gráficos (figura 4) se va a comparar como varían las señales isotópicas de los tres tipos de muestra, y en el otro gráfico (figura 5) se va a comparar como varían los rumiantes con respecto a los no rumiantes, para comprobar si siguen una tendencia o no, debida a su diferente fisiología.

Tabla 9: datos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ para la dieta, de todos los animales muestreados.

Muestras	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰)
Ciervo del Padre David	-28,38	2,25
Cobo de agua	-28,38	2,25
Dromedario	-26,55	3,58
Eland	-28,38	2,25
Gacela de Cuvier	-28,38	2,25
Wapití	-28,38	2,25
Burro africano	-26,59	3,31
Burro común	-27,29	3,25
Cebra de Burchell	-27,21	3,31
Falabella	-27,21	3,32
Jabalí	-25,74	3,10

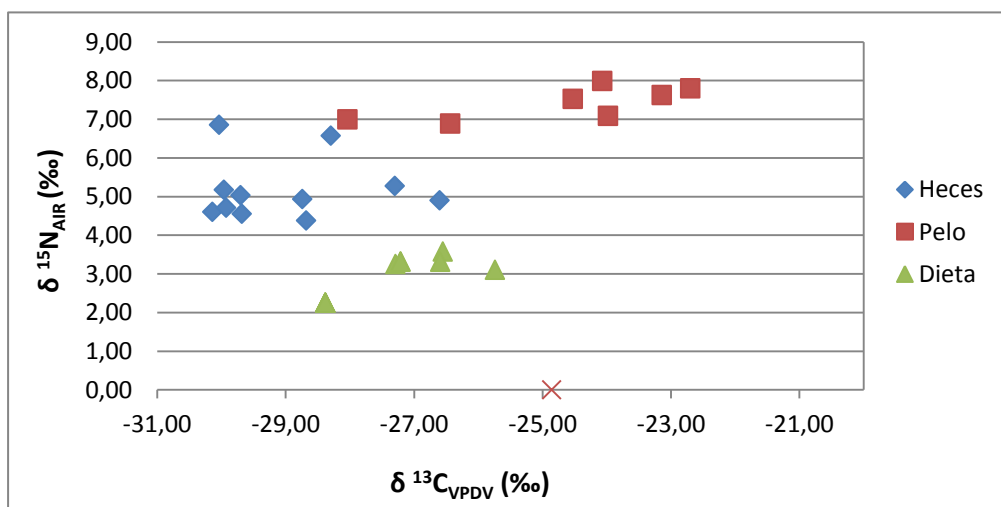


Figura 4: representación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para heces, pelo y dieta. El rombo azul corresponde a valores de heces, el cuadrado rojo a valores de pelo y el triángulo verde a valores de dieta. El burro común aparece con una x roja debido a que falta el valor de $\delta^{15}\text{N}$ correspondiente al pelo.

Los valores tienden agruparse en tres grupos, cada uno correspondiente al tipo de muestra.

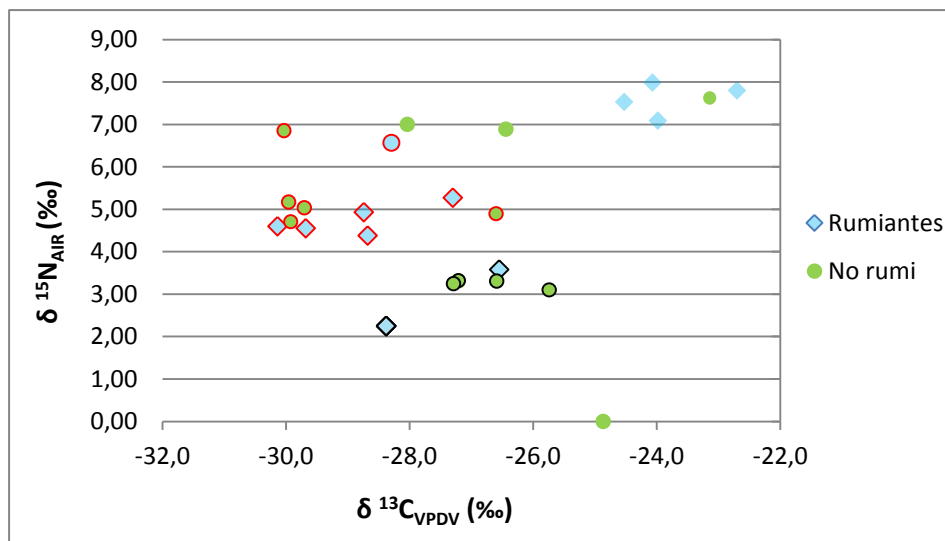


Figura 5: representación de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ (‰) y $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) para heces, pelo y dieta. Los valores de los rumiantes están representados con rombos azules claros y los no rumiantes con círculos verdes. Rombos y círculos con línea negra representan los valores de la dieta, rombos y círculos con línea roja representan los valores de las heces, y rombos y círculo sin línea de color representan los valores de los pelos. El burro común aparece con círculo verde aislado porque falta el valor de $\delta^{15}\text{N}$ para pelo).

En la figura 5 no se observa entre los animales rumiantes y los no rumiantes una diferencia clara, ya que los valores de unos y de otros se solapan sin seguir una tendencia.

Como se observan en las gráficas, los valores de δ tanto para el ^{13}C como para el ^{15}N varían, por lo que existe un fraccionamiento isotópico, ya sea un enriquecimiento o un empobrecimiento de las distintas muestras (heces y pelo) en relación a la dieta que los animales consumen (tabla 10 y 11).

Tabla 10: resultados del fraccionamiento de $\Delta^{13}\text{C}_{\text{dieta-heces}}$ (‰) y $\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-heces}}$ (‰).

Muestra	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{dieta-heces}}$ (‰)	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-heces}}$ (‰)
Ciervo Padre David	+0,08	+4,32
Cobo de agua	-0,36	+2,68
Dromedario	-3,59	+1,02
Eland	-0,30	+2,13
Gacela de Cuvier	+1,08	+3,02
Wapití	-1,30	+2,30
Media (rumiantes)	-0,73	+2,58
Burro africano	-3,37	+1,86
Burro común	-2,63	+1,46
Cebra de Burchell	-2,49	+1,73
Falabella	-2,82	+3,53
Jabalí	-0,86	+1,80
Media (monogástricos)	-2,43	+2,08

El fraccionamiento de ^{13}C dieta-heces se empobrece con una media de $-1,51 \pm 1,56$ y los valores de fraccionamiento ^{15}N dieta-heces se enriquece con una media de $+2,35 \pm 0,97$.

Tabla 11: resultados del fraccionamiento de $\Delta^{13}\text{C}$ dieta-pelo (‰) y $\Delta^{15}\text{N}$ dieta-pelo (‰). No se tuvo en cuenta los datos del burro común a la hora de hacer las medias por estar incompletos.

Muestra	$\Delta^{13}\text{C}$ dieta-pelo (‰)	$\Delta^{15}\text{N}$ dieta-pelo (‰)
Ciervo Padre David	+4,31	+5,74
Dromedario	+2,57	+3,51
Gacela de Cuvier	+5,68	+5,55
Wapití	+3,85	+5,28
Burro africano	+1,73	+3,69
Burro común	-0,75	-
Falabella	+0,77	+3,57
Jabalí	+2,60	+4,52

El fraccionamiento ^{13}C dieta-pelo se enriquece con una media de $+3,07 \pm 1,66$ y el fraccionamiento de ^{15}N dieta-pelo se enriquece con una media de $+4,55 \pm 0,98$.

5. DISCUSIÓN

Este estudio de animales en cautividad con alimentación controlada, está basado en un análisis isotópico de carbono y de nitrógeno en alimentos, heces y pelo, para ver si estos últimos reflejan la composición isotópica de la dieta y, en la medida de lo posible, calcular el fraccionamiento que se pueda producir.

En el pelo se produce un enriquecimiento tanto en $\delta^{13}\text{C}$ como en el $\delta^{15}\text{N}$ (medias= $+3,07\text{‰}$ y $+4,55\text{‰}$, respectivamente). En diversos estudios en mamíferos, el valor medio de $\delta^{13}\text{C}$ es de $+3,2\text{‰}$ (Sponheimer et al., 2003a) y el valor medio de $\delta^{15}\text{N}$ oscila entre $4 - 6,5\text{‰}$ (Sponheimer et. al, 2003b), por lo tanto, ambos valores obtenidos en este estudio muestran las mismas tendencias según lo estimado en otros trabajos.

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las heces son distintos que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta, por lo que se produce fraccionamiento isotópico.

El fraccionamiento de $\delta^{15}\text{N}$ dieta-heces se enriquece con un promedio de $+2,35\text{‰} \pm 0,37$, el cual entra dentro de lo esperado si consultamos estudios anteriores (Kelly, 2000; Codron y Codron, 2009), ya que el enriquecimiento oscila entre $1-5\text{‰}$.

Si se compara el fraccionamiento de $\delta^{15}\text{N}$ dieta-heces que se produce en animales ruminantes y no ruminantes, el fraccionamiento es ligeramente mayor en ruminantes (medias = $+ 2,58$ y $+2,08$, respectivamente). Esto coincide con otros trabajos (Codron y Codron, 2009), que muestran las mismas tendencias.

A pesar de que la mayoría de los estudios consultados reflejan las mismas tendencias, la causa del fraccionamiento del ^{15}N no está clara. El estrés hídrico y nutricional (factores externos) contribuyen a las variaciones en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en animales salvajes (Kelly, 2000; Codron et al., 2005a), pero en este estudio, donde las condiciones de alimentación e hidratación son similares y están controladas, sigue produciéndose fraccionamiento. Otros factores como la edad, el sexo, el estado reproductivo (Crawford et al., 2008) también pueden influenciar en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ pero en este caso estos factores no se tuvieron en cuenta en principio.

Según Codron et al. (2005a), el % de proteína de la dieta influye en los valores de $\delta^{15}\text{N}$, ya que las dietas con alto contenido en proteína dan valores más altos de $\delta^{15}\text{N}$. En este estudio parece cumplirse esta hipótesis ya que los rumiantes tienen mayor contenido de proteína en sus dietas (media=12,1%) y presentan un mayor fraccionamiento (media=+2,58) que los no rumiantes (media % proteína=8,81%; media $\Delta^{15}\text{N}$ dieta-heces= + 2,08; datos recogidos de las bases de datos "pastos españoles (seep)/alimentos para animales y base de datos Española de Composición de Alimentos, EDCA, reflejados en las tablas 1, 2 y 3 del anexo).

Además, hay que añadirle las características propias del animal, ya que los rumiantes presentan un metabolismo digestivo más complejo y el reciclado de la microflora intestinal también contribuye a producir valores de $\delta^{15}\text{N}$ más altos en las heces (Codron et al., 2009). Este enriquecimiento se observa en todos los rumiantes excepto en el dromedario (+1,02‰) que, aunque presenta este tipo de fisiología digestiva, pertenece a la familia Camelidae, mientras que los otros rumiantes son de la familia Bovidae. Existe una importante diferencia anatómica entre ambas en cuanto a su aparato digestivo, ya que los bóvidos presentan un estómago de cuatro cámaras, mientras que los camélidos sólo tienen tres (Fowler, 2009). Esto, junto con la posibilidad de que la microflora digestiva del dromedario sea diferente a la de los bóvidos (por su separación filogenética), puede explicar la diferencia observada en el fraccionamiento dieta-heces.

En cuanto a los no rumiantes, que en este caso coinciden con los animales con menor proporción de proteína en la dieta, presentan un fraccionamiento menor (media de +2,08‰) salvo el caballo Falabella (+3,53‰). En este caso es difícil interpretar esta diferencia, ya que no hay diferencias anatómicas o fisiológicas con los otros équidos, excepto las que pudieran proceder de sus condiciones físicas, pues es un animal de edad avanzada.

En el caso de ^{13}C , las heces están empobrecidas en este elemento, con una media de $-1,51\text{‰} \pm 1,56$. Estos datos no coinciden con otros estudios, donde el fraccionamiento medio de dieta-heces es de $-0,8\text{‰}$ (Sponheimer et al., 2003a; Codron y Codron, 2009).

En estudios de alimentación controlada de animales salvajes, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ fecales reflejan la composición isotópica de la dieta (basada en plantas C3 y C4), con cierto grado de discriminación (Codron et al., 2005b). Es decir, gracias a los valores isotópicos de las heces se puede saber si un animal ingiere plantas C3 o C4.

Las diferencias de fraccionamiento entre individuos en el caso de animales salvajes se pueden atribuir a las variaciones de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de las plantas; bien por la ruta fotosintética tomada por la planta, o bien por la ingesta de distintas partes de una misma planta (hojas, semillas, frutos, etc) que presentan composiciones isotópicas distintas (Codron y Codron, 2009) y se ven reflejadas en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de las heces. En este estudio, donde los animales están en cautividad, no se puede aplicar estas hipótesis puesto que no hay tal variedad en las dietas.

Si se compara el fraccionamiento de $\delta^{13}\text{C}$ dieta-heces en rumiantes y no rumiantes, hay variaciones (-0,73‰ y -2,43‰, respectivamente). Sin embargo, en otros trabajos (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015; Sponheimer et al., 2003a) no se ven diferencias significativas entre ambos grupos. En este caso no podemos determinar si las diferencias que se aprecian son significativas, ya que el número de muestras es muy limitado. Se podría pensar que la fisiología de los rumiantes, podría ser una de las causas de las diferencias entre los fraccionamientos. Sin embargo, estudios sobre la asimilación de los alimentos (procesos digestivos) en los distintos componentes gastrointestinales, muestran que la señal isotópica del C no presenta diferencias significativas a lo largo del tracto digestivo (Codron et al., 2012), por lo que no influyen en la señal isotópica de las heces.

Por lo tanto, las diferencias observadas entre rumiantes y monogástricos no tienen una explicación clara desde el punto de vista fisiológico. Una posible causa a las variaciones en el fraccionamiento de ^{13}C puede ser que los animales hayan ingerido algún alimento que no esté controlado por el personal del parque y que se refleje en las heces, puntualmente, coincidiendo con el momento de muestreo. De tal manera que hubiese cambiado las proporciones de la dieta consumida, por ejemplo el dromedario, el cual pudo haber consumido más heno de lo habitual, de ahí que presente un valor de $\delta^{13}\text{C}$ más negativo. Por este motivo, para estos estudios sería recomendable hacer un seguimiento prolongado en el tiempo.

6. CONCLUSIONES

- La composición isotópica de carbono y nitrógeno en el pelo es distinta respecto a la dieta. Se produce un enriquecimiento de ambos elementos, que entra dentro de lo estimado en otros trabajos.
- La proporción de isótopos estables de carbono y nitrógeno de las heces son distintas en relación a las dietas. Se produce fraccionamiento isotópico, el cual, en las heces provoca un empobrecimiento en ^{13}C y un enriquecimiento de ^{15}N .
- El fraccionamiento de $\delta^{15}\text{N}$ fecal es ligeramente mayor en rumiantes que en monogástricos. Se da la coincidencia de que su dieta también es mayor en porcentaje de proteínas, por lo que ambos factores podrían explicar la variación observada en el fraccionamiento.
- El fraccionamiento de $\delta^{13}\text{C}$ en las heces es menor en rumiantes que en los no rumiantes (valores menos negativos), pero las hipótesis propuestas en la literatura para explicar las variaciones de fraccionamiento entre los individuos no ayudan a resolver esta observación.

- Las heces del dromedario presentan cierta singularidad. El valor de $\delta^{15}\text{N}$ es inferior que el resto de rumiantes, pudiendo ser causado por la propia fisiología del animal, y el valor de $\delta^{13}\text{C}$ es el más negativo, provocado posiblemente por un cambio en las proporciones de su dieta.
- Los resultados que se muestran en este estudio están sesgados puesto que el número de muestras es pequeño y se realizó en un periodo de tiempo corto. Para mejorar esta investigación sería recomendable hacer un seguimiento prolongado en el tiempo, obtener un mayor número de muestras y tener un mayor control sobre la proporción exacta de los alimentos que ingieren los individuos.

CONCLUSIONS

- The isotopic composition of carbon and nitrogen in the hair is different with respect to diet. There is an enrichment of both isotopes, which falls within the estimates of others works.
- The proportion of stable isotopes of carbon and nitrogen in the feces are different in relation to diets. There is an isotopic fractionation, which in the feces causes a depletion of ^{13}C and enrichment of ^{15}N .
- Fractionation of fecal $\delta^{15}\text{N}$ is slightly higher in ruminants than in monogastric ungulates. Coincidentally, their diet is also higher in protein content, so that both factors could explain the observed variation.
- $\delta^{13}\text{C}$ fractionation in the feces is lower ruminants than in non-ruminant (less negative values), but the hypothesis described in the literature to explain the variation of fractionation between individuals do not help solve this observation.
- Dromedary feces have certain singularity. The $\delta^{15}\text{N}$ value is lower than other ruminants and can be caused by the physiology of the animal itself, and the value of $\delta^{13}\text{C}$, the most negative, is possibly caused by a change in the proportions of its diet.
- The results shown in this study are skewed because the number of samples is small and it was performed over a short time period. To improve this investigation it would be necessary to track the animals over an extended period, get a larger number of samples and have greater control over the exact proportion of the food the animals eat.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BEDCA. *Base de datos Española de Composición de Alimentos*. <<http://www.bedca.net/bdpub/index.php>>. [Consulta: 16 de marzo de 2015]
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marly, I., Spechat, B., Agabriel, J., Huneau, J.F., y Fouillet, H. 2015. Diet-animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition*, 1-12.
- Codron, D. y Codron, J. 2009. Reliability of $\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$ in faeces for reconstructing savanna herbivore diet. *Mammalian Biology*, 74: 36 – 48.
- Codron, D., Codron, J., Lee-Thorp, J.A., Sponheimer, M., y De Ruiter, D. 2005a. Animal diets in the Waterberg based on stable isotopic composition on faeces. *South African Journal of Wildlife Research*, 35 (1): 43-52.
- Codron, D., Codron, J., Sponheimer, M., Lee-Thorp, J.A., Robinson, T., Grant, C.C., y De Ruiter, D. 2005b. Assessing diet in savanna herbivores using stable carbon isotope ratios of faeces. *Koedoe*, 48 (1): 115-124.
- Codron, D., Sponheimer, M., Codron, J., Hammer, S., Tschuor, A., Braun, U., Bernasconi, S.M., y Clauss, M. 2012. Tracking the fate of digested ^{13}C and ^{15}N compositions along the ruminant gastrointestinal tract: Does digestion influence the relationship between diet and faeces? *European Journal of Wildlife Research*, 58: 303-313.
- Crawford, K., McDonald, R.A. y Bearhop, S. 2008. Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. *Mammal Review*, 38 (1): 87-107.
- DeNiro, M.J. y Epstein, S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42:495–506.
- DeNiro, M.J. y Epstein, S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 341–351.
- Dorst, J. y Dandelot, P. 1973. *Guía de Campo de los Mamíferos Salvajes de África*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 302 págs.
- Fowler, M.E. 2009. Camelids are not ruminants. En Fowler, M.E. & Miller, R.E. (eds) *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy (Sixth Edition)*. Saunders Elsevier, Missouri, 375-385
- Hill, R.W., Wyse, G.A. y Anderson, M. 2006. *Fisiología Animal*. Medica Panamericana S.A., Madrid, 105-142
- Hobson, K.A. y Quirk, T.W. 2014. Effect of age and ration on diet-tissue isotopic ($\Delta^{13}\text{C}$, $\Delta^{15}\text{N}$) discrimination in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 50 (3): 300-306.

Kelly, J.F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 1-27.

Litvaitis, J. A. 2013. Investigating Food Habits of Terrestrial Vertebrates. En Boitani, L. y Fuller, T.K. (eds). *Research techniques in Animal Ecology: Controversies and Consequences*. Columbia University Press, New York, 165-190.

Nowak, R.M. 1999. *Walker's Mammals of the World (Sixth Edition)*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2, 1936 págs.

Panarello, H.O., Tessone, A. y Zangrando, A.F.J. 2006-2009. Isótopos estables en arqueología: principios teóricos, aspectos metodológicos y aplicaciones en Argentina. *Xama* 19-23, 115-133.

Parque Zoológico Marcelle Natureza. <<http://www.marcellenatureza.com/>> [Consulta: 9 de mayo de 2015].

SAI. *Servizos de apoio á investigación*. < <https://www.sai.udc.es/>>. [Consulta: 4 de junio de 2015].

Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Passey, B., Roeder, B., Shipley, L., Lopez, E., Cerling, T., Dearing, D., y Ehleringer, J. 2003a. An experimental study of carbon – isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 871-876.

Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, T., Dearing, D., y Ehleringer, J. 2003b. Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: hair $\delta^{15}\text{N}$ values from a controlled feeding study. *International Journal Osteoarchaeology*, 13: 80-87.

Universidad de Córdoba, Servicio de Información sobre Alimentos. Base de datos "Pastos españoles (seep)/alimentos para animales". <http://www.uco.es/sia/banco_de_datos/> [Consulta: 17 de marzo de 2015].

ANEXO

Tabla 1: Porcentaje de proteína presente en los alimentos utilizados en el estudio.

Muestra	% proteínas
Espinaca	2,70
Heno	8,40
Hierba	17,10
Manzana	0,30
Pan	8,30
Pera	0,40
Pienso de équido	12,0
Pienso de rumiante	12,0
Pienso de suido	10,0
Zanahoria	0,80

Tabla 2: Cálculo de % de proteína en las dietas de los animales muestreados.

Muestra	Proporción de % proteína en la dieta
Ciervo del Padre David	$(12 + 8,4 + 17,1)/3 = 12,5$
Cobo de agua	$(12 + 8,4 + 17,1)/3 = 12,5$
Dromedario	$(12 + 8,4)/2 = 10,2$
Eland	$(12 + 8,4 + 17,1)/3 = 12,5$
Gacela Cuvieri	$(12 + 8,4 + 17,1)/3 = 12,5$
Wapití	$(12 + 8,4 + 17,1)/3 = 12,5$
Burro africano	$(12 \times 0,35) + (8,4 \times 0,35) + (8,3 \times 0,2) + (0,35 \times 0,1) = 8,84$
Burro común	$(12 \times 0,45) + (8,4 \times 0,45) + (1,75 \times 0,05) + (0,35 \times 0,05) = 9,29$
Cebra de Burchell	$(12 + 8,4)/2 = 10,2$
Falabella	$(12 + 8,4)/2 = 10,2$
Jabalí	$(10 \times 0,5) + (0,35 \times 0,25) + (1,75 \times 0,25) = 5,52$

Tabla 3: Comparación de datos de rumiantes y no rumiantes; % de proteínas que contienen las dietas y fraccionamientos $\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-heces}}$, $\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-pelo}}$. Las medias de $\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-pelo}}$ no se calcularon por falta de datos.

Muestra	% proteína dieta	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-heces}}$ (‰)	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{dieta-pelo}}$ (‰)
Ciervo Padre David	12,5	+4,32	+5,74
Cobo de agua	12,5	+2,68	-
Dromedario	10,2	+1,02	+3,51
Eland	12,5	+2,13	-
Gacela	12,5	+3,02	+5,55
Wapití	12,5	+2,30	+5,28
media	12,1	+2,58	-
Burro africano	8,84	+1,86	+3,69
Burro común	9,29	+1,46	-
Cebra de Burchell	10,2	+1,73	-
Falabella	10,2	+3,53	+3,57
Jabalí	5,52	+1,80	+4,52
media	8,81	+2,07	-