

Composición elemental en huesos y branquias de juveniles de Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*): ¿puede utilizarse para discriminar lotes?

Inma Salvat-Leal¹, Aurelio Ortega², Edurne Blanco³, Amanda Miras², Diego Romero^{1*}

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historial del artículo:

Recibido 02 de mayo de 2025

Aceptado 03 de febrero de 2026

Publicado 09 de abril 2026

READ IN ENGLISH:

<https://doi.org/10.7773/cm.v2026.3561>

AUTOR DE CORRESPONDENCIA

* E-mail: diegorom@um.es

¹ Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Regional de Excelencia Internacional *Mare Nostrum*, 30100 Murcia, España.

² CN-IEO-CSIC, Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Murcia, 30860 Murcia, España.

³ CN-IEO-CSIC, Instituto Español de Oceanografía, Centre Oceanogràfic de les Balears, 07015 Palma de Mallorca, España.

RESUMEN. La acuicultura del Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) ha experimentado un rápido desarrollo en los últimos años, lo que ha hecho necesario diferenciar entre ejemplares procedentes de acuicultura (criados en cautividad) y aquellos procedentes de pesquerías (capturados en el medio natural). En este estudio se evaluó un método basado en la composición química de tejidos de descarte (branquias y huesos) en 3 lotes de juveniles de *T. thynnus* (criados en tanques terrestres, criados en jaulas marinas y capturados en estado silvestre). Se determinaron las concentraciones de 11 macro y microelementos (Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S, Cu, Mn, Zn y Sr) y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y 2 pruebas multivariantes: análisis de componentes principales (ACP) y análisis canónico discriminante (ACD). Los mejores resultados se obtuvieron en las branquias y en el lote correspondiente a los ejemplares silvestres. Sin embargo, los resultados no fueron lo suficientemente robustos como para establecer un patrón específico que permitiera identificar el origen de los ejemplares de *T. thynnus*.

Palabras clave: discriminación de lotes, hueso, branquia, elementos inorgánicos, juveniles, elementos traza, Atún Rojo del Atlántico, *Thunnus thynnus*.

INTRODUCCIÓN

En los vertebrados, los tejidos duros constituyen estructuras clave que proporcionan soporte al organismo y almacenan tanto elementos mayoritarios como elementos traza. Los elementos inorgánicos, como el Ca, P, Mg y Mn, son relevantes en estos tejidos, ya que están relacionados con diversas funciones fisiológicas, como la biodisponibilidad orgánica de otros elementos, incluido el Zn (Aschner y Aschner 2005, Lall y Kaushik 2021). Por otro lado, las branquias representan una vía fundamental para la captación de elementos como el Cu (Miller et al. 1980, Grosell 2012), Na (Taylor et al. 2003), Fe (Bury et al. 2003, Bury y Grosell 2003), Mn (Rouleau et al. 1995, Baudin et al. 2000), Zn (Bury et al. 2003, Hogstrand 2012), Ca (Evans y Claiborne 2009), P (Evans y Claiborne

2009) y Mg (Dabrowska et al. 1991, Shearer y Åsgård 1992) (revisado en Lall y Kaushik 2021). El K es importante para el mantenimiento del equilibrio osmótico y ácido-base (Lall 2003), mientras que el S se considera un nutriente indispensable para todos los organismos vivos (Komarnisky et al. 2003), debido a su papel como componente esencial de aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas y otras moléculas. Finalmente, el Sr presenta funciones biológicas relevantes, incluyendo su capacidad para incrementar la densidad mineral ósea (Siccardi et al. 2010) en determinadas especies.

Aunque la acuicultura del Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) (ARA) sigue dependiendo en gran medida del engorde basado en captura (De La Gándara et al. 2016), desde 2016, año en el que se logró por primera vez a nivel global el cierre del ciclo, se han producido avances

Acceso abierto

En línea ISSN: 2395-9053

Verificado con Similarity Check impulsado por iThenticate

<https://doi.org/10.7773/cm.v2026.3561>



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite compartir y adaptar el trabajo, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las figuras, tablas y otros elementos del artículo están incluidos en la licencia CC BY 4.0 del artículo, a menos que se indique lo contrario. Debe solicitar permiso al titular de los derechos de autor para utilizar material no cubierto por esta licencia. El título de la revista está protegido por derechos de autor propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, y el título y el logotipo de la revista no están sujetos a esta licencia.

significativos en el cierre completo del ciclo de vida en cautividad (Ortega y De la Gándara 2017). En la actualidad, la normativa europea prohíbe la captura de ejemplares de ARA con un peso inferior a 30 kg o con una longitud furcal inferior a 115 cm (OJEU 2016). No obstante, en el futuro, los juveniles de ABFT nacidos en cautividad podrían ser comercializados, lo que implicaría la venta de individuos de menor tamaño. Esta situación incrementaría la probabilidad de que ejemplares pequeños capturados ilegalmente lleguen al mercado (Campobasso et al. 2017) y, por lo tanto, de riesgo de fraude en el etiquetado.

Ante la ausencia de métodos fiables para diferenciar entre ejemplares de ARA capturados en estado silvestre y aquellos criados en cautividad, resulta necesario explorar posibles métodos para la discriminación entre lotes de cualquier edad. En este sentido, una aproximación basada en la identificación de lotes a partir de cómo influyen las condiciones de cultivo en los tejidos durante el crecimiento y desarrollo podría resultar especialmente útil (Jara y Chodynietki 1999, Rooker et al. 2007, Brucka-Jastrzębska et al. 2009).

Los tejidos duros procedentes de subproductos pesqueros han sido utilizados en numerosos estudios para la obtención de nuevas moléculas e información (Kim y Jung 2007, Murthy et al. 2014, Talib et al. 2020, Aenglong et al. 2022, López-Álvarez et al. 2024), debido a que (1) son tejidos ricos en macro y microelementos, y (2) su composición química está determinada por interacciones complejas entre factores genéticos, fisiológicos, condiciones ambientales (e.g., química del agua, temperatura y contaminación) y cambios ontogénicos (Walther y Limburg 2012, Sturrock et al. 2015, Limburg et al. 2018). Por lo tanto, la caracterización del perfil químico de los tejidos duros de una determinada población o lote podría emplearse en el futuro como una herramienta diferencial en el sector pesquero (Cubadda et al. 2006). En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue evaluar las concentraciones elementales en huesos y branquias de juveniles de ARA procedentes de 3 lotes (criados en tanques terrestres, criados en jaulas marinas y capturados en estado silvestre) y analizar su potencial aplicación en acuicultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se recogieron muestras de 75 ejemplares juveniles de ARA con un peso inferior a 1,000 g procedentes de 3 localizaciones diferentes: tanques terrestres (lote 1; $n = 24$ [branquias]; $n = 24$ [huesos]), jaulas marinas (lote 2; $n = 22$ [branquias]; $n = 22$ [huesos]) y medio natural (lote 3; $n = 29$ [branquias]; $n = 28$ [huesos]). Los atunes de los lotes 1 y 2 procedían de huevos fecundados de forma natural en jaulas marinas. Estos huevos se recogieron de inmediato y se trasladaron a las instalaciones terrestres del Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Murcia, España). Las larvas se cultivaron en un tanque de 40 m³ y se alimentaron con rotífero y

copépodos. Tras el destete, los peces fueron alimentados con una dieta artificial (Magokoro S-3; Marubeni Nissin Feed Co., Ltd., Tokio, Japón) y mantenidos a 24.9 °C y una salinidad de 32.0 g·L⁻¹ en un tanque de 20 m³.

A los 41 días post-eclosión, los ejemplares con masa corporal suficiente para ser transportados se dividieron en 2 grupos: los peces del lote 1 se trasladaron a un tanque terrestre de 900 m³ con sistema de flujo continuo en la Infraestructura para la Acuicultura del Atún Rojo del Atlántico (Cartagena, España), donde fueron alimentados con arenque (*Clupea* spp.), Lacha (*Brevoortia aurea*) y Caballa del Atlántico (*Scomber scombrus*). Los peces del lote 2 se mantuvieron en jaulas flotantes marinas frente a Cartagena, España (37°34'39.2"N, 0°52'35.9"W). Estos ejemplares fueron recogidos poco después de su muerte natural y posteriormente muestreados. Por último, los atunes del lote 3 fueron capturados mediante pesca con palangre, caña y línea, en la Bahía de Mazarrón (Murcia, España) y muestreados inmediatamente después de su captura. El muestreo de los atunes silvestres se llevó a cabo con los permisos correspondientes otorgados por las autoridades competentes (ICCAT REC 11-06). De acuerdo con la legislación europea (OJEU 2010), ninguno de los procedimientos realizados en el presente estudio requirió autorización ética.

Las muestras de hueso y branquia se recogieron y se lavaron con agua MilliQ (Milli-Q Lab Water Solutions, Guyancourt, Francia), con ácido nítrico al 2% y lavadas de nuevo con agua MilliQ, antes de ser secadas a temperatura ambiente. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras de hueso y branquia se obtuvieron del primer arco branquial y de los dentículos óseos del arco branquial, respectivamente.

Preparación y análisis de muestras

Las muestras de tejido se pretrataron según lo descrito por Salvat-Leal et al. (2023). En resumen, las muestras de branquia y hueso fueron sometidas a digestión ácida utilizando ácido nítrico para análisis de metales traza (69% Suprapure; Merck and Co, Inc., Rahaway, EE. UU.) y H₂O₂ (33% Suprapure, Merck & Co, Inc.) en tubos de reacción de teflón. Estas muestras se calentaron en un sistema de digestión por microondas (UltraClave-Microwave, Milestone SpA, Sorisole, Italia) durante 20 min a 220 °C y, finalmente, se diluyeron hasta un volumen final de 10 mL con agua doblemente desionizada MilliQ. (Milli-Q Lab Water Solutions). Posteriormente, las concentraciones de Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S, Cu, Mn, Zn y Sr se determinaron mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (EEO-PAI). Se analizó 1 muestra en blanco por cada 11 muestras. Los valores del blanco se mantuvieron siempre por debajo de los límites de detección para elementos traza y representaron menos del 1-2% de las concentraciones de los elementos mayoritarios en las muestras.

Se emplearon patrones de calibración multielementales preparados en ácido nítrico al 4% (AnalytiChem Canada,

Inc., Baie-d'Urfé, Canadá). Las concentraciones de macro y microelementos se establecieron de acuerdo con la metodología descrita en la norma UNE-EN ISO 1188 (UNE 2010). Para la validación del método se utilizó el material de referencia certificado 1577b (hígado bovino; *National Institute of Standards and Technology, Dicoex*, Bilbao, España). Las curvas de calibración se generaron para cada lote analítico utilizando un mínimo de 3 puntos de concentración. Cada ciclo analítico comenzó con los patrones de calibración, seguido de las muestras y patrones de control intermedios y finalizó con patrones de control, aceptándose un coeficiente de variación máximo del 10%. Las longitudes de onda (nm), tasas de recuperación (%) e incertidumbre (%) fueron las siguientes: Ca (184.0, 317.9 nm; 94.3% \pm 4.3%), Fe (239.6, 238.2 nm; 103.9% \pm 3.9%), K (766.5 nm; 94.6% \pm 4.6%), Mg (279.5, 280.3, 285.2 nm; 94.7% \pm 4.7%), Mn (260.6, 279.5 nm; 96.2% \pm 6.2%), Na (589.6 nm; 95.2% \pm 5.2%), P (185.9, 213.6 nm; 93.5% \pm 3.5%), Cu (224.7, 324.8 nm; 96.9% \pm 4.1%), S (180.7, 182.0 nm; 104.3% \pm 4.3%), Zn (206.2 nm; 105.0% \pm 5.0%) y Sr (421.5 nm; 97.0% \pm 7.0%). Todas las concentraciones se expresaron en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. El límite de detección fue de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para los componentes mayoritarios (Ca, K, Mg, Na, P y S) y de 0.001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el resto de los elementos.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando SPSS v. 24.0 (IBM, Armonk, EE. UU.). Para todas las concentraciones elementales se calcularon las medias geométricas y los errores estándar. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Levene. Se empleó un modelo lineal general (MLG), junto con pruebas *post hoc* de Tukey (HSD) y Scheffé, para analizar las relaciones entre el peso, la concentración de elementos y el lote. Asimismo, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de comparaciones *post hoc*, para evaluar las diferencias entre lotes. El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas se estableció en $\alpha = 0.1$.

Para identificar el lote probable de los peces a partir del conjunto de datos, se realizaron 2 análisis estadísticos multivariantes: un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis discriminante canónico (ADC). Estos métodos permiten reducir datos de alta dimensionalidad a un conjunto más reducido de patrones interpretables, facilitando así la identificación de agrupaciones naturales y de las variables que contribuyen a dichos patrones. En el ACP, la reducción de dimensionalidad se logra mediante la extracción de componentes principales (CP), que son combinaciones lineales de las variables originales que maximizan la varianza explicada de los datos. Por el contrario, el ADC genera funciones discriminantes canónicas (FDC) que maximizan la separación entre grupos basándose en esas mismas variables. La contribución relativa de cada elemento a la estructura multivariante se

evalúa a partir de sus respectivos pesos factoriales (*loadings*) o coeficientes.

En el ACP se consideró un umbral de carga factorial de 0.32, correspondiente a una varianza media explicada del 56.6% (Peterson 2000). Además, la validez del método se evaluó mediante el índice de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), la prueba de esfericidad de Bartlett ($P < 0.05$) y el criterio de autovalores (valores > 1). En el ADC se utilizó el estadístico lambda de Wilks para evaluar la significación de la discriminación ($P < 0.05$). Asimismo, se aplicó un procedimiento de validación cruzada mediante división de la muestra (*split-sample*) para evaluar la capacidad de las variables seleccionadas para predecir los lotes de ARA. En este proceso de validación, se eliminó un individuo de la matriz original. A continuación, se realizó el ADC con las observaciones restantes para clasificar el individuo omitido. El número de individuos mal clasificados indicó el grado de solapamiento entre grupos, mientras que la proporción de individuos correctamente reclasificados se utilizó como medida de la integridad del grupo (Poulet et al. 2005, Yakubu y Okunsebor 2011).

Las ecuaciones de clasificación se utilizaron para discriminar nuevos ejemplares de lotes desconocidos. En estas ecuaciones, las constantes y los coeficientes de las funciones se obtuvieron para cada combinación de tejido, lote y elemento mediante la Ec. (1):

$$F(x) = a + (b[X]), \quad (1)$$

donde a es la constante para una combinación de tejido y lote, b es el coeficiente de la función de clasificación para la combinación de un elemento y un lote, y $[X]$ es la concentración de un elemento para un determinado tejido y lote (en un ejemplar concreto). El resultado con el valor más alto indicó la posible asignación de lote para dicho ejemplar.

RESULTADOS

Los pesos medios fueron de 592.96 \pm 131.69 g (lote 1), 520.74 \pm 98.06 g (lote 2) y 517.44 \pm 104.19 g (lote 3). No se detectó una influencia directa del peso de los peces sobre la concentración de elementos (MLG, $P > 0.05$). Las concentraciones de elementos inorgánicos detectadas en las branquias y huesos de juveniles de ARA se muestran en la Tabla 1. El elemento que presentó la mayor concentración fue el Ca, mientras que el Cu presentó la menor concentración. En las branquias, se observaron diferencias significativas entre lotes para las concentraciones de Cu ($P = 0.001$), Mn ($P = 0.008$), S ($P < 0.001$) y Sr ($P = 0.033$). En los huesos, se detectaron diferencias significativas entre lotes para las concentraciones de Cu ($P = 0.008$), Fe ($P = 0.021$), Mg ($P = 0.023$) y Zn ($P < 0.001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tejidos para las concentraciones de Ca, K, Na o P.

En el ACP (Fig. 1 y 2), la varianza explicada (VE), el índice KMO, la prueba de esfericidad de Bartlett y el criterio

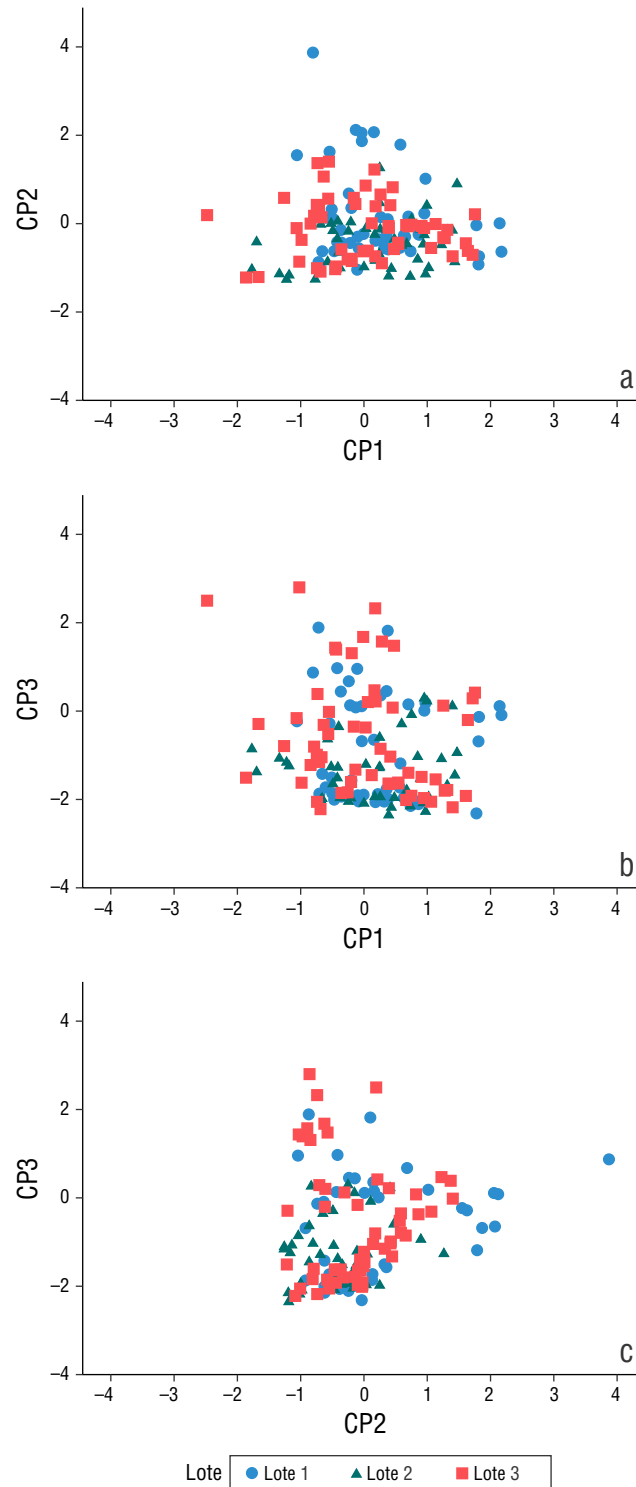


Figura 1. Distribución espacial de los lotes de Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en cautividad en jaulas marinas], lote 3 [capturados en estado silvestre]) basada en los componentes del análisis de componentes principales (ACP) para las branquias: CP1/CP2 (a), CP1/CP3 (b), CP2/CP3 (c). Varianza explicada (VE): CP1 (VE = 48.4%; P, Ca, Mn, Sr, Mg y Zn), CP2 (VE = 24.8%; K, Na, S), CP3 (VE = 15.1%; Cu, Fe).

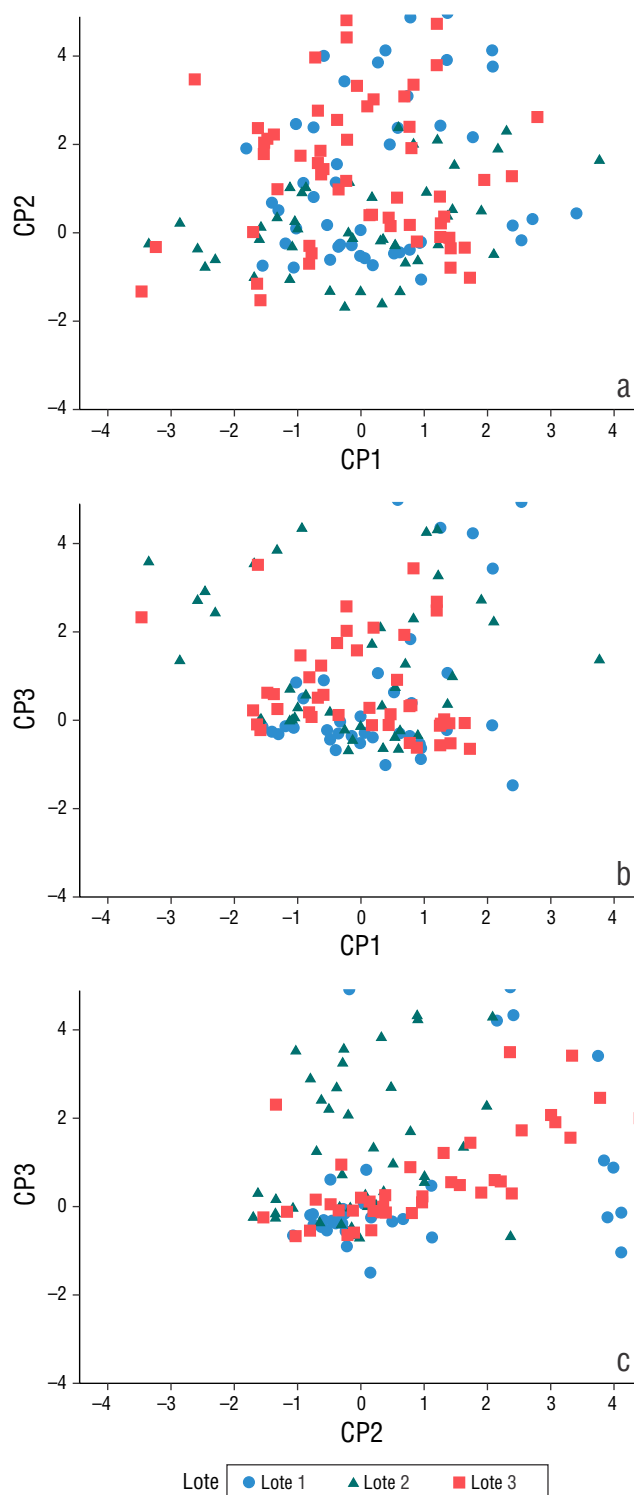


Figura 2. Distribución espacial de los lotes de Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en cautividad en jaulas marinas], lote 3 [capturados en estado silvestre]) basada en los componentes del análisis de componentes principales (ACP) para el hueso: CP1/CP2 (a), CP1/CP3 (b), CP2/CP3 (c). Varianza explicada (VE): CP1 (VE = 45.7%; Ca, Mg, Sr, Mn, P, Zn, Na), CP2 (VE = 17.2%; S, K), CP3 (VE = 10.7%; Cu, Fe).

Tabla 1. Concentraciones de elementos inorgánicos en tejidos de Atún Rojo del Atlántico (ARA; *Thunnus thynnus*) por lote (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en cautividad en jaulas marinas] y lote 3 [capturados en estado silvestre]). Datos: media geométrica \pm error estándar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso húmedo). Para cada elemento y tejido, la misma letra en superíndice indica diferencias estadísticas entre lotes.

Elemento	Branquias			Hueso		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Ca	(5.3 \pm 0.4) $\times 10^4$	(4.4 \pm 0.5) $\times 10^4$	(4.0 \pm 0.5) $\times 10^4$	(8.3 \pm 0.4) $\times 10^4$	(8.4 \pm 0.5) $\times 10^4$	(8.9 \pm 0.6) $\times 10^4$
Cu	3.5 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2 ^b	4.2 \pm 0.4 ^b	0.39 \pm 0.07 ^a	0.5 \pm 0.1 ^b	0.8 \pm 0.1 ^{a,b}
Fe	(6.3 \pm 1.6) $\times 10^2$	(5.2 \pm 0.7) $\times 10^2$	(5.1 \pm 2.2) $\times 10^2$	29 \pm 3 ^a	49 \pm 9 ^a	44 \pm 85
K	(1.6 \pm 0.3) $\times 10^3$	(1.0 \pm 0.2) $\times 10^3$	(1.1 \pm 0.2) $\times 10^3$	(1.7 \pm 0.3) $\times 10^3$	(1.4 \pm 0.3) $\times 10^3$	(1.6 \pm 0.2) $\times 10^3$
Mg	(3.2 \pm 0.3) $\times 10^3$	(2.3 \pm 0.4) $\times 10^3$	(2.2 \pm 0.2) $\times 10^3$	(1.6 \pm 0.196) $\times 10^3$	(1.46 \pm 0.09) $\times 10^{3b}$	(1.9 \pm 0.1) $\times 10^{3b}$
Mn	36 \pm 3 ^a	25 \pm 4	20 \pm 2 ^a	17 \pm 1	16 \pm 1	16 \pm 1
Na	(3.1 \pm 0.6) $\times 10^3$	(1.4 \pm 0.3) $\times 10^3$	(1.6 \pm 0.4) $\times 10^3$	(3.2 \pm 0.3) $\times 10^3$	(2.8 \pm 0.3) $\times 10^3$	(3.5 \pm 0.2) $\times 10^3$
P	(3.6 \pm 0.3) $\times 10^4$	(2.7 \pm 0.3) $\times 10^4$	(2.6 \pm 0.2) $\times 10^4$	(4.4 \pm 0.4) $\times 10^4$	(3.8 \pm 0.2) $\times 10^4$	(4.4 \pm 0.3) $\times 10^4$
S	(5.8 \pm 0.2) $\times 10^{3a}$	(3.4 \pm 0.3) $\times 10^{3a,b}$	(4.7 \pm 0.2) $\times 10^{3b}$	(2.5 \pm 0.1) $\times 10^3$	(2.3 \pm 0.2) $\times 10^3$	(2.6 \pm 0.2) $\times 10^3$
Sr	(2.8 \pm 0.2) $\times 10^{2a}$	(2.6 \pm 0.3) $\times 10^2$	(1.8 \pm 0.2) $\times 10^{2a}$	(2.2 \pm 0.1) $\times 10^2$	(2.6 \pm 0.2) $\times 10^2$	(2.4 \pm 0.1) $\times 10^2$
Zn	68 \pm 6	50 \pm 5	58 \pm 5	37 \pm 2 ^a	40 \pm 3 ^b	55 \pm 4 ^{a,b}

de autovalores fueron adecuados para ambos tejidos. El índice KMO superó 0.5 en ambos casos, lo que indica que los datos eran adecuados para el análisis (Shrestha 2021). Los 11 elementos analizados se representaron mediante 3 CP tanto en branquias como en huesos, explicando el 88.4% y el 73.7% de la varianza total, respectivamente. Los índices KMO para ambos tejidos superaron 0.7 (0.766 en branquias y 0.731 en huesos), aunque la VE fue mayor en branquias (>0.771) que en huesos (>0.551). En el tejido branquial, el CP1 estuvo compuesto por P, Sr, Ca, Mn, Mg y Zn; el CP2 incluyó K, Na y S; y el CP3 estuvo definido por Cu y Fe. No se observó una separación clara entre grupos, aunque el lote 2 se situó en la región negativa tanto de CP2 como de CP3 (Fig. 1). En el tejido óseo, el CP1 estuvo compuesto por Ca, Mg, Sr, Mn, P, Zn y Na; el CP2 incluyó S y K; y el CP3 estuvo cargado con Cu y Fe, sin una diferenciación clara entre grupos (Fig. 2). Los CP mostraron una composición elemental similar en ambos tejidos, con la excepción del Na, que se asoció a CP2 en branquias y a CP1 en huesos.

En el ADC, se seleccionaron 4 elementos (Mg, Mn, S y Zn) para las funciones discriminantes en ambos tejidos, mientras que 3 elementos (Ca, K y Na) no fueron seleccionados en ninguno de ellos. Los datos de las FDC se presentan en la Tabla 2.

Se generaron 2 FDC tanto para branquias como para huesos, cada una compuesta por los elementos identificados como más discriminantes por el *software* analítico (Yakubu y Okunsebor 2011). El porcentaje de casos correctamente clasificados tras la aplicación del método de validación cruzada en el ADC fue del 80.0% en branquias y del 77.0% en huesos. Para ambos tejidos, el lote 3 fue el que se discriminó con mayor claridad, seguido de los lotes 1 y 2 (Tabla 3). Las funciones de clasificación se presentan en la Tabla 4, y las diferencias entre los 3 grupos se muestran en la Figura 3.

DISCUSIÓN

Las concentraciones de elementos inorgánicos se exploraron como un posible enfoque para discriminar entre lotes de juveniles de ARA y proporcionar una alternativa más sencilla y rentable a las técnicas ya establecidas. El marcaje artificial (Block et al. 2005, Fromentin 2010), incluyendo el uso de marcadores químicos (Warren-Myers et al. 2015, Tulli et al. 2020), marcadores moleculares (Boustany et al. 2008, Riccioni et al. 2010) y marcadores genéticos (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2019), implica elevados costes logísticos y económicos, que podrían evitarse mediante el uso de trazadores naturales, en particular aquellos presentes

Tabla 2. Funciones discriminantes canónicas (FDC) basadas en elementos, obtenidas a partir del análisis discriminante canónico (ADC), su contribución a la discriminación entre grupos (%) y su precisión global (%) según el tipo de tejido (branquias y hueso).

	Función	Autovalor	Varianza Explicada (%)	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Coefficientes de FCD (estandarizados)
Branquia	1	1.45	72.2	0.77	0.26	Cu (0.93), Mg (1.9), Mn (-2.65), S (-0.87), Zn (0.81)
	2	0.56	27.8	0.60	0.64	Cu (0.13), Mg (-0.04), Mn (-0.61), S (0.91), Zn (0.38)
Hueso	1	1.91	79.7	0.81	0.23	Fe (0.82), Mg (2.04), Mn (-2.20), P (0.63), S (-0.61), Sr (-1.16), Zn (0.98)
	2	0.49	20.3	0.57	0.67	Fe (0.25), Mg (-0.17), Mn (-0.69), P (-1.22), S (0.13), Sr (1.45), Zn (0.52)

en subproductos de la acuicultura como las branquias y los tejidos óseos.

En cuanto a las concentraciones elementales, no se encontraron diferencias en Ca, K, Na y P (macroelementos) entre los lotes, lo que contradice nuestra hipótesis. Esto probablemente se deba a que estos elementos desempeñan funciones clave en procesos fisiológicos, como el mantenimiento del equilibrio osmótico y ácido-base, así como en el desarrollo y mantenimiento del sistema esquelético (Lall 2003, Zimmer et al. 2019, Lall y Kaushik 2021). Además, no existían datos en la literatura científica sobre la presencia de estos elementos en tejidos óseos y branquiales de ARA que permitieran comparar nuestros resultados.

Cabe destacar que Cu, Mn, S y Sr en tejido branquial fueron los principales contribuyentes a la diferenciación entre lotes, mientras que en el tejido óseo fueron Cu, Fe, Mg y Zn, lo cual concuerda con nuestra hipótesis. La elevada variabilidad entre lotes podría explicarse porque estos son microelementos

(excepto el Mg) que participan en numerosas funciones fisiológicas, procesos bioquímicos y rutas metabólicas, además de actuar como componentes esenciales o cofactores en sistemas enzimáticos (Lall 2003, National Research Council 2011, Lall y Kaushik 2021). Sin embargo, solo un elemento (Cu) mostró diferencias estadísticamente significativas entre lotes en ambos tejidos (el lote 3 presentó concentraciones más elevadas que los lotes 1 y 2; Tabla 1). Este resultado coincide con un estudio previo en tejidos blandos de ARA (cerebro, hígado, músculo y riñón; Salvat-Leal et al. 2023), en el que el Cu fue el único elemento que mostró diferencias estadísticas entre lotes en todos los tejidos (también con concentraciones más altas en ejemplares silvestres).

A pesar de encontrarse en la menor concentración entre los elementos analizados, el Cu es esencial para la función celular (Lall y Kaushik 2021) y está siempre presente en los peces. Las mayores concentraciones de Cu en ejemplares silvestres en comparación con los criados en cautividad podrían deberse a una mayor exposición a este elemento a través de sus presas (Bustamante et al. 2002, 2004, 2006). De hecho, en comparación con los criados en cautividad, los atunes silvestres presentan una dieta más variada, compuesta por peces pelágicos pequeños, camarones, cefalópodos y crustáceos (Uotani et al. 1990, Sinopoli et al. 2004, Sarà y Sarà 2007), los cuales requieren Cu para sus procesos respiratorios (Lara Jacobo et al. 2016) y su funcionamiento biológico general (Rjeibi et al. 2015). En contraste, los atunes criados en cautividad son alimentados inicialmente con una dieta artificial, seguida de peces pelágicos descongelados. Por lo tanto, el Cu podría acumularse en los atunes silvestres a través de la cadena trófica y constituir un marcador útil para la discriminación de lotes.

En cuanto al resto de elementos con diferencias estadísticas significativas, los tejidos óseos del lote 1 mostraron mayores concentraciones de Mg que los del lote 2 y mayores concentraciones de Zn que los de los lotes 2 y 3 (Tabla 1). Además, se observaron concentraciones intermedias de Fe en

Tabla 3. Precisión de clasificación (*) del análisis discriminante canónico (ADC) y porcentaje de clasificación errónea (%) por lote (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en cautividad en jaulas marinas], lote 3 [capturados en estado silvestre]) y tipo de tejido (branquias y hueso).

	Función	1	2	3
Branquia	1	79.2*	8.3	12.5
	2	13.6	77.3*	9.1
	3	0.0	17.2	82.8*
Hueso	1	75.0*	12.5	12.5
	2	31.8	63.6*	4.5
	3	7.1	3.6	89.3*

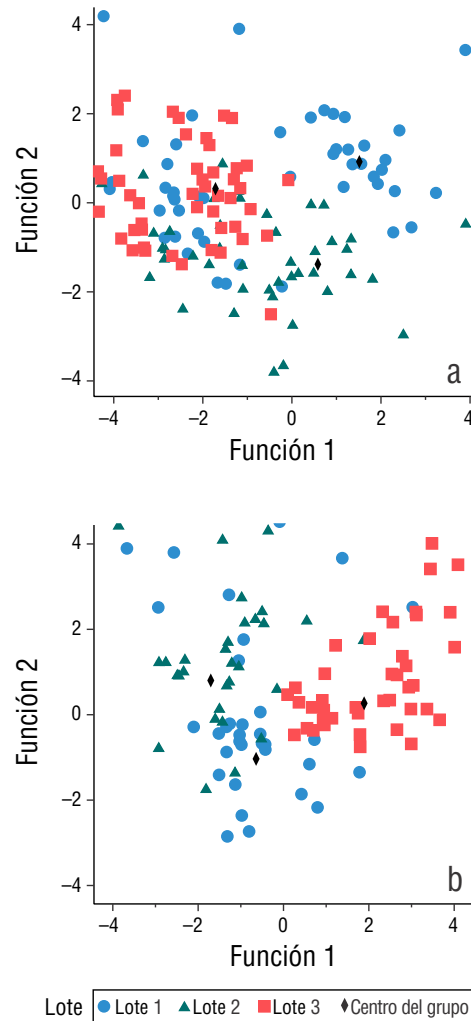


Figura 3. Distribución espacial de los lotes de Atún Rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en jaulas marinas], lote 3 [capturados en estado silvestre]) basada en las funciones del análisis canónico discriminante (ACD) y la separación de grupos según el tipo de tejido: branquias (Función 1; varianza explicada [VE] = 27.8%; Cu = 0.933; Mg = 1.917; Zn = 0.809; S = -0.872; Mn = -2.647 | Función 2; VE = 72.2%; S = 0.908; Zn = 0.378; Cu = 0.129; Mg = -0.042; Mn = -0.610) (a) y hueso (Función 1; VE = 20.3%; Mg = 2.042; Zn = 0.978; Fe = 0.816; P = 0.634; S = -0.611; Sr = -1.164; Mn = -2.197 | Función 2; VE = 79.7%; Sr = 1.451; Zn = 0.522; Fe = 0.246; S = 0.133; Mg = 0.172; Mn = -0.688; P = -1.216) (b).

los ejemplares del lote 1. De forma interesante, las concentraciones de Mn y S en branquias fueron más elevadas en los ejemplares del lote 1. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen datos publicados sobre estos elementos en tejidos branquiales u óseos de juveniles de ARA, aunque varios estudios en tejidos blandos han reportado concentraciones significativamente más altas en atunes silvestres que en ejemplares de acuicultura (Vizzini et al. 2010, Percin et al. 2011, Sogut y Percin 2011, Milatou et al. 2015, Salvat-Leal et al. 2023).

Este hallazgo coincide con nuestras concentraciones de Cu en tejido óseo, pero no en tejido branquial. Varias hipótesis podrían explicar esta diferencia, entre ellas: (1) la naturaleza

y función del tejido (i.e., las branquias están en contacto directo con el medio y filtran el agua circundante); (2) las fluctuaciones en las condiciones que afectan a los lotes (e.g., dieta, composición del agua, niveles de actividad física e interacciones entre elementos dentro del organismo); (3) la influencia de factores físicos (e.g., temperatura, corrientes y oxígeno disuelto); y (4) la presencia de restos de alimento, heces y orina (véase revisión en Lall y Kaushik 2021).

A partir de estas observaciones, se examinaron los patrones de distribución revelados por los análisis multivariantes. El ACP no mostró diferencias claras en la distribución espacial de los individuos entre los 3 lotes, aunque las branquias fueron el único tejido en el que el CP3 (Cu y Fe) mostró una

Tabla 4. Ecuaciones de clasificación por lote (lote 1 [criados en tanques terrestres], lote 2 [criados en jaulas marinas], lote 3 [capturados en estado silvestre]) y tipo de tejido (branquias y hueso).

	Lote	Ecuación
Branquia	1	$(-14.2) + (-0.607 \times [\text{Cu}]) + (-22.8 \times [\text{Mg}]) + (0.333 \times [\text{Mn}]) + (44.0 \times [\text{S}]) + (-0.037 \times [\text{Zn}])$
	2	$(-6.44) + (0.059 \times [\text{Cu}]) + (-5.04 \times [\text{Mg}]) + (0.154 \times [\text{Mn}]) + (21.86 \times [\text{S}]) + (-0.019 \times [\text{Zn}])$
	3	$(-10.2) + (1.00 \times [\text{Cu}]) + (12.3 \times [\text{Mg}]) + (-0.162 \times [\text{Mn}]) + (23.3 \times [\text{S}]) + (0.042 \times [\text{Zn}])$
Hueso	1	$(-12.0) + (-0.007 \times [\text{Fe}]) + (-29.8 \times [\text{Mg}]) + (0.592 \times [\text{Mn}]) + (-0.322 \times [\text{P}]) + (48.9 \times [\text{S}]) + (0.033 \times [\text{Sr}]) + (-0.054 \times [\text{Zn}])$
	2	$(-14.2) + (-0.008 \times [\text{Fe}]) + (-69.7 \times [\text{Mg}]) + (0.701 \times [\text{Mn}]) + (-2.11 \times [\text{P}]) + (58.6 \times [\text{S}]) + (0.079 \times [\text{Sr}]) + (-0.051 \times [\text{Zn}])$
	3	$(-14.1) + (0.001 \times [\text{Fe}]) + (58.2 \times [\text{Mg}]) + (-0.293 \times [\text{Mn}]) + (-0.286 \times [\text{P}]) + (32.8 \times [\text{S}]) + (0.019 \times [\text{Sr}]) + (0.129 \times [\text{Zn}])$

ligera diferenciación para los ejemplares del lote 2 (Fig. 1), en concordancia con la importancia previamente señalada del Cu en este tejido. En comparación, la inclusión del CP3 (Cu y Fe) en el ACP para el tejido óseo no mejoró la separación entre lotes, a pesar de que ambos elementos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes 1 y 2. Al comparar estos resultados con estudios en tejidos blandos (Salvat-Leal et al. 2023), se ha observado una mayor capacidad de discriminación en algunos de estos tejidos (riñón y músculo). En contra de nuestra hipótesis, parece que este análisis estadístico no es adecuado para diferenciar lotes de ARA utilizando estos tejidos duros.

En cuanto al ADC, se generaron 2 funciones cuyos índices de rendimiento coinciden con los reportados por Balzarini et al. (2015), con el objetivo de maximizar las diferencias entre poblaciones. Se observó una discriminación significativa en todos los tejidos (lambda de Wilks, $P < 0.05$), y los coeficientes de correlación indicaron que las funciones obtenidas eran útiles, especialmente la FDC1, que explicó el 59.1% de la varianza total en branquias y el 65.6% en hueso (cuando se esperaban valores superiores al 45%) (Torrado-Fonseca y Berlanga-Silvente 2013). Para ambos tejidos, Ca, K y Na no se incluyeron en las funciones del ADC, lo que coincide con la ausencia previa de diferencias estadísticas significativas para estos elementos. En ambos tejidos, se seleccionaron 4 elementos (Mg, Mn, S y Zn) para las FDC; se seleccionó Cu para branquias y Fe y Sr para hueso. Inesperadamente, el Cu no apareció en la selección del ADC para tejido óseo. Por tanto, existieron elementos en las funciones del ADC con y sin diferencias estadísticas entre lotes (Tabla 1), lo que indica que no se pudo identificar un patrón específico único para discriminar entre lotes basándose en estos elementos. Finalmente, las branquias mostraron la mayor tasa de éxito en el ADC, con los menores porcentajes de confusión entre los lotes 1

y 3. Este porcentaje fue superior al observado en hígado y músculo, pero inferior al reportado en riñón y cerebro en ARA (Salvat-Leal et al. 2023).

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del análisis de concentraciones elementales y de las pruebas multivariantes empleadas en el presente estudio (ACP y ADC) indicaron que es posible lograr cierto grado de discriminación entre lotes de ARA utilizando la composición de macro y microelementos tanto en tejidos branquiales como en tejidos óseos. No obstante, aunque los resultados son prometedores, las diferencias entre lotes no fueron siempre lo suficientemente consistentes como para establecer un patrón definitivo que permita una identificación infalible de los lotes basada únicamente en algunos de los elementos analizados o en un único método de discriminación.

Traducido al español por los autores.

DECLARACIONES

Material suplementario

Este trabajo no incluye material suplementario.

Agradecimientos

La autora principal disfrutó de un contrato predoctoral concedido por la Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (España). Los autores agradecen a Francisco San Nicolás (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de

Investigaciones Científicas, Murcia) su asistencia en el análisis de las muestras. Asimismo, los autores desean agradecer al personal de la planta experimental de Mazarrón su colaboración.

Fondos

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, en el marco del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (Ref. RTC-2016-5835-2).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: AO, DR; Curación de datos: ISL, DR, EB; Análisis formal: ISL, DR; Obtención de financiación: AO; Investigación: ISL, EB; Metodología: AO, DR; Administración del proyecto: AO; Recursos: AO, DR; Supervisión: AO, DR, EB; Validación: EB; Visualización: ISL; Redacción – borrador original: ISL; Redacción – revisión y edición: AO, DR, EB.

Disponibilidad de datos

Los datos de este estudio están disponibles a través del autor de correspondencia, previa solicitud razonable.

Aprobaciones y permisos éticos para estudios con animales

El muestreo de atún salvaje se realizó con los permisos correspondientes otorgados por las autoridades competentes (ICCAT REC 11-06). De conformidad con la legislación europea (OJEU 2010), ninguno de los procedimientos del presente estudio requirió autorización ética.

Uso de herramientas de IA

Los autores no emplearon herramientas de inteligencia artificial en este trabajo.

REFERENCIAS

- Aenglong C, Wang YM, Limpawattana M, Sukketsiri W, Tang QJ, Klaypradit W, Kerdpiboon S. 2022. Synthesis of soluble calcium compound from skipjack tuna bones using edible weak acids. *LWT-Food Sci Technol.* 162:113460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113460>
- Aschner JL, Aschner M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Asp Med.* 26:353-362. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.003>
- Balzarini M, Bruno C, Córdoba M, Teich I. 2015. Herramientas en el Análisis Estadístico Multivariado. 1st ed. Córdoba (Argentina): Escuela Virtual Internacional CAVILA, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. 200 p.
- Baudin JP, Adam C, Garnier-LaPlace J. 2000. Dietary uptake, retention and tissue distribution of ⁵⁴Mn, ⁶⁰Co and ¹³⁷Cs in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Water Res.* 34:2869-2878. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00365-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00365-6)
- Block BA, Teo SLH, Walli A, Boustany A, Stokesbury MJW, Farwell CJ, Weng KC, Dewar H, Williams TD. 2005. Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. *Nature.* 434:1121-1127. <https://doi.org/10.1038/nature03463>
- Boustany A, Reeb CA, Block BA. 2008. Mitochondrial DNA and electronic tracking reveal population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Mar Biol.* 156 (1):13-24. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1058-0>
- Brucka-Jastrzëbska E, Kawczuga D, Rajkowska M, Protasowicki M. 2009. Levels of microelements (Cu, Zn, Fe) and macroelements (Mg, Ca) in freshwater fish. *J Elem.* 14(3):437-447. <https://doi.org/10.5601/jelem.2009.14.3.02>
- Bury N, Grosell M. 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135(2):97-105. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(03\)00021-8](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(03)00021-8)
- Bury NR, Walker PA, Glover CN. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J Exp Biol.* 206(1):11-23. <https://doi.org/10.1242/jeb.00068>
- Bustamante P, Teyssie JL, Fowler S, Cotret O, Danis B, Miramand P, Warnau M. 2002. Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar Ecol Prog Ser.* 231:167-77. <https://doi.org/10.3354/meps231167>
- Bustamante P, Teyssie JL, Danis B, Fowler S, Miramand P, Cotret O, Warnau M. 2004. Uptake, transfer and distribution of silver and cobalt in tissues of the common cuttlefish *Sepia officinalis* at different stages of its life cycle. *Mar Ecol Prog Ser.* 269:185-95. <https://doi.org/10.3354/meps269185>
- Bustamante P, Teyssie J, Fowler S, Wamau M. 2006. Assessment of the exposure pathway in the uptake and distribution of americium and cesium in cuttlefish (*Sepia officinalis*) at different stages of its life cycle. *J Exp Mar Biol Ecol.* 331(2):198-207. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.10.018>
- Campobasso F, Fanizzi A, Bello G, Santamaria N, Corriero A. 2017. A 'machine learning' technique for discriminating captive-reared from wild Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Scombridae), based on differential fin spine bone resorption. *Fish Res.* 194:42-49. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.05.008>
- Cubadda F, Raggi A, Coni. 2006. Element fingerprinting of marine organisms by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 384(4):887-896. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0256-6>
- Dabrowska H, Meyer-Burgdorff KH, Gunther KD. 1991. Magnesium status in freshwater fish, common carp (*Cyprinus carpio*, L.) and the dietary protein-magnesium interaction. *Fish Physiol Biochem.* 9:165-172. <https://doi.org/10.1007/BF02265132>
- De la Gándara F, Ortega A, Buentello A. 2016. Tuna Aquaculture in Europe. In: Benetti DD, Partridge GJ, Buentello A (eds.), *Advances in Tuna Aquaculture. From hatchery to market.* London (UK): Academic Press. p. 115-157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411459-3.00005-9>
- Evans DH, Claiborne JB. 2009. Osmotic and ionic regulation in fishes. In: Evans DH (ed.), *Osmotic and Ionic regulation: Cells and Animals.* Boca Raton (USA): CRC Press. p. 295-366. <https://doi.org/10.1201/9780849380525-8>
- Fromentin JM. 2010. Tagging bluefin tuna in the Mediterranean Sea: challenge or mission impossible? *Collect Vol Sci Pap.* (1021-5212) (ICCAT). 65(3):812-821.

- Grosell M. 2012. Copper. In: Wood CM, Farrell AM, Brauner CJ (eds.), *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Cambridge (UK): Academic Press. p. 53-133.
- Hogstrand C. 2012. Zinc. In: Wood CM, Farrell AM, Brauner CJ (eds.), *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Cambridge (MA): Academic Press. p. 135-200.
- Jara Z, Chodynieski A. 1999. *Ichtopatologia*. 1st ed. Wrocław (Poland): Agriculture University of Wrocław. 478 p.
- Kim SK, Jung WK. 2007. Fish and bone as a calcium source. In: Shahidi F (eds.), *Maximising the Value of Marine By-Products*. Sawston (UK): Woodhead Publishing. p.328-339. <https://doi.org/10.1533/9781845692087.2.328>
- Kormarnisky LA, Christopherson RJ, Basu TK. 2003. Sulfur: its clinical and toxicological aspects. *Nutrition*. 19(1):54-61. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00833-X](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00833-X)
- Lall SP. 2003. The minerals. In: Halver JE, Hardy RW (eds.), *Fish Nutrition*. London (UK): Academic Press. p. 259-308.
- Lall SP, Kaushik SJ. 2021. Nutrition and metabolism of minerals in fish. *Animals*. 11(9):1-41. <https://doi.org/10.3390/ani11092711>
- Lara Jacobo L, Diaz F, Denisse Re A, Galindo C, Sánchez-Lizarraga AL, Nuñez-Moreno LA, Moreno-Sierra D. 2016. Physiological responses of the red rocky crab *Cancer antennarius* exposed to different concentrations of copper sulfate. *Rev Biol Mar Oceanogr*. 51(2):327-336.
- Limburg KE, Wuenschel MJ, Hüseyin K, Heimbrand Y, Samson M. 2018. Making the otolith magnesium chemical calendar-clock tick: plausible mechanism and empirical evidence. *Rev Fisheries Sci Aquaculture*. 26(4):479-493. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1458817>
- López-Álvarez M, Souto-Montero P, Durán S, Pérez-Davila S, Vázquez JA, González P, Serra J. 2024. Valuable Ca/P sources obtained from tuna species' by-products derived from industrial processing: physicochemical and features of skeleton fractions. *Recycling*. 9(6):109. <https://doi.org/10.3390/recycling9060109>
- Milatou N, Dassenakis M, Megalofonou P. 2015. Do fattening process and biological parameters affect the accumulation of metals in Atlantic bluefin tuna? *Food Addit Contam Part A*. 32(7):1129-1139. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1038855>
- Miller DW, Vetter RJ, Atchison GJ. 1980. Effect of temperature and dissolved oxygen on uptake and retention of ⁵⁴Mn in fish. *Health Phys*. 38(2):221-225.
- Murthy LM, Rao BM, Asha KK, Prasad MM. 2014. Extraction and quality evaluation of yellowfin tuna bonepowder. *Fish Technol*. 51(1):38-42.
- National Research Council. 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. 1st ed. Washington DC (USA): The National Academies Press. 392 p.
- [OJEU] Official Journal of the European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Brussels (Belgium): OJEU. Directive, no. L 276/33. 47 p. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>
- [OJEU] Official Journal of the European Union. 2016. Regulation (UE) 2016/1627 of the European Parliament and the Council of 14 September 2016 on a multiannual recovery plan for eastern Atlantic and Mediterranean bluefin tuna and repealing Council Regulation (EC) No 302/2009. Brussels (Belgium): OJEU. Regulation, no. L252:1. 52 p.
- Ortega A, De la Gándara F. 2017. Closing the life cycle of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* in captivity. *Proc Aquac Eur*. 17:857-858.
- Percin F, Sogut O, Altinelataman C, Soylak M. 2011. Some trace elements in front and rear dorsal ordinary muscles of wild and farmed bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Turkish part of the eastern Mediterranean Sea. *Food Chem Toxicol*. 49(4):1006-1010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.007>
- Peterson RA. 2000. A meta-analysis of variance accounted for and factor loadings in exploratory factor analysis. *Mark Lett*. 11(3):261-275. <https://doi.org/10.1023/A:1008191211004>
- Poulet N, Reyjol Y, Collier H, Lek S. 2005. Does fish scale morphology allow the identification of population *Leuciscus burdigalensis* in river Viaur (SW France)? *Aquat Sci*. 67(1):122-127. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0772-z>
- Riccioni G, Landi M, Ferrara G, Milano I, Cariani A, Zane L, Sella M, Barbujani G, Tinti F. 2010. Spatio-temporal population structuring and genetic diversity retention in depleted Atlantic bluefin tuna of the Mediterranean Sea. *Proc Nat Acad Sci*. 107(5):2102-2107. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908281107>
- Rjeibi M, Metian M, Hajji T, Guyot T, Ben Chaouacha-Chekir R, Bustamante P. 2015. Seasonal survey of contaminants (Cd and Hg) and micronutrients (Cu and Zn) in edible tissues of cephalopods from Tunisia: assessment of risk and nutritional benefits. *J Food Sci*. 80(1):T199-206. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12711>
- Rodríguez-Ezpeleta N, Díaz-Arce N, Walter III JF, Richardson DE, Rooker JR, Nøttestad L, Hanke AR, Franks JS, Deguara S, Lauretta MV, et al. 2019. Determining natal origin for improved management of Atlantic bluefin tuna. *Front Ecol Environ*. 17(8):439-444. <https://doi.org/10.1002/fee.2090>
- Rooker JR, Alvarado-Bremer JR, Block BA, Dewar H, De Metrio G, Corriero A, Kraus RT, Princes ED, Rodríguez-Marín E, Secor DH. 2007. Life History and stock structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Rev Fish Sci*. 15(4):265-310. <https://doi.org/10.1080/10641260701484135>
- Rouleau C, Tjalve H, Gottofrey J, Pelletier E. 1995. Uptake, distribution, and elimination of ⁵⁴Mn (II) in brown trout (*Salmo trutta*). *Environ Toxicol Chem*. 14(3):483-490. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140318>
- Salvat-Leal I, Ortega A, Blanco E, García J, Romero D. 2023. Elemental composition in soft tissues as a model for identifying batches of juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *J Food Compos Anal*. 118:105-176. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105176>
- Sarà G, Sarà R. 2007. Feeding habits and trophic levels of bluefin tuna *Thunnus thynnus* of different size classes in the Mediterranean Sea. *J Appl Ichthyol*. 23(2):122-127. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00829.x>
- Shearer KD, Åsgård T. 1992. The effect of water-borne magnesium on the dietary magnesium requirement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem*. 9(5-6):387-392. <https://doi.org/10.1007/BF02274219>
- Shrestha N. 2021. Factor analysis as a tool for survey. *Am J Appl Math Stat*. 9(1):4-11. <https://doi.org/10.12691/ajams-9-1-2>
- Siccardi AJ, Padgett-Vasquez S, Garris HW, Nagy TR, D'Abramo LR, Watts SA. 2010. Dietary strontium increases bone mineral density in intact zebrafish (*Danio rerio*): A potential model system for bone research. *Zebrafish*. 7:267-273. <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0654>
- Sinopoli M, Pipitone C, Campagnuolo S, Campo D, Castriota L, Mostarda E, Andaloro F. 2004. Diet of young-of-the-year bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), in the southern Tyrrhenian (Mediterranean) Sea. *J Appl Ichthyol*. 20(4):310-313. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00554.x>

- Sogut O, Percin F. 2011. Trace elements in the kidney tissue of Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in Turkish seas. *Afr J Biotech.* 10(7):1252-1259.
- Sturrock AM, Hunter E, Milton JA, EIMF, Johnson RC, Waring CP, Trueman CN. 2015. Quantifying physiological influences on otolith microchemistry. *Met Ecol Evol.* 6(7):806-816. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12381>
- Talib A, Hariati AM, Nurhidayati F. 2020. The mineral content and vitamin d on bone flour fish yellowfin tuna. *J Phys Conf Ser* 1517:012042 <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1517/1/012042>
- Taylor LN, Wood CM, McDonald G. 2003. An evaluation of sodium loss and gill metal binding properties in rainbow trout and yellow perch to explain species differences in copper tolerance. *Environ Toxicol Chem.* 22(9):2159-2166. <https://doi.org/10.1897/02-256>.
- Torrado-Fonseca M, Berlanga-Silvente V. 2013. Análisis Discriminante mediante SPSS. *Rev d'Innov Recer Educ.* 6(2):150-166.
- Tulli F, Moreno-Rojas JM, Messina CM, Trocino A, Xiccato G, Muñoz-Redondo JM, Santulli A, Tibaldi E. 2020. The use of stable isotope ratio analysis to trace European sea bass (*D. labrax*) originating from different farming systems. *Animals.* 10(11): 20-42. <https://doi.org/10.3390/ani10112042>
- [UNE] Asociación Española de Normalización (2010). UNE-EN ISO 11885: Calidad del agua. Determinación de elementos seleccionados por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Spanish written standard. 33 p.
- Uotani I, Saito T, Hiranuma K, Nishikawa Y. (1990). Feeding habit of bluefin tuna *Thunnus thynnus* larvae in the western North Pacific Ocean. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56(5):713-717. <https://doi.org/10.2331/suisan.56.713>
- Vizzini S, Tramati C, Mazzola A. 2010. Comparison of stable isotope composition and inorganic and organic contaminant levels in wild and farmed bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, in the Mediterranean Sea. *Chemosphere.* 78(10):1236-1243. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.041>
- Walther BD, Limburg KE. 2012. The use of otolith chemistry to characterize diadromous migrations. *J Fish Biol.* 81(2):796-825. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03371.x>
- Warren-Myers F, Dempster T, Fjellidal PG, Hansen T, Swearer SE. 2015. An industry-scale mass marking technique for tracing farmed fish escapees. *PLoS ONE.* 10:e0118594 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118594>
- Yakubu A, Okunsebor SA. 2011. Morphometric differentiation of two Nigerian fish species (*Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus*) using principal components and discriminant analysis. *Int J Morphol.* 29(4):1429-1434. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022011000400060>
- Zimmer AM, Brix KV, Wood CM. 2019. Mechanisms of Ca²⁺ uptake in freshwater and seawater-acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*, and their response to acute salinity transfer. *J Comp Physiol B.* 189:47-60. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1192-z>