

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



Nerea Gestal Freire

Trabajo de fin de grado

27 de Julio de 2016

Dirigido por: Dra. Aurora Grandal d'Anglade – Esther Valderrábano Cano

ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Isótopos estables en estudios de ecología trófica	2
1.2. Isótopos de carbono.	3
1.3. Isótopos de nitrógeno.	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Material	6
3.1.1 Especies seleccionadas para la realización del estudio.	6
3.1.2. Muestras utilizadas	9
3.2. Métodos	11
4. RESULTADOS.....	13
4.1. Resultados del análisis IRMS de los alimentos	13
4.2. Resultados del análisis IRMS de las heces	15
4.3. Resultados del análisis IRMS de los pelos	17
5. DISCUSIÓN	19
6. CONCLUSIONES	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22
8. ANEXO	24

Resumen

Este proyecto se basa en el estudio de la alimentación de diversas especies de los grupos tróficos de los carnívoros, los herbívoros y los omnívoros en condiciones controladas en el parque Marcelle Natureza. Para ello se realizó un análisis isotópico de carbono y de nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en las heces, en el pelo y en los alimentos que forman parte de la dieta de dichos animales. A partir de los datos obtenidos se pretende comprobar si la señal isotópica de la dieta de cada animal se refleja en las muestras de pelo y heces, determinar si existe una diferencia (factor de fraccionamiento) entre la dieta y las muestras animales y calcular cuál es ese factor para cada grupo trófico.

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 $\delta^{15}\text{N}$, lo cual coincide con lo determinado en otros estudios. En las heces se produce un empobrecimiento para el $\delta^{13}\text{C}$ y un enriquecimiento para el $\delta^{15}\text{N}$. En líneas generales, es posible reconocer el tipo de dieta de un animal por medio del estudio isotópico de sus heces. Sin embargo, se observan diferencias en el factor de fraccionamiento dentro de cada grupo. Esto puede deberse a que las muestras de heces fueron recogidas en un momento puntual y pueden no reflejar la alimentación habitual de los animales. Para una mayor precisión a la hora de obtener datos en futuros estudios, es recomendable obtener muestras durante un periodo de tiempo mayor, y en mayor cantidad.

Palabras clave: isótopos estables, mamíferos, dieta, heces, factor de fraccionamiento, ecología trófica

Abstract

This project is based in a controlled feeding study on species of different trophic groups like carnivores, herbivores and omnivores in Marcelle Natureza. For that, an isotopic analysis of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) was performed in feces, hair and food. From the data obtained we will test if the isotopic signature of the diets is reflected in both types of samples, if there is a difference (fractionation factor) between diet and animal samples and calculate the fractionation factor for each trophic group.

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 $\delta^{15}\text{N}$ coinciding with other studies. The feces are depleted for $\delta^{13}\text{C}$ and enriched in the $\delta^{15}\text{N}$. Overall, it is possible to recognize the type of diet of an animal through the isotopic study of its feces. However, there are differences in the fractionation factor within each group. This may be because fecal samples were collected at a specific moment and may not reflect the usual animal feed. To get more precise data in future projects, it would be necessary to collect and analyze more samples for a longer period of time.

Key words: Stable isotopes, mammals, diet, feces, fractionation factor, trophic ecology

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Isótopos estables en estudios de ecología trófica

La medición de isótopos estables, especialmente los de carbono y nitrógeno, se está convirtiendo en un método cada vez más utilizado en la investigación de las dietas de mamíferos, ya que el análisis de los isótopos estables se basa en que las proporciones de isótopos estables de C ($\delta^{13}\text{C}$) y de N ($\delta^{15}\text{N}$) en los diferentes tejidos de un animal reflejan las señales isotópicas de las fuentes de las cuales derivan, es decir, su dieta (Ben-David y Flaherty, 2012).

Para realizar dicha investigación se pueden hacer mediciones en tejidos como sangre, músculo, huesos, pelo o uñas, entre otros. Todos ellos requieren la toma de muestra del propio animal, salvo el pelo, que puede ser obtenido mediante diversos sistemas de trampeo.

Otra posibilidad que se está empezando a utilizar en la actualidad es el análisis isotópico de las heces. Los valores isotópicos de las heces reflejan la dieta consumida durante un período corto de tiempo (Codron et al., 2005b) y ofrecen más información dietética que los pelos, aunque los pelos contienen información de períodos más largos como meses o años. Su muestreo no interfiere en la vida del animal, es una técnica no invasiva, de ahí que sean elegidas para realizar esta investigación (Codron y Codron, 2009).

En el estudio que se presenta a continuación se utilizarán heces de carnívoros, herbívoros y un omnívoro y también pelos de algunos animales para contrastar los resultados. Estos pelos fueron recogidos de las zonas donde habitaba cada animal, sin tener que quitárselos a ellos específicamente, por tanto no se les causó ningún daño.

Con el análisis isotópico podemos conocer los requerimientos alimenticios en caso, por ejemplo, de necesitar la protección de diversas especies y aumentar su supervivencia, saber más acerca del comportamiento de los animales, sus estrategias de forrajeo, podemos hacer un seguimiento de migración, y también pueden ser útiles en la comprensión del comportamiento de los contaminantes que se ingieren y cómo afectan a las cadenas tróficas (Crawford et al., 2008).

Se denominan isótopos a los átomos de un mismo elemento, cuyos núcleos tienen el mismo número de protones y electrones, pero una cantidad diferente de neutrones.

Algunos isótopos pueden transformarse en elementos más estables, emitiendo en el proceso radiación, por lo que se denominan radiactivos o inestables, como por ejemplo el carbono 14. Otros, por el contrario, no cambian con el tiempo, y se conocen como isótopos estables. Un ejemplo son el carbono 12 y el carbono 13. Los isótopos estables de un elemento se encuentran en la naturaleza en unas proporciones características que dependen del compartimento estudiado, pues por lo general estas proporciones varían por medio de la transición de dicho elemento de un estado físico a otro o de una composición química a otra; esto se conoce como fraccionamiento isotópico (Panarello 1987)

El análisis de las relaciones isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (isótopo pesado/isótopo ligero) permite medir las variaciones en las relaciones isotópicas (fraccionamiento) producidas por diferentes procesos naturales, tanto físicos como químicos, entre los que se encuentran la fotosíntesis, la respiración y en general todos los procesos metabólicos de un organismo.

Para ello se calcula la desviación isotópica o delta (δ), que indica en cuanto se aparta la relación isotópica de la muestra objeto de estudio respecto de la existente en un patrón internacional previamente definido:

$$\delta = 1000 \frac{R_M - R_R}{R_R} \text{‰}$$

RM es la es la relación isotópica en la muestra y RR corresponde a la misma relación isotópica en el patrón internacional. Se multiplican las desviaciones por 1000 para que, como hemos dicho anteriormente, los números sean sencillos de manejar. Los patrones internacionales correspondientes al carbono y al nitrógeno, que son los que nos atañen en este trabajo son, V-PDB y AIR, respectivamente.

A menudo, cuando se quiere indicar el fraccionamiento que se produce en un proceso físico químico determinado se usa el factor de enriquecimiento (Δ ‰). Este factor es similar a la desviación isotópica en su sentido físico. La diferencia radica en que Δ no se refiere a un patrón internacional sino que directamente indica el enriquecimiento o empobrecimiento (según Δ sea positivo o negativo) de una fase o componente respecto de otro.

Una muestra con valores de δ positivos estará enriquecida en el isótopo pesado, mientras que los valores negativos indican empobrecimiento. Debido a que el patrón utilizado para el carbono está extraordinariamente enriquecido en el isótopo pesado, prácticamente todos los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de sustancias naturales presentarán valores negativos.

La medición de las relaciones entre isótopos estables pesados y ligeros, expresadas según la notación δ , se efectúa por espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) sobre un gas extraído por combustión de la muestra.

1.2. Isótopos de carbono.

El Carbono entra en las redes tróficas mediante la captación de CO_2 por las plantas durante la fotosíntesis. Gracias a los isótopos estables del carbono se puede discriminar entre la presencia en la dieta de plantas con rutas fotosintéticas diferentes: plantas C3 y plantas C4. Además, Ambrose y DeNiro (1986) mostraron que las mediciones de isótopos de carbono pueden indicar si los carnívoros se han alimentado de herbívoros que han comido principalmente plantas C3 o C4.

El carbono fijado por las plantas C3 terrestres se puede distinguir del fijado por las plantas C4 porque contiene relativamente pocos isótopos de ^{13}C . Las plantas C3 presentan una $\delta^{13}\text{C}$ que varía entre -30‰ y -21‰ con una media de $-26.5 \pm 2\text{‰}$. Las plantas C4 presentan una $\delta^{13}\text{C}$ que varía entre -15‰ y -7‰ con una media de $-12.5 \pm 1\text{‰}$.

El ciclo de Calvin Benson de las plantas C3, lleva a fraccionamientos importantes ($\Delta = -18\text{‰}$), por lo que la materia orgánica constituyente de las plantas C3 se encuentra muy empobrecida. Las plantas C4, efectúan además el llamado Ciclo de Hatch Slack produciendo menor fraccionamiento ($\Delta^{13}\text{C} = -4\text{‰}$), por lo que su composición isotópica está más enriquecida, oscilando entre -15‰ a -7‰ . Las plantas CAM poseen propiedades isotópicas intermedias.

La diferencia entre las plantas y los herbívoros que las ingieren es de aproximadamente 5‰. Posteriormente, cada escalón en la cadena trófica implica una subida de alrededor de un 1‰ en el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (Ben-David y Flaherty, 2012), por lo que este isótopo resulta un indicador (aunque no muy sensible) del nivel trófico alcanzado.

1.3. Isótopos de nitrógeno.

El nitrógeno se encuentra en la naturaleza en forma de dos isótopos estables, pero la mayoría de los organismos biológicos no lo pueden usar en su estado elemental (N_2). Necesitan convertirlo en nitrato (NO_3^-) mediante un proceso denominado “fijación de nitrógeno”. Las plantas terrestres que obtienen el nitrógeno estableciendo una relación simbiótica con organismos que fijan nitrógeno gaseoso del entorno radicular (plantas fijadoras de N_2), tienen valores de la $\delta^{15}\text{N}$ cercanos a 0‰, ya que el N_2 se fija con ningún o muy poco fraccionamiento (Virginia and Delwiche 1982).

Por otro lado, cuando el N_2 es fijado por bacterias del suelo su incorporación se efectúa con un importante fraccionamiento, que lleva al enriquecimiento isotópico de la materia orgánica sintetizada. El factor observado en estas últimas corresponde a un $\Delta=+8.8$ (Rennie et al., 1976). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ pueden variar en gran medida debido a factores fisiológicos y abióticos. Como resultado de estos factores, incluso dentro de un área pequeña puede haber una variación del 10 ‰ o más de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en plantas (Hobbie et al., 2000).

Los niveles de nitrógeno se van enriqueciendo en el tejido de los animales que consumen proteínas, de modo que cada eslabón en la cadena trófica se ve marcado con un incremento de $\delta^{15}\text{N}$ entre 3‰ a 5‰ respecto de su predecesor. Esto se conoce como “efecto del nivel trófico” (DeNiro y Epstein 1981, Ambrose y DeNiro 1986)

Así se puede situar a los individuos estudiados en el puesto de la cadena trófica que por su tipo de dieta les corresponda: las plantas tendrán los valores más bajos, seguidas de los herbívoros y omnívoros hasta llegar a los carnívoros, que tienen los valores más altos (Figura 1).

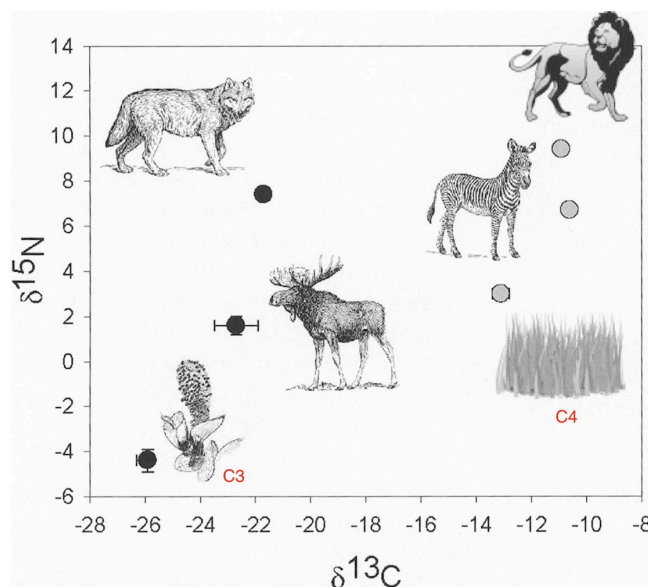


Figura 1. Valores isotópicos característicos en ecosistemas terrestres (Tomando de Ben-David y Flaherty, 2012)

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es realizar un análisis de los isótopos estables de carbono y nitrógeno en alimentos y heces de diferentes especies animales que viven en condiciones controladas, para comprobar si en las señales isotópicas de las heces se refleja el tipo de dieta consumida, lo que daría la posibilidad de hacer una reconstrucción de la dieta en especies silvestres a partir de muestras no invasivas.

Un segundo objetivo del trabajo es cuantificar la diferencia existente entre las señales isotópicas de la dieta y las heces para cada grupo trófico, con el fin de establecer los valores de fraccionamiento isotópico que permitirían, a partir de las heces, determinar el valor isotópico aproximado de su dieta.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

La recogida de muestras (heces, pelo y alimento) se realizó el 6 de Marzo de 2015 en Marcelle Natureza, un parque zoológico situado en Outeiro de Rei (Lugo) en el que mantienen animales procedentes de otros zoológicos, centros de recuperación o centros de rescate. Los recintos son de gran amplitud (de hasta 3.000 m² en el caso por ejemplo de los lobos, que viven entre naturaleza pura entre árboles y arbustos), dotados de todo lo necesario para que los animales se sientan cómodos y sin sensación de estar encerrados. Cabe destacar que muchos de estos animales vienen de pasar su vida en jaulas o espacios muy pequeños, por lo que estos grandes recintos suponen un alivio en sus condiciones de vida.

3.1.1 Especies seleccionadas para la realización del estudio.

De todos los animales que se encuentran en Marcelle, para el estudio se escogieron aquellos mamíferos que habitan o han habitado en la Península Ibérica, o en el caso de que en el parque no hubiese la especie exacta, una similar. Forman parte de la selección carnívoros como el lince, el lobo, la gineta y el zorro, omnívoros como el oso, y herbívoros como el wapití, el muflón, el bisonte, el jabalí y la cabra enana (tabla 1: clasificación taxonómica). A continuación se describe de manera breve cada una de las especie utilizadas en el estudio.



Imagen 1: tomada por Nerea Gestal Freire

Lince boreal (*Lynx Lynx*): Aunque no se encuentra en la Península Ibérica, su fisiología es la misma que la del Lince ibérico, por lo que es seleccionado para la realización del estudio. El lince ibérico consume especialmente conejos. También consume anátidas, ungulados, perdices, pequeños mamíferos y otras aves.

En Marcelle se le suministra carne de pollo y de vaca.



Imagen 2: tomada por Nerea Gestal Freire

Lobo (*Canis lupus*): En España consume ungulados silvestres, ganado (a menudo en forma de carroña) y a veces basura. Muestra gran capacidad de adaptación.

En Marcelle la alimentación que le proporcionan está basada en carne de pollo y de vaca.



Imagen 3: tomada de la página oficial de Marcelle

Zorro (*Vulpes vulpes*): Se alimenta de un amplio espectro de animales, vegetales, carroña y basura. Sin embargo, los alimentos que más biomasa aportan son los micromamíferos en el norte de España y los lagomorfos en la España mediterránea. En Marcelle se les alimenta a base de pienso de perro, carne de pollo y carne de vaca.



Imagen 4: tomada de la página oficial de Marcelle

Gineta (*Genetta genetta*): En España, la gineta tiene una dieta variada que incluye micromamíferos, lagomorfos, aves de pequeño y mediano tamaño, anfibios, reptiles, huevos, vegetales y desperdicios humanos. En Marcelle su dieta consta de pienso de gato, carne de pollo y carne de vaca.



Imagen 5: tomada de la página oficial de Marcelle

Oso (*Ursus arctos*): Su dieta es omnívora con claro predominio de los vegetales. La dieta varía mucho, consumiendo dependiendo de cada estación brotes de gramíneas, umbeliformes de hojas grandes, frutos, proteína animal en ungulados muertos o insectos.

En Marcelle su dieta consta de pienso de perro, una o dos frutas diarias en invierno, y aumenta la cantidad de fruta y verdura en el resto de las estaciones.

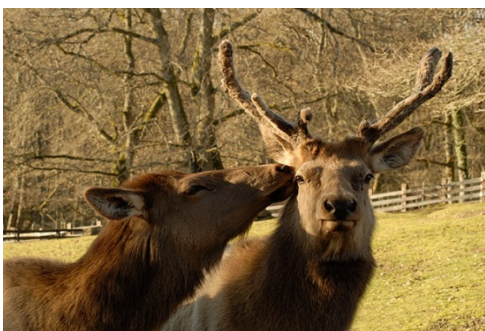


Imagen 6: tomada de la página oficial de Marcelle

Wapiti (*Cervus canadensis*): En este caso el wapití tampoco habita ni habitó en el pasado en España, sin embargo también es seleccionado para este estudio como análogo de *Cervus elaphus* o ciervo común, que habita la Península Ibérica.

La dieta se compone principalmente de herbáceas en invierno y sobre todo en primavera, aumentando la proporción de uso de las leñosas y frutos forestales en verano y otoño, lo cual se corresponde con el uso estacional de los hábitats. En Marcelle su dieta se compone de pienso de rumiantes, heno y hierba.



Imagen 7: tomada de la página oficial de Marcelle

Bisonte americano (*Bison bison*):El bisonte europeo fue el que habitó en el pasado en la Península Ibérica. Su fisiología es como la del americano por tanto seleccionamos este último para el estudio. Se alimentan de hierba jugosa de las praderas, y en invierno de ramas, hojas secas, líquenes y musgos. En Marcelle se le suministra pienso, heno y hierba.



Imagen 8: tomada de la página oficial de Marcelle

Muflón de Córcega (*Ovis musimon*) : En su dieta podemos encontrar fanerógamas, criptógamas, yemas, bellotas, hayucos, castañas, corteza, hoja verdes, hongos y líquenes, aunque suele seleccionar plantas herbáceas y gramíneas cuando éstas abundan.

En Marcelle su dieta está basada en pienso de rumiantes, heno y hierba.



Imagen 9: tomada por Nerea Gestal Freire

Jabalí (*Sus scrofa*): La dieta contiene tanto fracción vegetal como animal, con variaciones geográficas y estacionales que reflejan adaptaciones a la disponibilidad local y estacional de alimento.

La alimentación en Marcelle se compone de pienso de suidos, verduras y fruta.



Imagen 10: tomada de la página oficial de Marcelle

Cabra enana africana (*Capra aegagrus hircus*): Seleccionada para el estudio por ser análoga a la cabra montés, que habita en la Península Ibérica. Comen desde pastos hasta hojas, brotes tiernos y cortezas de los árboles.

En Marcelle su alimentación está basada en pienso y heno.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de las especies muestreadas en Marcelle (Nowak, 1999).

<i>ORDEN CARNIVORA</i>	
Suborden Caniformia	
Infraorden (no definido)	
Familia Canidae	
Subfamilia Caninae	
<i>Canis lupus</i> LINNAEUS 1758 (Lobo)	
<i>Vulpes vulpes</i> LINNAEUS 1758 (Zorro)	
Infraorden Arctoidea	
Familia Ursidae	
Subfamilia (no definida)	
<i>Ursus arctos</i> LINNAEUS 1758 (Oso pardo)	
Suborden Feliformia	
Infraorden Feloidea	
Familia Felidae	
<i>Lynx lynx</i> LINNAEUS 1758 (Lince boreal)	
Infraorden Viverroidea	
Familia: Viverridae	
<i>Genetta genetta</i> LINNAEUS 1758 (Jineta)	
<i>ORDEN ARTIODACTYLA</i>	
Suborden Cetruminantia (Rumiantes)	
Familia Bovidae	
Subfamilia Bovinae	
<i>Bison bison</i> LINNAEUS 1758 (bisonte americano)	
<i>Capra aegagrus hircus</i> LINNAEUS 1758 (Cabra enana africana)	
<i>Ovis orientalis musimon</i> PALLAS 1762 (Muflón)	
Subfamilia cervinae	
<i>Cervus canadensis</i> ERXLEBEN 1777 (wapiti)	
Suborden Suina	
Familia Suidae	
Subfamilia Suinae	
<i>Sus scrofa</i> LINNAEUS 1758 (jabalí)	

3.1.2. Muestras utilizadas

Las muestras se tomaron durante una visita de un día a las instalaciones del Parque Marcelle Natureza en compañía del personal veterinario del parque. Durante la misma se recorrieron los distintos recintos y se tomaron muestras de heces frescas, pelo en los casos en que fue posible y muestras del alimento disponible en aquel momento (Tablas 2 y 3). Las muestras de otros tipos de alimentos no disponibles son de procedencia comercial.

Para recoger las muestras fue necesario el uso de guantes, botes esterilizados de plástico con tapa hermética, bolsas también herméticas y sobres de papel, en los que se rotuló el nombre de la especie y la fecha de recogida.

Tabla 2: tipo de muestra tomado en los animales incluidos en este estudio

ESPECIE	HECES	PELO
LINCE	SÍ	NO
LOBO	SÍ	SÍ
JINETA	SÍ	SÍ
ZORRO	SÍ	NO
OSO	SÍ	SÍ
WAPITI	SÍ	SÍ
BISONTE	SÍ	NO
MUFLÓN	SÍ	NO
CABRA ENANA	SÍ	NO
JABALÍ	SÍ	SÍ

Tabla 3: alimentos que consumen los animales seleccionados para el de estudio. Los datos referidos a la composición en proteínas y grasa proceden de la información ofrecida por las marcas comerciales, en el caso de los piensos, y de las bases de datos BEDCA y de la Universidad de Córdoba (Pastos españoles)

ALIMENTOS	PROCEDENCIA	% Proteína	% Grasa
CARNE DE VACA	COMERCIAL	17,0	3,9
POLLO	COMERCIAL	20,8	9,2
PIENSO PERRO	MARCELLE	23,0	10,5
PIENSO GATO	MARCELLE	32,0	16,0
PIENSO CERDO	MARCELLE	10,0	2,0
PIENSO RUMIANTES	MARCELLE	12,0	2,6
MANZANA	COMERCIAL	2,0	-
PERA	COMERCIAL	4,0	-
HENO	MARCELLE	8,4	12,1
HIERBA	MARCELLE	17,1	-
ZANAHORIA	COMERCIAL	0,8	0,3
ESPINACA	COMERCIAL	2,7	0,8

3.2. Métodos

En primer lugar, al día siguiente de la recogida, las muestras de heces fueron introducidas en una estufa a 80 °C en unos moldes de silicona, para su total desecación, y pasadas mínimo 24 horas, se sacaron y se metieron en botes nuevos para su posterior pulverización.

En unos morteros de mármol se pulverizó cada muestra para su correcta homogenización, hasta resultar un polvillo capaz de pasar por los poros de un tamiz de 0.5 mm (imágenes 11 y 12 respectivamente), separando así las partes sin homogeneizar y guardando lo resultante en unos botes de plástico. Ese polvillo es lo que más tarde se analizó en el espectrómetro de masas para la medida de relaciones isotópicas de isótopos estables (IRMS).

En el caso del pollo, que se ofrece entero a los animales, y debido a que sus diferentes tipos de tejidos pueden dar valores diferentes por su mayor o menor proporción en proteínas y grasas, se analizaron muestras por separado de cada tipo de tejido.



Imagen 11: tomada por Nerea Gestal Freire



Imagen 12: tomada por Nerea Gestal Freire

Cada vez que se finaliza la pulverización de una muestra, se lavan el mortero y el tamiz con agua corriente y con jabón comercial, seguidamente se hace otro lavado con acetona y agua destilada. Por último se secan bien. Esto se hace para que no se produzca contaminación cruzada de las muestras. Cada muestra ya pulverizada, se pesa y se introduce en un tubo eppendorf.

El pienso y la fruta se introdujeron también en la estufa a 80° para secar. Algunas de las muestras como el pollo y la vaca necesitaron ser congeladas antes para hacer más fácil la pulverización. Se hizo de la misma manera que con las muestras de heces. Las muestras de heno y hierba fueron cortadas con tijeras en trozos lo más pequeños posible, puesto que su consistencia fibrosa las hacía más difíciles de pulverizar con el mortero.

En cuanto a los pelos, se les corta la raíz, y se pasan a tubos de vidrio, perfectamente rotulados con el nombre de cada especie. Antes de analizar su composición isotópica, tienen que ser sometidos a un lavado de ultrasonidos (imagen 13), para eliminar la grasa y otras sustancias que puedan tener, quedándonos solo con la queratina, que es lo que se utilizará para medir la señal isotópica. El lavado se compone de varias fases:

En la primera parte se lavan los pelos con una solución de Metanol:Cloroformo (2:1) quedando éstos cubiertos completamente, durante una hora. Esto se realiza otra vez más, cambiando la solución por una nueva.

A continuación se realizan dos baños con agua destilada durante 20 minutos, y al igual que en la fase anterior, se cambia el agua destilada por una nueva en el segundo baño. Una vez finalizado el último baño en agua, se dejan secar en una estufa a 25-30°C durante 24 horas.

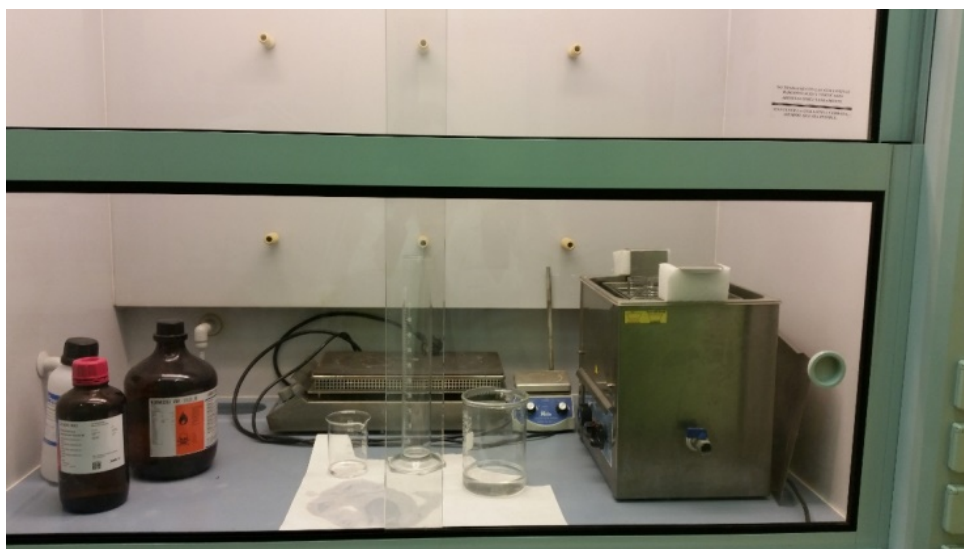


Imagen 13: tomada por Nerea Gestal Freire

Una vez que todas las muestras están preparadas, se envían a la unidad de técnicas instrumentales de análisis del SAI (servicios de apoyo a la investigación) de la Universidad de A Coruña, para realizar el análisis IRMS (Espectrometría de masas para la medida de relaciones isotópicas de isótopos estables)

Las muestras se colocan en cápsulas de estaño, que sometidas a combustión, liberan los distintos gases que componen dicha muestra. En este caso, los gases analizados son CO₂ y N₂. Los gases son ionizados y posteriormente separados por un analizador magnético. En el espectrómetro de masas se mide la relación entre las señales generadas por los haces iónicos correspondientes a los isótopos ligero y pesado de la muestra y de la referencia. Cada muestra se mide por duplicado, obteniéndose posteriormente la media.

Las relaciones ¹³C/¹²C y ¹⁵N/¹⁴N se expresaron en notación delta convencional (δ) en partes por mil (‰) en relación con los estándares de PDB y N₂, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del análisis IRMS de los alimentos

Los resultados del análisis IRMS (Tabla 4) se obtuvieron por duplicado, presentándose en las tablas los valores medios de ambas mediciones.

Tabla 4: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los alimentos

MUESTRA	$\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰)
Pienso perro	-22,45	4,00
Pienso gato	-22,05	5,05
Pollo (carne)	-21,30	2,65
Pollo (hueso)	-21,20	2,35
Pollo (piel)	-22,40	2,25
Vaca (carne)	-21,10	6,05
Manzana	-28,05	1,85
Pera	-29,00	1,70
Heno	-29,80	3,90
Pienso rumiantes	-23,30	3,25
Pienso sudidos	-23,50	3,50
Hierba	-32,05	-0,40
Zanahoria	-27,75	2,95
Espinaca	-27,05	4,30

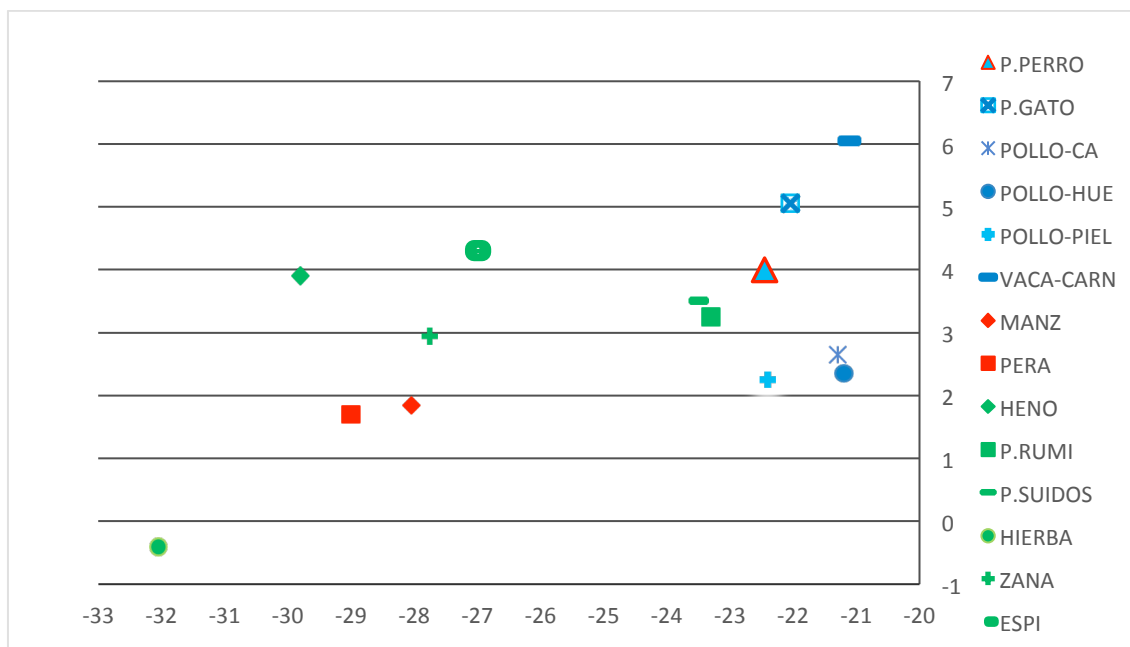


Figura 2: representación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰) vs $\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰) para los alimentos, clasificados por colores según sean carnívoros (azul), herbívoros (verde) u omnívoros (rojo). El pienso de perro aparece en dos colores porque es consumido tanto por carnívoros como por omnívoros. En el eje de abscisas se representan los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y en el eje de ordenadas se representan los valores de $\delta^{15}\text{N}$.

En la figura 1 destaca la diferencia que se observa en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los piensos de herbívoros con respecto a la hierba y el heno, lo que indica que en la composición de estos piensos hay una proporción apreciable de maíz (planta C4).

A partir de los datos de alimentos puros y de la información proporcionada por los veterinarios de Marcelle Natureza, se calcularon los valores correspondientes a la dieta de cada animal (Tabla 5), utilizando unas proporciones aproximadas de la cantidad de cada alimento consumido por cada especie (Ver anexo).

Tabla 5: Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta de cada uno de los animales.

ANIMAL	$\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰)
LINCE	-21,42	3,87
LOBO	-21,42	3,87
JINETA	-21,73	4,46
ZORRO	-21,93	3,93
OSO	-23,06	3,78
WAPITI	-27,42	3,21
BISONTE	-27,42	3,21
MUFLÓN	-26,78	3,14
JABALÍ	-25,28	3,50
CABRA ENANA	-26,55	3,60

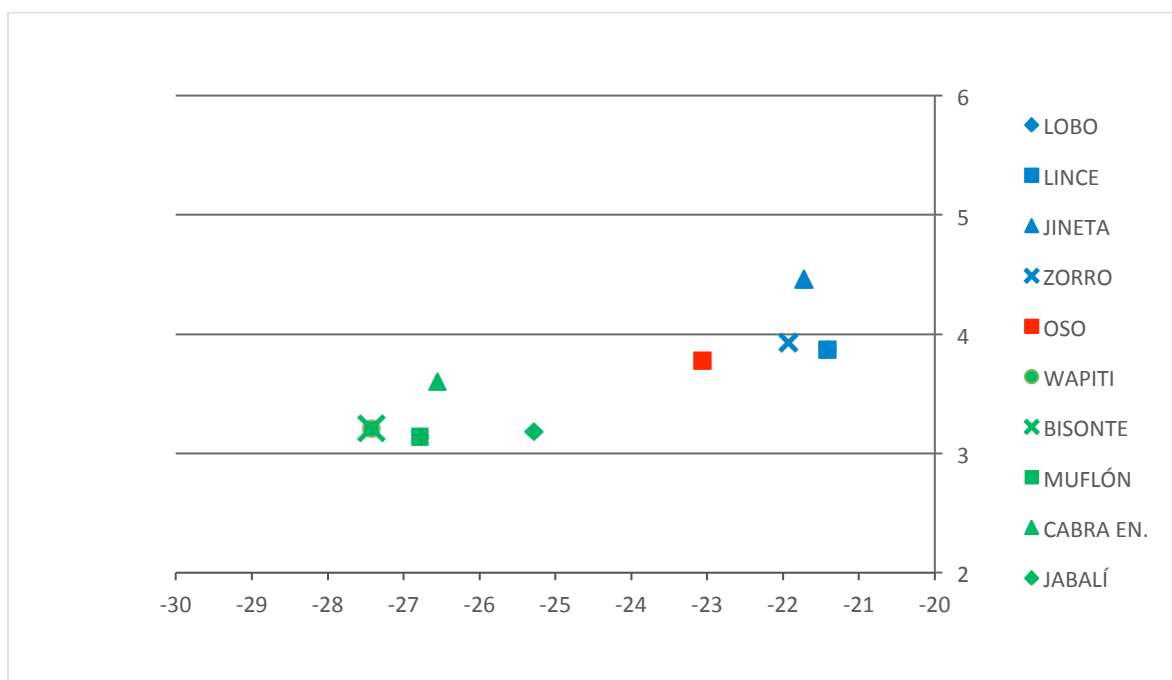


Figura 3: Representación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰) vs $\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰) de la dieta de cada uno de los animales. En el eje de abscisas se representan los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y en el eje de ordenadas se representan los valores de $\delta^{15}\text{N}$.

En la figura 2 podemos observar cómo los datos se agrupan según el nivel trófico que le correspondería a cada animal. En verde, la dieta de los herbívoros, con valores de $\delta^{13}\text{C}$ más negativos debido a su contenido exclusivamente en vegetales. En azul, la dieta de los carnívoros, con valores de $\delta^{15}\text{N}$ más elevados debido a que contiene proteína animal. En rojo, la dieta del omnívoro, claramente intermedia.

4.2 Resultados del análisis IRMS de las heces

En los valores isotópicos de las heces (Tabla 6, Figura 4) se observa también la diferencia provocada por los diferentes tipos de dieta, con resultados paralelos a los observados en las dietas.

Tabla 6: Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las heces.

ANIMAL	$\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰)
LINCE	-20,00	9,50
LOBO	-21,15	5,80
JINETA	-20,95	7,70
ZORRO	-22,55	7,90
OSO	-24,55	5,00
WAPITI	-29,70	4,55
BISONTE	-31,45	5,70
MUFLÓN	-29,50	4,55
JABALÍ	-26,60	4,90
CABRA ENANA	-29,20	5,80

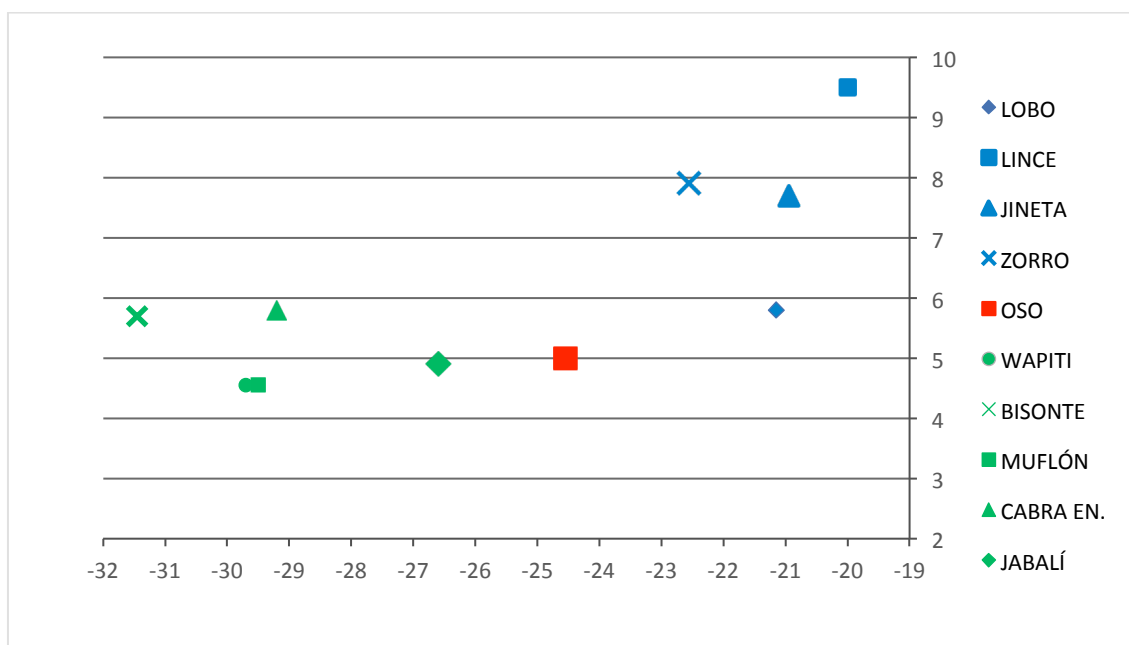


Figura 4: Representación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰) vs $\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰) de las heces. En el eje de abscisas se representan los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y en el eje de ordenadas se representan los valores de $\delta^{15}\text{N}$.

Para cuantificar mejor la diferencia que se produce entre la dieta del animal y sus heces, calculamos el factor de fraccionamiento o Δ .

Tabla 7: Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y las heces

ANIMAL	$\Delta^{13}\text{C}$ DIETA-HECES (‰)	$\Delta^{15}\text{N}$ DIETA-HECES (‰)
CARNÍVOROS		
LINCE	1,42	5,63
LOBO	0,27	1,93
JINETA	0,78	3,24
ZORRO	-0,62	3,97
Media carnívoros	0,46	3,84
Desv. típica	0,86	1,54
OMNÍVOROS		
OSO	-1,49	1,22
HERBÍVOROS		
WAPITI	-2,28	1,34
BISONTE	-4,03	2,49
MUFLÓN	-2,72	1,41
JABALÍ	-1,32	1,73
CABRA ENANA	-2,65	2,23
Media herbívoros	-2,60	1,84
Desv. típica	0,97	0,50

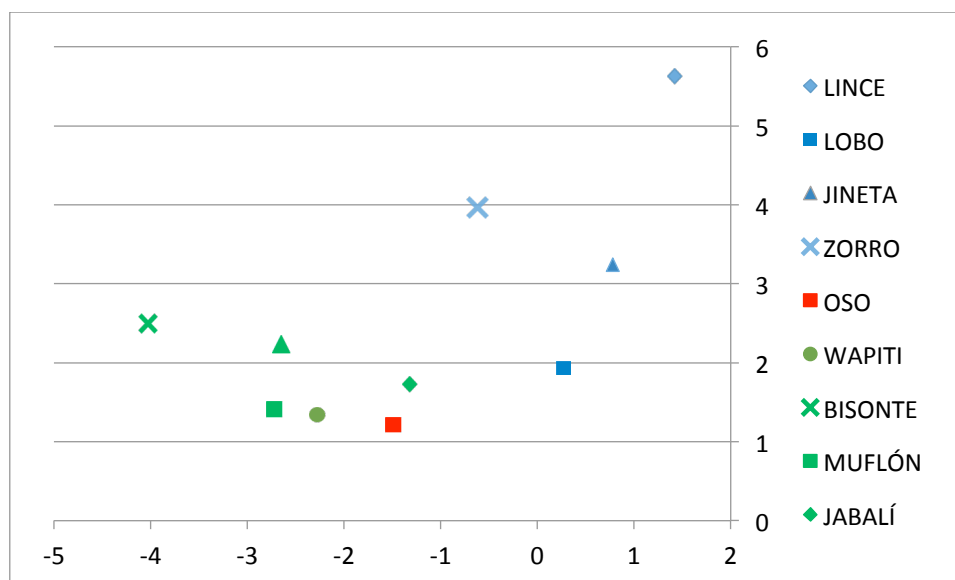


Figura 5: Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y las heces. En el eje de abscisas se representan los valores de $\Delta^{13}\text{C}$ dieta-heces (‰) y en el eje de ordenadas se representan los valores $\Delta^{15}\text{N}$ dieta-heces (‰).

En la Tabla 7 y la figura 5 se observa claramente que los factores de fraccionamiento no son homogéneos. En los carnívoros los factores de fraccionamiento presentan valores dispares en el carbono y enriquecimientos diferentes en el nitrógeno. En el caso de los herbívoros, sí se da una tendencia general clara. Las heces están empobrecidas en $\delta^{13}\text{C}$

y ligeramente enriquecidas en $\delta^{15}\text{N}$. El oso pardo se sitúa en una posición intermedia en el carbono, y más parecida en el nitrógeno a los herbívoros.

4.3 Resultados del análisis IRMS de los pelos

Las señales isotópicas registradas en los pelos, a diferencia de las heces, indican la dieta asimilada efectivamente por los animales a lo largo del tiempo de crecimiento del pelo que puede ser variable pero en cualquier caso supone varios meses de la vida del animal. La principal limitación en este estudio es que no se pudo muestrear pelo de todas las especies incluidas. Los datos se ofrecen en la Tabla 8 y figura 6.

Tabla 8: Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de los pelos

ANIMAL	$\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰)
LOBO	-18,05	10,00
JINETA	-19,10	8,00
OSO	-19,25	7,15
WAPITÍ	-23,10	7,65
JABALÍ	-24,50	7,50

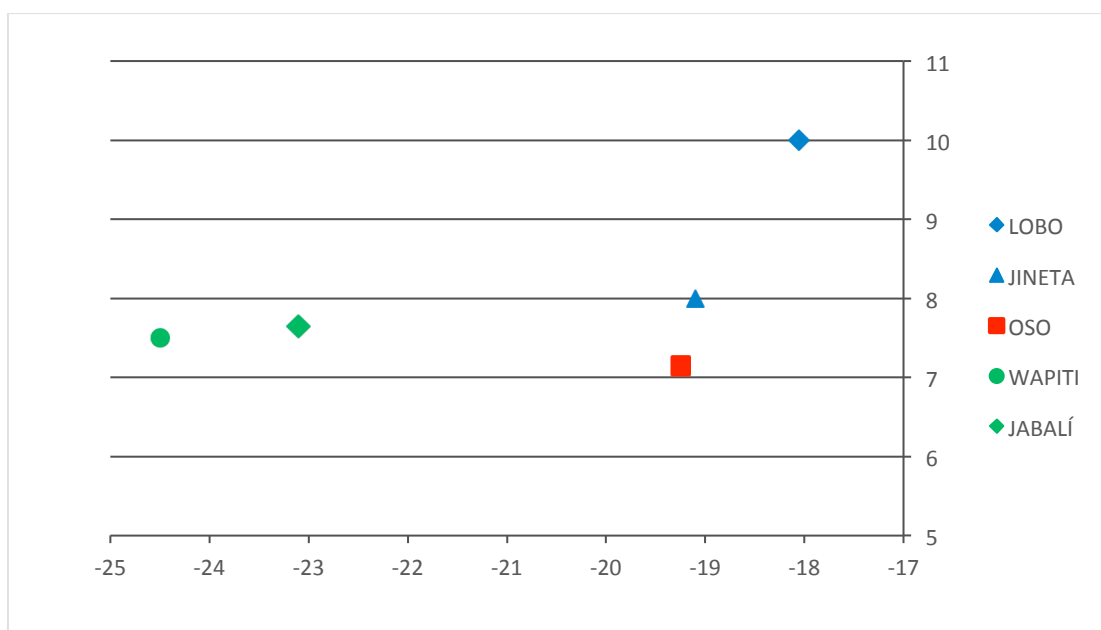


Figura 6: Representación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ VPDV (‰) vs $\delta^{15}\text{N}$ AIR (‰) de los pelos. En el eje de abscisas se representan los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y en el eje de ordenadas se representan los valores de $\delta^{15}\text{N}$.

Al igual que lo ocurrido con las heces, en el pelo se observa que la señal isotópica del carbono está más empobrecida en los herbívoros que en los carnívoros y en estos últimos el $\delta^{15}\text{N}$ es más elevado, aunque los dos individuos incluidos presentan valores muy diferentes.

En cuanto a los factores de fraccionamiento (Tabla 9 y Figura 7), los observados para el nitrógeno se aproximan a los valores descritos en la literatura (entre 3,5 y 5‰), mientras

que para el carbono se ve un enriquecimiento mayor al esperado (alrededor de 1‰) en todos los individuos.

Tabla 9: Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y el pelo

ANIMAL	$\Delta^{13}\text{C}$ DIETA-PELO (‰)	$\Delta^{15}\text{N}$ DIETA-PELO (‰)
CARNÍVOROS		
LOBO	3,37	6,13
JINETA	2,63	3,54
OMNIVOROS		
OSO	3,81	3,37
HERBÍVOROS		
WAPITI	2,92	4,29
JABALÍ	2,15	4,48

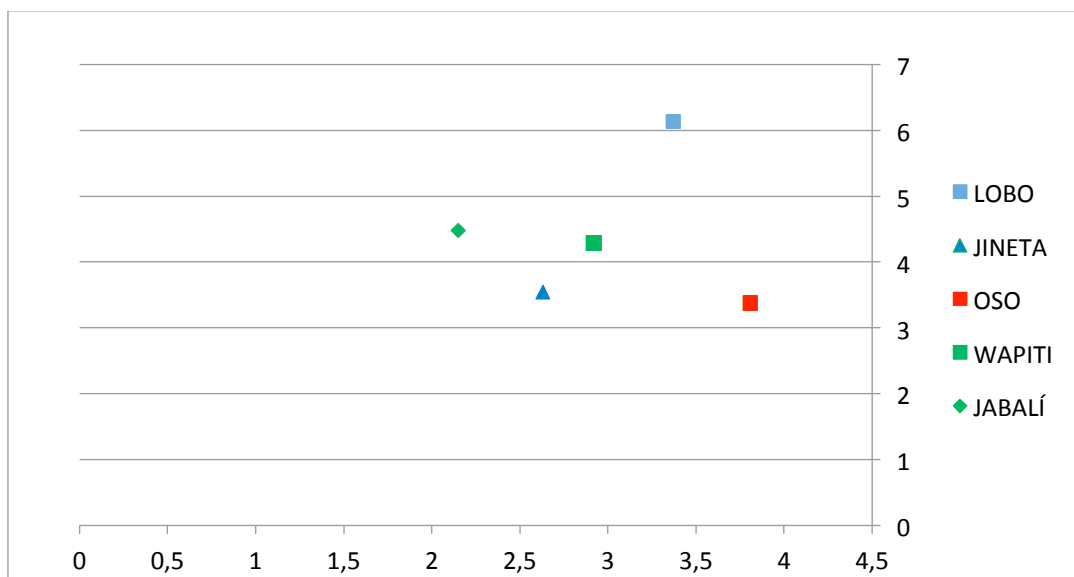


Figura 7: Valor del factor de fraccionamiento entre la dieta y el pelo. En el eje de abscisas se representan los valores de $\Delta^{13}\text{C}$ dieta-pelo (‰) y en el eje de ordenadas se representan los valores $\Delta^{15}\text{N}$ dieta-pelo (‰).

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se realiza un análisis de heces y pelo de diferentes especies de carnívoros, herbívoros y omnívoros con una alimentación controlada, para ver si ambas muestras reflejan la composición isotópica de la dieta y si se puede calcular el fraccionamiento que se pueda producir.

Haciendo un cálculo aproximado de las proporciones de cada alimento que se les suministra a las diferentes especies, podemos observar que se diferencian tres grupos claros: carnívoros, el omnívoro y los herbívoros.

Sin embargo, hay algunas restricciones en cuanto a la dieta se refiere. Como por ejemplo no tener constancia de la cantidad exacta de cada alimento que consumió cada animal, las variaciones que pueden tener los valores isotópicos de las carnes analizadas, ya que las muestras son de origen comercial pudiendo variar bastante con respecto a los que se les da en Marcelle, o las variaciones que puedan producirse debido a la composición variable del heno, en el cual las diferentes especies de gramíneas tienen una firma isotópica diferente.(Sponheimer et al., 2003b). Esto puede hacer que no coincidan los datos con lo esperado.

Los tejidos queratinizados, como en este caso es el pelo, son metabólicamente inertes después de su formación, por lo que preservan el registro isotópico en el momento de su síntesis (Crawford *et al.*, 2008). Esto quiere decir que el análisis del pelo es el que muestra la parte realmente asimilada de la dieta.

En el pelo, los isótopos de nitrógeno los valores se encuentran enriquecidos entre 3,4-6‰. Los valores de los herbívoros y el omnívoro varían entre 3,4‰ y 4,5‰, los cuales se corresponden con el valor del fraccionamiento propuesto en otros trabajos para el $\delta^{15}\text{N}$, en los cuales los valores oscilan entre 4 - 6,5‰ (Sponheimer et. al, 2003b).

Para los isótopos de carbono, el valor de enriquecimiento se encuentra entre 2 y 3,8‰. En cuanto a los herbívoros y omnívoros, estos datos se corresponden con lo determinado en otros trabajos, en los cuales el valor medio de $\delta^{13}\text{C}$ es de +3,2 ‰ (Sponheimer et al., 2003a).

Desafortunadamente, el fraccionamiento isotópico en los carnívoros no está muy documentado. Lo que sí se sabe es que deberían poseer los valores menos enriquecidos en cuanto a carbono y nitrógeno, puesto que se les proporciona la cantidad y calidad necesaria de aminoácidos, y por ello no es necesario que se produzca el reciclaje de los grupos amino que es una de las causas del aumento del grado de fraccionamiento (Kurle et al., 2014). En el caso de $\Delta^{13}\text{C}$ esto último no se cumple.

El análisis de las heces se realiza para determinar si es posible reconstruir la dieta de los animales a través de ellas. En principio, los valores isotópicos de las heces deberían ser iguales a los valores de la dieta puesto que las heces están compuestas del alimento no digerido, pero los resultados de las heces difieren de los de la dieta. Esto es debido a que en las heces no solo va el alimento no digerido, sino que también hay células del epitelio intestinal que se descaman durante el proceso de absorción de los nutrientes, microorganismos y secreciones digestivas (Codron et al., 2012).

Según lo determinado en otros trabajos (Hwang *et al.*, 2007), los isótopos de carbono en las heces suelen ser similares a los de la dieta, mientras que los valores de los isótopos de nitrógeno se enriquecen. Los resultados de este trabajo indican que los valores isotópicos de las heces se diferencian según el tipo de dieta del animal en cuestión, de forma que sí sería posible averiguar el tipo de dieta de un animal por el valor isotópico de sus heces. Sin embargo, hemos obtenido factores de fraccionamiento variables incluso dentro de cada gran grupo trófico, para lo que es necesario encontrar una explicación.

Para los isótopos de carbono, los valores del fraccionamiento isotópico varían entre -4 y 1,4‰. Los valores más empobrecidos son los de los herbívoros, que no coinciden con los datos recogidos en otros trabajos, en los que el fraccionamiento es de -0,8‰ (Sponheimer *et al.*, 2003a; Codron y Codron, 2009) Esto puede deberse a la proporción que hayan tomado realmente los animales de cada alimento, que puede diferir de la que se ha calculado en base a los datos proporcionados por los veterinarios de Marcelle. En el caso de los herbívoros, su dieta está basada en pienso, heno, y la hierba que puedan tomar de sus parcelas. Si el animal del que se han recogido las heces ha consumido una gran cantidad de heno o hierba ese día y menos cantidad de pienso, los valores resultan muy negativos.

Para los isótopos de nitrógeno, los valores de fraccionamiento isotópico oscilan entre 1,2 -5,6‰, por lo que hay enriquecimiento, como determina Hwang *et al.* (2007). Si comparamos entre carnívoros, omnívoros y herbívoros, podemos observar que se produce un mayor fraccionamiento en los carnívoros. Según Sponheimer *et al.* (2003a) existe una relación entre la ingesta de proteínas y los valores de $\delta^{15}\text{N}$. A mayor ingesta, mayor es el valor de $\delta^{15}\text{N}$, por lo tanto se entiende que los valores más altos de $\delta^{15}\text{N}$, y por tanto un mayor fraccionamiento isotópico aparezcan en carnívoros, puesto que los alimentos suministrados a estos poseen mayor cantidad de proteína, como podemos observar en la tabla 2.

El fraccionamiento entre la dieta y las heces del lobo es más bajo de lo que debería, tanto para $\Delta^{13}\text{C}$ como para $\Delta^{15}\text{N}$. Las heces del lobo tenían escasa consistencia, posiblemente el individuo del que se recogieron había ingerido hierba ese día (algo habitual en los cánidos para purgarse), la cual tiene valores muy bajos para el carbono y para el nitrógeno, como ya se ha dicho anteriormente.

Para una mayor precisión en los resultados, sería conveniente tomar un mayor número de muestras, lo cual nos permitiría comparar resultados entre individuos de la misma especie. Así mismo convendría prolongar en el tiempo la recogida de dichas muestras, para poder determinar el valor isotópico real de las heces del animal, no solo de un día, y tener un mayor control de la cantidad exacta de cada alimento ingerido.

6. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos confirman que las señales isotópicas de C y N en las heces de los animales estudiados reflejan el tipo de dieta consumida.
- La composición isotópica de carbono y nitrógeno en el pelo difiere de la composición isotópica en la dieta. Se produce un enriquecimiento en ambos isótopos.
- La composición isotópica de carbono y nitrógeno en las heces difiere de la composición de ambos isótopos en la dieta. Se produce un empobrecimiento en el carbono y un enriquecimiento en el nitrógeno.
- El fraccionamiento de los isótopos de nitrógeno en las heces es mayor en carnívoros que en herbívoros. Que haya un mayor fraccionamiento en carnívoros viene dado por una mayor cantidad de proteína en sus dietas, lo que provoca dicho aumento.
- El fraccionamiento de los isótopos de carbono en las heces presenta variaciones incluso dentro de un mismo grupo trófico. Esto puede deberse al hecho de no tener constancia de la proporción exacta de la dieta, o a las variaciones que pueden tener los valores isotópicos de los alimentos utilizados en este estudio, puesto que algunos provienen de Marcelle pero otros son de origen comercial. También puede ser debido a los distintos componentes que forman las heces.
- En el lobo, el fraccionamiento para $\Delta^{13}\text{C}$ y para $\Delta^{15}\text{N}$ es menor de lo esperado, provocado probablemente por la ingesta puntual de hierba, la cual no está incluida en su dieta habitual.
- Como propuesta para futuras investigaciones cabe destacar la necesidad de prolongar en el tiempo la recogida de muestras y tomar un mayor número de ellas, así como tener un mayor control de la cantidad exacta de cada alimento que ingieren los animales seleccionados para el estudio.

Conclusions:

- The results obtained confirm that the isotopic signals of C and N in the feces of the animals reflect the type of diet consumed.
- The isotopic composition of carbon and nitrogen in the hair is different with respect to diet. There is an enrichment of both isotopes.
- The isotopic composition of carbon and nitrogen in the feces are different with respect to diet. There is a depletion of carbon isotope and enrichment of nitrogen isotope.
- Fractionation of nitrogen isotope in the feces is slightly higher in carnivores than in herbivores. This is caused by the higher protein content in their diet.
- Fractionation of carbon isotope in the feces presents variations even in the same trophic group, may be due to a variation in the proportions of the diet, or in the isotopic values of the food. Another reason is the different that comprise the feces.

- In the wolf, $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$ are very low. A possible explanation for this may be the intake of grass, not included in the usual diet.
- As a proposal for future research include the need to extend in time the sample collection, take a greater number of them and have greater control over the exact amount of food that eat the animals selected for the study.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Ambrose, S.H. y DeNiro, M.J. (1986) The isotopic ecology of East African mammals. *Oecologia* 69: 395–406.
- BEDCA. Base de datos Española de Composición de Alimentos. <<http://www.bedca.net/bdpub/index.php>>. [Consulta: 16 de marzo de 2016]
- Ben-David, M. y Flaherty, E.A.. (2012). Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide. *Journal of Mammalogy* 93 (2), 312 - 328.
- 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., Sponheimer, M., Codron, J., Hammer, S., Tschuor, A., Braun, U., Bernasconi, S.M., y Clauss, M. (2012). Tracking the fate of digesta ^{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.
- Hobbie, E.A., Macko, S.A. y Williams, M. (2000) Correlations between foliar $\delta^{15}\text{N}$ and nitrogen concentrations may indicate plant-mycorrhizal interactions. *Oecologia* 122: 273–283.
- Hwang, Y. T., Millar, J.S. y Longstaffe, F.J. (2007) Do $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of feces reflect the isotopic composition of diets in small mammals? *Canadian Journal of Zoology* 85: 388-396.
- Kurle, C. M., Koch, P. L., Tershy, B. R. y Croll, D. A. (2014) The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) in mammalian omnivores. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 50 (3): 307-321.
- Nowak, R.M. (1999) *Walker's Mammals of the World* (Sixth Edition). The Johns Hopkins University Press. Baltimore, 2 volúmenes, 1936 pp.
- 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. 21-04-2015. Disponible en: <http://www.marcellenatureza.com>
- Rennie, D.R., Paul, E. O. y Johns, L.E. (1976). Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. *Canadian Journal of Soil Sciences* 56: 43-50.
- SAI (Servicios de apoyo a la investigación). 07-05-15. Disponible en: <https://www.sai.udc.es/es>
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, T., Dearing, D. y Ehleringer, J. (2003a) Nitrogen Isotopes in Mammalian Herbivores: Hair d15N Values from Controlled Feeding Study. *International Journal of Osteoarchaeology* 13: 80-87.
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Passey, B., Roeder, B., Shipley, L., Lopez, E., Cerling, T., Dearing, D. y Ehleringer, J. (2003b) An experimental study of carbónisotope between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology* 81: 871-876.
- 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: 16 de marzo de 2016].
- Virginia R.A. y Delwiche C.C. (1982). Natural 15N abundance of presumed N2-fixing and non-N2-fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia* 54: 317-325.

8. ANEXO

Tabla 1. Alimentos que componen la dieta del lince boreal.

Alimentación	Pollo (carne, piel, hueso)	Corazón vacuno	Total
Proporciones	60%	40%	100%
δ 15NAIR (‰)	$(7,25/3)*0,6= 1,45$	$6,05*0,4= 2,42$	3,87
δ 13CVPDV (‰)	$(-21,63/3)*0,6= -12,98$	$-21,10*0,4= -8,44$	-21,42

Tabla 2. Alimentos que componen la dieta del lobo

Alimentación	Pollo (carne, piel, hueso)	Corazón vacuno	Total
Proporciones	60%	40%	100%
δ 15NAIR (‰)	$(7,25/3)*0,6= 1,45$	$6,05*0,4= 2,42$	3,87
δ 13CVPDV (‰)	$(-21,63/3)*0,6= -12,98$	$-21,10*0,4= -8,44$	-21,42

Tabla 3. Alimentos que componen la dieta de la gineta

Alimentación	Pienso gato	Pollo (carne, piel, hueso)	Corazón vacuno	Total
Proporciones	50%	30%	20%	100%
δ 15NAIR (‰)	$5,05*0,5= 2,52$	$(7,25/3)*0,3= 0,72$	$6,05*0,2= 1,21$	4,46
δ 13CVPDV (‰)	$-22,05*0,5= -11,02$	$(-21,63/3)*0,3= -6,49$	$-21,10*0,2= -4,22$	-21,73

Tabla 4. Alimentos que componen la dieta del zorro

Alimentación	Pienso perro	Pollo (carne, piel, hueso)	Corazón vacuno	Total
Proporciones	50%	30%	20%	100%
δ 15NAIR (‰)	$4,00*0,5= 2,00$	$(7,25/3)*0,3= 0,72$	$6,05*0,2= 1,21$	3,93
δ 13CVPDV (‰)	$-22,30*0,5= -11,22$	$(-21,63/3)*0,3= -6,49$	$-21,1*0,2= -4,22$	-21,93

Tabla 5. Alimentos que componen la dieta del oso

Alimentación	Pienso perro	Manzana	Pera	Total
Proporciones	90%	5%	5%	100%
δ 15NAIR (‰)	$4,00 \cdot 0,9 = 3,6$	$1,85 \cdot 0,05 = 0,09$	$1,7 \cdot 0,05 = 0,08$	3,78
δ13CVPDV (‰)	$-22,30 \cdot 0,9 = -20,20$	$-28,05 \cdot 0,05 = -1,40$	$-29 \cdot 0,05 = -1,45$	-23,05

Tabla 6. Alimentos que componen la dieta del wapiti

Alimentación	Pienso rumiantes	Heno	Hierba	Total
Proporciones	40%	50%	10%	100%
δ 15NAIR (‰)	$3,25 \cdot 0,4 = 1,30$	$3,90 \cdot 0,5 = 1,95$	$-0,40 \cdot 0,1 = -0,04$	3,21
δ13CVPDV (‰)	$-23,30 \cdot 0,4 = -9,32$	$-29,80 \cdot 0,5 = -14,90$	$-32,05 \cdot 0,1 = -3,20$	-27,42

Tabla 7. Alimentos que componen la dieta del bisonte

Alimentación	Pienso rumiantes	Heno	Hierba	Total
Proporciones	40%	50%	10%	100%
δ 15NAIR (‰)	$3,25 \cdot 0,4 = 1,30$	$3,90 \cdot 0,5 = 1,95$	$-0,40 \cdot 0,1 = -0,04$	3,21
δ13CVPDV (‰)	$-23,30 \cdot 0,4 = -9,32$	$-29,80 \cdot 0,5 = -14,90$	$-32,05 \cdot 0,1 = -3,20$	-27,42

Tabla 8. Alimentos que componen la dieta del muflón

Alimentación	Pienso rumiantes	Heno	Hierba	Total
Proporciones	50%	40%	10%	100%
δ 15NAIR (‰)	$3,25 \cdot 0,5 = 1,62$	$3,90 \cdot 0,4 = 1,56$	$-0,40 \cdot 0,1 = -0,04$	3,14
δ13CVPDV (‰)	$-23,30 \cdot 0,5 = -11,65$	$-29,80 \cdot 0,4 = -11,92$	$-32,05 \cdot 0,1 = -3,20$	-26,77

Tabla 9. Alimentos que componen la dieta de la cabra enana.

Alimentación	Pienso rumiantes	Heno	Total
Proporciones	50%	50%	100%
δ 15NAIR (‰)	$3,25*0,5= 1,62$	$3,90*0,5= 1,95$	3,57
δ13CVPDV (‰)	$-23,30*0,5= -11,65$	$-29,80*0,5= -14,90$	-26,55

Tabla 10. Alimentos que componen la dieta del jabalí.

Alimentación	Pienso sudos	Fruta(pera, manzana)	Verdura(zanahoria, espinaca)	Total
Proporciones	60%	20%	20%	100%
δ 15NAIR (‰)	$3,51*0,6=2,11$	$(3,55/2)*0,2=0,35$	$(7,25/2)*0,2=0,72$	3,18
δ13CVPDV (‰)	$-23,50*0,6=-14,1$	$(-57,05/2)*0,2=-5,70$	$(-54,8/2)*0,2=-5,48$	-25,28