

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y
BIOANALÍTICAS**

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

TÍTULO:

**Trazabilidad de seres vivos: estudio de la eficacia de
repopulación de truchas**

AUTOR:

David Alonso Martínez

FECHA:

Julio 2012, Oviedo

MARIELLA MOLDOVAN FEIER, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado **“TRAZABILIDAD DE SERES VIVOS: ESTUDIO DE LA EFICACIA DE REPOBLACIÓN DE TRUCHAS”**, ha sido realizado por David Alonso Martínez en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster (2011-12) del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 18 de Julio de 2012



Fdo.: Mariella Moldovan Feier

Una vez concluido el Trabajo Fin de Máster, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han estado a mi lado durante la realización de este proyecto y que han hecho posible que este barco llegase a buen puerto.

En primer lugar, agradecerle a la Dra. Mariella Moldovan Feier la paciencia que ha tenido conmigo y la libertad con la que me ha dejado realizar este trabajo.

A Gonzalo Huelga Suárez, por todos los consejos, los ánimos constantes, su paciencia y todo ese tiempo haciendo lo posible y lo imposible a la hora de medir. Gracias, Gonzalo.

Quiero mencionar especialmente a mi tía, la Dra. Isabel Márquez Llano-Ponte por abrir de par en par las puertas del SERIDA, por toda su colaboración y por haberme ayudado con las extracciones de los otolitos. Me ha encantado poder trabajar contigo.

No me olvido de mis padres, a los que les tengo que agradecer todo el apoyo que he recibido para llegar hasta aquí. Os lo debo.

Y a tí, Eva, por ser diferente y por llenar mi vida de colores.

Soy consciente de que falta gente por nombrar, todos los profesores y profesoras del máster, que nos han ayudado a ampliar y profundizar nuestros conocimientos en este microcosmos que es la Química Analítica.

David

Ella siempre

vuela,

alada.

Inundándolo todo,
con purpurina de hada.

Índice

A.1. Marcaje de peces. Tipos, ventajas e inconvenientes.	1
A.1.1. Biológicas	2
A.1.1.1. Marcas parasitarias:	2
A.1.1.2. Marcas morfológicas:	2
A.1.1.3. Marcas genéticas:	2
A.1.2. Químicas	3
A.1.2.1. Inmersión	3
A.1.2.2. Inyección:	3
A.1.2.3. Alimentación:	4
A.1.3. Físicas	4
A.1.3.1. Internas	4
A.1.3.2. Externas	7
A.2. Otolitos.	8
A.3. Marcaje de peces con isótopos estables enriquecidos: del empleo de un único isótopo a la doble marca isotópica.	10
A.4. LA-ICPMS	11
A.4.1. Ablación láser	12
A.4.2. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS)	15
B.1. Objetivos	18
C.1. Instrumentación	19
C.1.1. ICP-MS de doble enfoque.	19
C.1.2. Sistema de Ablación Láser	20
C.1.3. Otra instrumentación	20
C.2. Materiales y reactivos	21
C.3. Muestras	21
C.4. Procedimientos experimentales	24
C.4.1. Inyección	24
C.4.2. Extracción de los otolitos	24
C.4.3. Inmovilización de los otolitos.	25
C.4.4. Desbaste y pulido de las muestras	25
C.4.5. Análisis por LA-ICP-MS	26
C.5. Resultados y discusión	28
C.5.1. Extracción de los otolitos	28
C.5.2. Lavado de los otolitos	29
C.5.3. Inmovilización y pulido de la muestra	29
C.5.4. Medida de las relaciones isotópicas de bario	30

C.5.5. Interferencias producidas en ICP-MS.....	32
C.5.6. Empleo de LA-ICP-MS para la medida de relaciones isotópicas.....	34
C.5.7. Parámetros que afectan a la exactitud de la medida de relaciones isotópicas	34
C.5.8. Parámetros que afectan a la precisión de la medida de las relaciones isotópicas.....	35
C.6. Resultados de la medida de las muestras mediante LA-ICP-MS	36
C.6.1. TB A1	36
C.6.2. TB B4	38
C.6.3. TB C4.....	40
C.6.4. BC13	42

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Marcaje de peces. Tipos, ventajas e inconvenientes.

El etiquetado y marcaje de peces son técnicas esenciales para el estudio y análisis de la fauna acuícola, dado que permite reunir una amplia variedad de información. Las técnicas de marcaje permiten rastrear a los peces, consiguiendo una mejor comprensión de los desplazamientos y de los patrones de migración de esta fauna. Por otro lado, los métodos de marcaje y recaptura proporcionan estimaciones de la población, el crecimiento de los peces, las estimaciones de los mismos y su mortalidad natural.

Al marcar peces es importante considerar el motivo para hacerlo. ¿Es importante poder identificar un pez o un grupo de peces? ¿La marca influye en el comportamiento de los peces o aumenta la mortalidad? ¿Cuáles son las probabilidades de que la marca se pierda o que se produzca un falso positivo? A continuación se muestra una lista de diversos métodos de marcaje con una descripción de cada uno de ellos. La lista se divide en tres categorías separadas: las marcas biológicas (parasitarias, morfológicas y genéticas), las químicas (inmersión, inyección y alimentación) y las físicas.¹

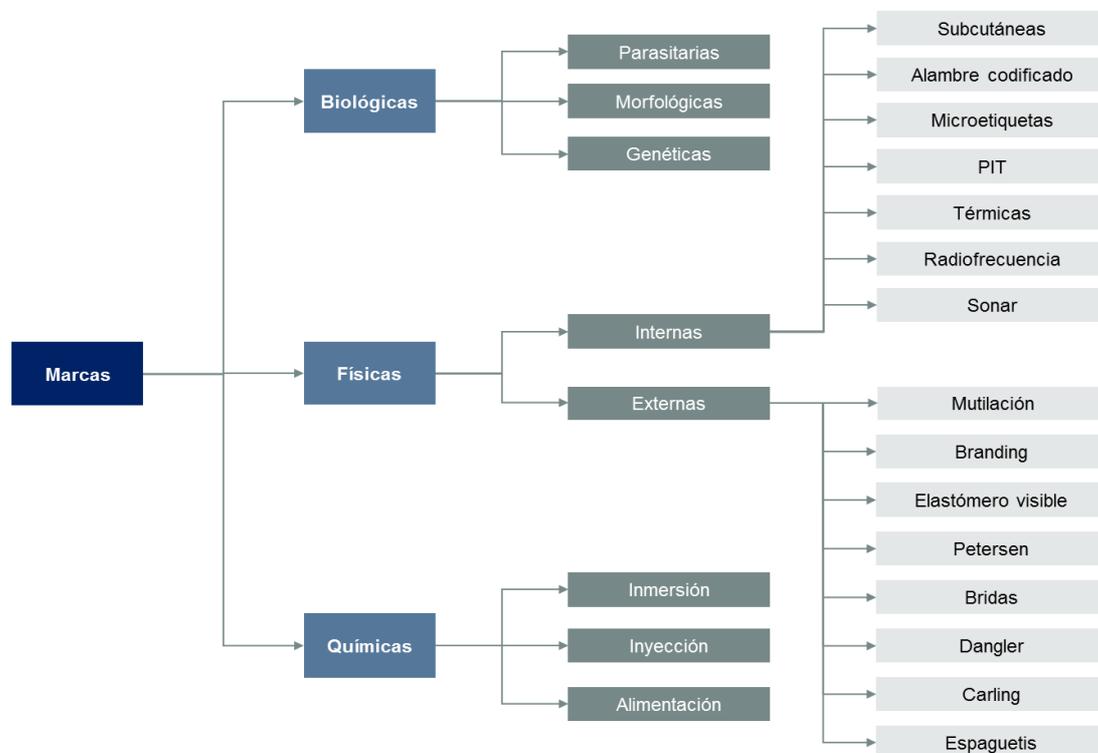


Figura 1 - Resumen de las técnicas de marcado

A.1.1. Biológicas

Son todas aquellas marcas en las que se emplean para el marcaje tanto organismos parásitos como mediante la identificación de características morfológicas identificativas de un grupo concreto de peces de una especie gracias a mutaciones naturales o el empleo de marcas genéticas.

A.1.1.1. Marcas parasitarias:

Se utilizan para identificar peces repoblados así como el desplazamiento y/o la determinación de los patrones de migración.

Las ventajas son: bajos costes de identificación, se puede utilizar en grandes masas de agua y son naturales.

Algunas desventajas son: el tiempo para determinar si los parásitos pueden ser una marca (falso positivo), que la identificación de los individuos no siempre es posible y que se requiere de personal altamente cualificado.

A.1.1.2. Marcas morfológicas:

Se utilizan para diferenciar los peces procedentes de repoblación. Estas marcas están sujetas a las condiciones ambientales que pueden cambiar las características físicas y la superposición de las características genotípicas de las poblaciones. Algunos ejemplos son los recuentos merísticos, pigmentación, la variación de partes proporcionales del cuerpo; forma, tamaño, marcas de la edad de los otolitos o escamas y las composiciones químicas de las escamas o partes óseas y las marcas internas de escama.

A.1.1.3. Marcas genéticas:

Se emplean para identificar poblaciones de peces. La eficacia en la identificación de poblaciones de peces en comparación con métodos morfológicos es una ventaja. Sin embargo presenta un elevado coste tanto de los equipos para la preservación de muestras de sangre así como en el desarrollo de reactivos y el equipo. Otra desventaja es que el análisis puede ser costoso. Dos ejemplos son la electroforesis y método serológico.

A.1.2. Químicas

Ventajas: bajo coste, tiempo de manejo reducido, marcado de un gran número de individuos y las especies más pequeñas.

Desventajas: imposibilidad de identificación de organismos individuales y tendencia a que la retención sea breve porque el crecimiento puede dispersar el marcador y puede ser diferir entre las especies, así como entre los métodos.

A.1.2.1. Inmersión

La tinción por esta técnica permite marcar, simultáneamente, un gran número de peces. La retención de la marca puede convertirse en un problema dependiendo de la edad, el tamaño, la química del agua, temperatura, las concentraciones de productos químicos y la duración de la inmersión. También es importante tener en cuenta la toxicidad del producto químico en ciertas concentraciones, así como cualquier efecto que el marcado tendrá sobre la depredación o la supervivencia reducida.



Figura 2 - Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sumergida en un baño químico de oxitetraciclina.

A.1.2.2. Inyección:

Es conveniente tener en cuenta la difusión y la concentración de la sustancia, el lugar de la inyección, así como la toxicidad del material empleado para la misma. Los posibles problemas son la inyección en los órganos internos y el tiempo que se necesita para inyectar cada pez. El

presente trabajo se basa en el marcado mediante esta técnica, por lo que la explicaremos detalladamente más adelante.

A.1.2.3. Alimentación:

Funciona bien en el laboratorio y en cría en cautividad, donde los peces pueden ser controlados y se pueden alimentar con los tintes. Si no se monitoriza la alimentación pueden surgir problemas con la marca ya que se puede producir que algunos individuos no se alimenten tanto como los demás y el marcador no se reconozca claramente. Varios tintes y productos químicos se han utilizado con un grado variable de éxito.

A.1.3. Físicas

Dentro de las marcas físicas podemos distinguir dos grandes grupos. Las marcas internas, que no sobresalen del cuerpo, y las externas, que sí sobresalen.

A.1.3.1. Internas

Ventajas: no sobresalen del cuerpo y no requieren ninguna separación de las partes de los peces. Pueden ser baratas, no tóxicas y generar menos estrés en los peces en comparación con otros métodos de marcado.

Desventajas: es necesario personal cualificado y la recuperación es extremadamente difícil.

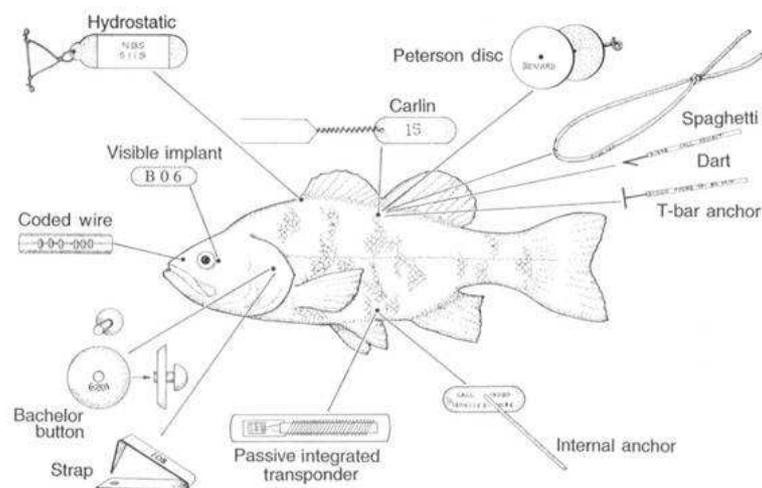


Figura 3 - Tipos más comunes de etiquetas y sus sitios de fijación.

A.1.3.1.1. Etiquetas subcutáneas

Son discos de plástico impresos con números de serie y leyendas con el fin de identificar a los peces. Los discos se plantan entre la capa externa de la piel y los músculos por una pequeña incisión. Esta técnica requiere normalmente el uso de otra marca para identificar que una etiqueta subcutánea se insertó dentro del pez. Es muy barata.

A.1.3.1.2. Etiquetas de alambre codificado

Un pequeño trozo de alambre se inyecta en un pez utilizando aplicadores pequeños o con la mano. Estas etiquetas se pueden colocar en el hocico, el cuello, aletas caudales o cualquier otra zona muscular. Las etiquetas pueden ser identificadas con un detector de metales sensible o de rayos X que puede mostrar el código de colores o muescas que se utilizan para identificar grupos específicos de pescado. Los equipos utilizados para marcar y detectar los cables son muy caros, sin embargo con esta técnica los peces pueden ser etiquetados con rapidez, facilidad y sin alterar su comportamiento.

A.1.3.1.3. Microetiquetas

Su uso original fue la identificación de explosivos. Las microetiquetas son chips microscópicos compuestos por siete capas de plástico que pueden ser codificados por color para identificar a los grupos de peces al igual que las etiquetas de alambre codificado. Hay 300 millones de combinaciones de colores que pueden ser utilizadas. También pueden contener una capa fluorescente o magnética.

A.1.3.1.4. Las etiquetas pasivas de transpondedor integrado (PIT)

El personal investigador utiliza las marcas PIT y los lectores para estudiar los hábitos de migración y el movimiento desde y hacia áreas específicas. Un PIT es un dispositivo de radiofrecuencia que transmite un código individual único para un lector en el que se muestra en una forma numérica o alfanumérica. La etiqueta no tiene una batería interna, de ahí el término "pasivo". El lector excita el circuito de la etiqueta mediante la inducción de radio frecuencia y recibe el código de la etiqueta. La identificación por radiofrecuencia no requiere ver el dispositivo, las etiquetas se pueden leer siempre que estén dentro del rango del detector. La zona del implante depende de la especie, el tamaño del animal y el tamaño de la etiqueta.



Figura 4 - Dos marcas PIT junto a un centavo

A.1.3.1.5. Etiquetas térmicas

El marcado térmico es un medio eficaz de marcar el 100% de los peces en una incubadora. De este modo podemos coger los peces que han sido marcados térmicamente, retirar sus otolitos o los huesos del oído y decir si son o no peces de criadero. Los peces criados se marcan antes de la eclosión o poco después en las incubadoras. Mediante la manipulación de la temperatura del agua en las mismas, los técnicos de incubación pueden colocar una serie de anillos en los otolitos que los identifican por la planta de incubación y año de cría; este proceso forma una especie de "código de barras" en el otolito que se mantiene durante toda la vida del pez. Estos patrones de bandas se pueden personalizar para cada año de incubación y cría, variando el número de bandas, la anchura y la colocación espacial de éstas.

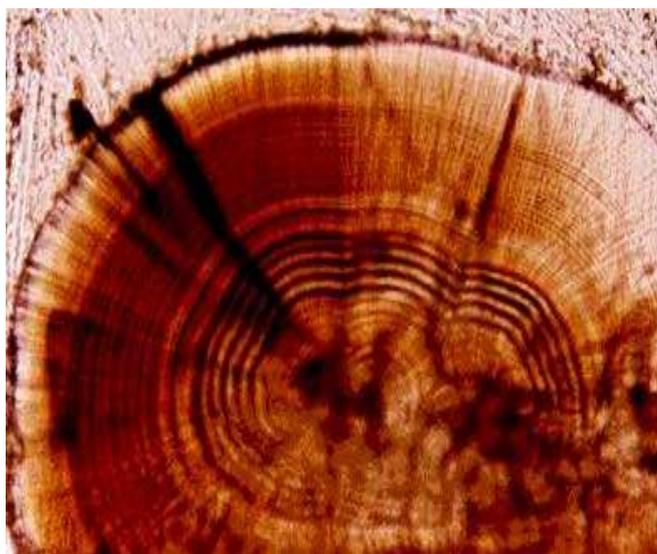


Figura 5 - Otolito marcado térmicamente con un patrón de cinco bandas oscuras (cerca del centro).

A.1.3.2. Externas

Ventajas: estas etiquetas se pueden ver sin disección de los peces. Además, muchas variables externas permiten el reconocimiento individual.

Desventajas: las principales son que puede causar una mayor mortalidad, atraer a los depredadores, interferir con la locomoción y hacer que el organismo sea más susceptible a enfermedades e infecciones.

A.1.3.2.1. Mutilación

El recorte punzonado de aletas u otras partes del cuerpo es un tipo de mutilación que se puede utilizar para identificar individuos más tarde. Ésta es una técnica simple, rápida y muy barata de usar. Aunque algunas marcas pueden tener carácter permanente, otras, como las aletas se pueden regenerar, sin embargo a menudo están distorsionadas y pueden ser identificados como marcadas (falso positivo). Un problema con la mutilación es la posibilidad de afectar negativamente el comportamiento del pez y su capacidad para sobrevivir.

A.1.3.2.2. Implante visible de elastómero (VIE)

Las etiquetas se inyectan en forma líquida que al curar se convierten en un sólido flexible y biocompatible. Se implantan debajo de tejido transparente y son visibles externamente.

A.1.3.2.3. Discos Petersen

Estas etiquetas se utilizaron durante los primeros 60 años de etiquetado. Aunque la construcción de la etiqueta ha variado entre diferentes tipos de materiales y actualmente es menos costosa, el diseño de la etiqueta se mantiene sin cambios. El disco se aplica bajo la aleta dorsal de los peces con un alfiler y unos alicates, también se ha utilizado en los moluscos por encolado a las conchas con pegamento epoxi. Este disco puede permanecer en el animal de por vida. La desventaja es que la aplicación de la etiqueta lleva mucho tiempo.

A.1.3.2.4. Etiquetas de brida

Las bridas son de peso ligero, de metal no corrosivo, vienen en diferentes tamaños y están numeradas por orden correlativo. Se adhieren fácilmente a los peces en diferentes lugares del cuerpo; opérculos, aletas y pedúnculo caudal. Estas etiquetas se utilizan en una variedad de especies, son las etiquetas permanentes en algunos peces. Los mejores resultados de retención son los peces óseos, con opérculos como el esturión (*Acipenser sturio*), el lenguado (*Solea solea*) y el fletán (*Hippoglossus hippoglossus*).

A.1.3.2.5. Etiquetas en espaguetis

Son un bucle de tubo de vinilo que pasa a través del pescado, la información se imprime directamente sobre el mismo tubo. La aplicación de la etiqueta se realiza a través del cuerpo del pez con una aguja hueca. Se mantiene bien y es barata, pero la aplicación consume mucho tiempo.

A.2. Otolitos.

Los otolitos constituyen una parte muy importante del oído interno de los peces óseos. Son estructuras calcáreas depositadas por el líquido endolinfático del laberinto, las cuales se encuentran alojadas en dos cavidades adyacentes del neurocráneo: las cápsulas óticas (Figura 6).

Se reconocen tres pares de otolitos: sagitta (saculus), lapillus (utriculus) y asteriscus (lagena). De estas tres estructuras, la sagitta es la más utilizada para la determinación de la edad. Una de las caras del otolito presenta una depresión que la atraviesa en el sentido de su eje mayor: el surco acústico (Figura 7); correspondiente a la zona del otolito que está en contacto con un gran número de células ciliadas que constituyen la porción sensorial (mácula).

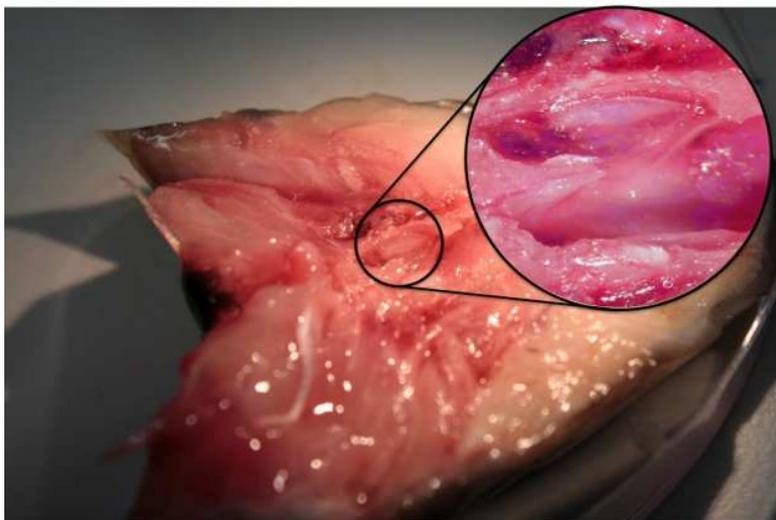


Figura 6 - Cápsula ótica ampliada en la cabeza de una trucha (*Salmo trutta*)

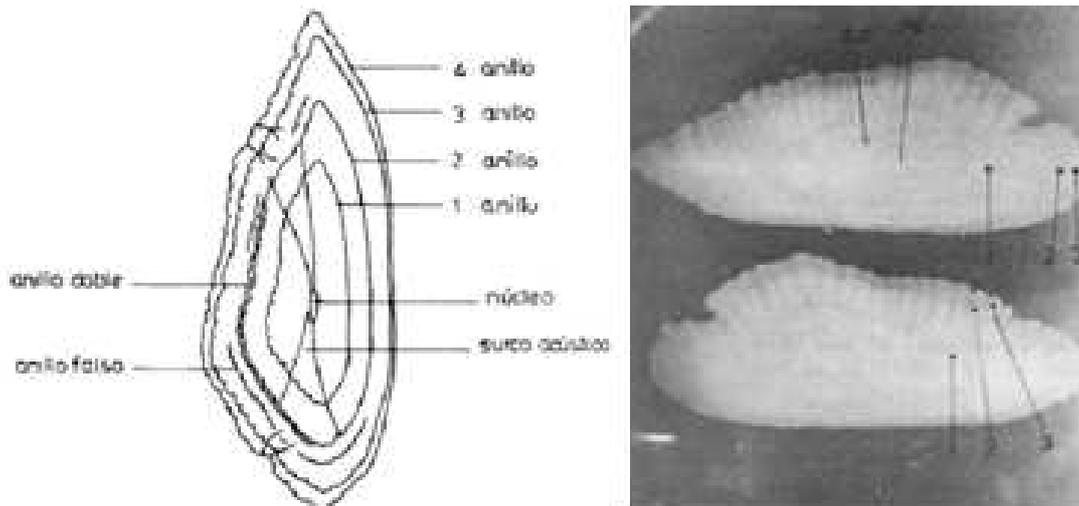


Figura 7 - A la izquierda, esquema del otolito de un ejemplar de *Merluccius merluccius hubbsi*, de 4 años de edad. A la derecha dos otolitos de merluza *Merluccius merluccius hubbsi* de 3 años de edad, en el que se marcan el núcleo N, la zona pelágica z.p. y el límite de los anillos de edad 1, 2 y 3 hialinos.²

Los otolitos aparecen prácticamente a la vez que se produce la fecundación del pez. En el bacalao *Gadus morhua* el saculus y el utriculus pueden verse al sexto día de producida la fertilización. (M'Intosh and Prince, 1890)³, la lagena aparece más tarde.

Inicialmente se forma un núcleo alrededor del cual se van depositando capas de sustancia calcárea.

Si se observa con luz directa un otolito de merluza como el de la figura 7, se pueden apreciar series de bandas concéntricas hialinas y opacas, siendo el primero el crecimiento en invierno y el segundo en verano, pero ambas pueden formarse en cualquier estación del año (Irie 1957)⁴, por lo que para evitar confusiones se emplea la nomenclatura de zona hialina y zona opaca, en lugar de las estacionales.

Las bandas hialinas están caracterizadas por capas delgadas, mientras que las opacas se caracterizan por capas gruesas. Las capas concéntricas están unidas entre sí por fibras sólidas en disposición radial entre las cuales se depositan cristales de aragonita (carbonato de calcio), los cuales confieren al otolito su naturaleza calcárea.

La sustancia que predomina en la zona opaca es una proteína denominada conquiolina (Dannevig, 1956)⁵.

El grado tan diferente de opacidad entre unas bandas y otras se debe a la cantidad de calcio y proteína que se deposita en las mismas, en relación a diferentes condiciones fisiológicas (vinculadas por lo general a aspectos ambientales). La zona hialina contiene gran cantidad de cristales de carbonato de calcio mientras que la zona opaca se encuentra poca cantidad.

Por ello, cuando la cantidad depositada es poca, los cristales de carbonato de calcio son pequeños y el espacio existente entre los mismos es llenado por proteínas, lo que aumenta la opacidad. De este modo, los otolitos aumentan su tamaño añadiendo zonas alternadas de diferente opacidad.

Si relacionamos las bandas de los otolitos con el crecimiento del pez, se observa que las zonas opacas están asociadas con periodos de crecimiento rápido (verano, otoño) y que las zonas hialinas corresponden a períodos de crecimiento lento (invierno, primavera). Por tanto, durante un año, es posible notar que se han agregado una zona hialina y una zona opaca a las ya existentes en el otolito. Si se establece que la formación de ambas zonas corresponde a un modelo de tiempo definido, es posible entonces determinar la edad de un pez.

A.3. Marcaje de peces con isótopos estables enriquecidos: del empleo de un único isótopo a la doble marca isotópica.

El trabajo de Thorrold et al⁶, se describe una técnica que permite aplicar una marca transgeneracional en los otolitos de embriones. En este trabajo la marca se realiza en las hembras de dos especies de peces (*Amphiprion melanopus* y *Centropristis striata*) inyectándoles ¹³⁷BaCl₂ en la cavidad abdominal.

Este estudio produjo una revolución en los tipos de marcaje, dado que consiguió obtener una marca que pasa de una madre marcada a toda la generación siguiente, consiguiendo, con un trabajo de campo relativamente pequeño, en el que se marcan unas cuantas madres, millones de ejemplares marcados con un 100% de efectividad. Además esta marca permanece en el núcleo del otolito de la descendencia durante toda su vida.

Un año más tarde, Almany et al⁷, publicaron un estudio realizado en una reserva marina, en la que, gracias al uso del mismo método descrito anteriormente, pudieron determinar la repoblación de la misma. Este equipo de investigación concluyó que el 60% de los nuevos ejemplares de los peces estudiados (*Amphiprion percula* y *Chaetodon vagabundus*) volvían a repoblar el arrecife en el que vivían sus progenitores. Otra de las conclusiones fue que el tamaño de las reservas marinas protegidas ha de ser en función de la dispersión de las larvas de los peces, y han de ser lo suficientemente grandes como para que las poblaciones del ecosistema puedan mantenerse por sí mismas.

En el año 2008 se publica otro estudio relacionado con el marcaje de otolitos mediante el empleo de isótopos estables. En este trabajo, Munro et al⁸, desarrollaron un método de marcaje por inmersión, empleando isótopos enriquecidos de bario en el que consiguen, variando el tiempo de inmersión desde 1 a 24 días, alterar la composición de los otolitos, enriqueciéndolos en los isótopos enriquecidos en ¹³⁷Ba. Las conclusiones de este estudio son varias. Por un lado la certeza de que los peces que no hayan sido expuestos a los isótopos enriquecidos van a

presentar un perfil isotópico con una abundancia natural. Por otro lado, este tipo de marca no genera tanto estrés como otro tipo de marcas, ya que la manipulación del pez es muy corta.

Además, el uso de isótopos enriquecidos para marcar requiere el uso de muy poca cantidad. Para realizar una marca con Sr elemental, se requiere una concentración de aproximadamente $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y esta técnica emplea $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{137}Ba y $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ^{86}Sr .

Ya en el 2009 se publicó un texto científico de Williamson et al, en el que se hace un estudio toxicológico mediante el cual se calculan la retención del isótopo estable, los posibles efectos fisiológicos y posibles problemas en la salud de los peces. Los resultados de esta investigación revelaron que empleando isótopos enriquecidos de Ba en pequeñas dosis ($2\sim 4 \text{ mg } ^{138}\text{Ba kg}^{-1}$ de masa corporal) no se revelan efectos adversos en la salud de los peces o de los humanos que consuman estos peces, por lo que no hay riesgo alguno a la hora de emplear este tipo de marcas en peces que tengan interés comercial. La cantidad de Ba residual encontrada en tejido muscular una semana después de la inyección fue de $0.29 \text{ mg Ba kg}^{-1}$, en un pez al que se le administraron 4 mg kg^{-1} de Ba. Con esta concentración una persona de 70kg , debería ingerir 170 kg de pescado en un solo día para alcanzar el nivel de $0.7 \text{ mg Ba kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, establecido como perjudicial.

En el año 2011 se publicó en trabajo de Huelga-Suárez et al⁹, en el que se emplea un doble spike que permite, además de marcar a todos los peces, ya que la metodología de inyección es similar a la empleada por Thorrold et al⁶, identificar a los individuos descendientes de un pez en concreto. En este estudio se etiquetaron varias truchas con tres relaciones diferentes de $^{137}\text{Ba}/^{135}\text{Ba}$ (3:1, 1:1 y 1:3). Esto permite identificar tanto a los peces que presentan una marca isotópica de los que no la llevan, como distinguir entre los tres tipos de marcas individualmente.

A.4. LA-ICPMS

Las siglas LA-ICPMS responden al acrónimo inglés *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, cuya traducción aproximada es "Ablación láser-Plasma de Acoplamiento Inductivo-Espectrometría de Masas". En este acrónimo se combinan la forma de atomización de la muestra (ablación láser), el tipo de excitación de los átomos generados (ICP) y el tipo de detección (espectrometría de masas) empleados.

En esta técnica se combinan dos fuentes diferentes para la atomización y la excitación/ionización de la muestra.

Por un lado la superficie de la muestra sólida se volatiliza debido a la incidencia de un haz laser de elevada energía.

Por otro lado la muestra volatilizada es arrastrada en forma de aerosol por un gas portador hacia el equipo de ICP, donde se produce la excitación y la ionización para el análisis de la misma por MS.

A.4.1. Ablación láser

La ablación láser se puede definir como el arrancado de material inducido por un láser en vacío o en un medio inerte, mediante el cual al absorberse la energía generada por el haz se forma un penacho de vapor de productos arrancados.

La cantidad de material arrancado en cada pulso del láser depende de la energía del láser, de su longitud de onda y del tamaño de los pulsos. Dicha dependencia no es lineal, por lo que si con un pulso de 2 mJ conseguimos arrancar 3 ng de muestra, no se puede afirmar que con 4 mJ arranquemos 6ng.

Asimismo la composición del material arrancado depende del tipo de muestra y de la composición de la misma. En esta etapa se produce un fenómeno denominado efecto de fraccionamiento elemental, que consiste básicamente en que la composición de la muestra no es la misma que la del material arrancado. Este efecto es de gran importancia a la hora de optimizar el láser, para evitar que se produzca, y conseguir un arrancado lo más representativo posible. Para corregir este fenómeno se pueden emplear dos métodos; por un lado emplear materiales de referencia certificados que sean similares a las matrices de los analitos, y por otro lado el empleo de láseres pulsados con longitudes de onda más cortas y de pulsos más cortos.

Para conseguir un buen análisis es necesario que no se produzca evaporación preferente de los constituyentes de la muestra, es decir, que no se genere fraccionamiento elemental. Además solo las partículas con un tamaño apropiado deben generarse en el proceso de ablación, las cuales pueden ser transportadas desde la celda de ablación al ICP. Asimismo las partículas que lleguen al ICP han de ser lo suficientemente pequeñas para que se ionicen correctamente en el plasma.

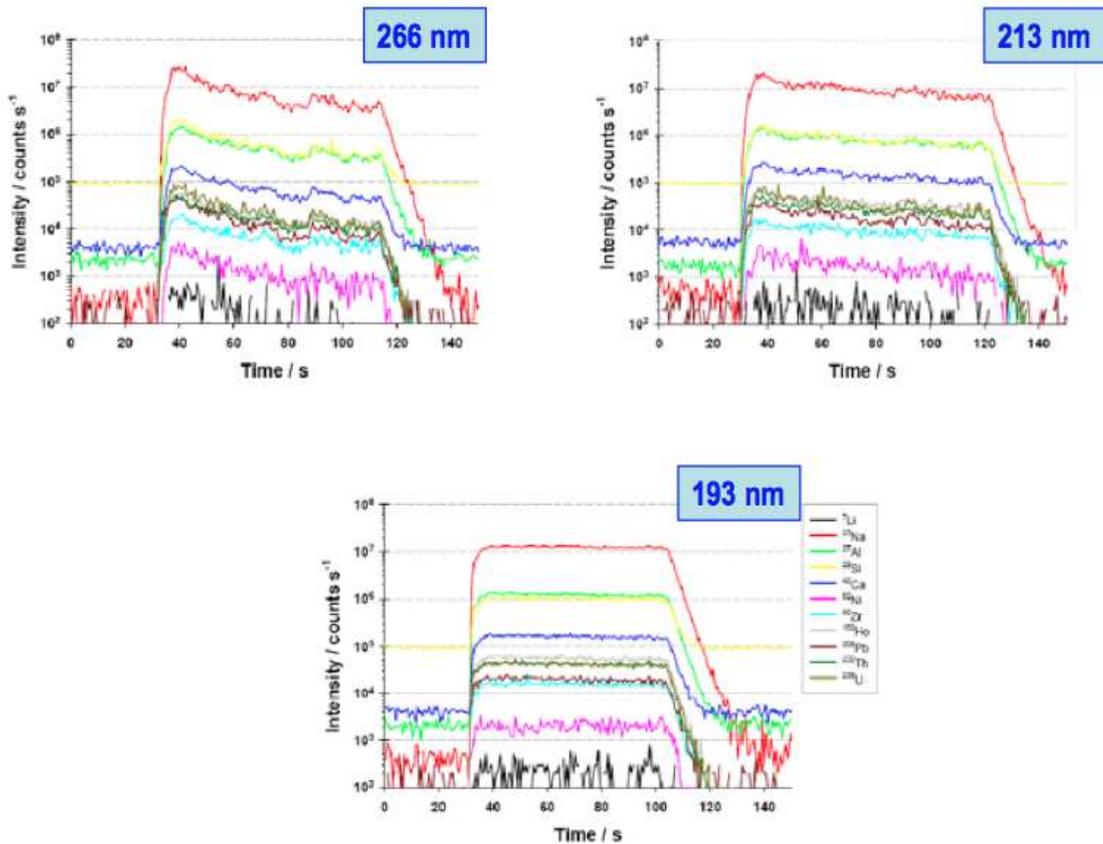


Figura 8 - Estudio de la estabilidad de la señal (266, 213, 193 nm). Muestra: NIST 612. Condiciones experimentales: 60 μm de diámetro del láser, 4Hz de frecuencia de pulsos, $4\text{J}/\text{cm}^2$ y 5ns de longitud del pulso. Carrier de Helio.^{10, 11}

El LA-ICPMS presenta varias ventajas:

- Es una técnica prácticamente no destructiva.
- Permite analizar una amplia variedad de muestras (minerales, gemas, conchas, huesos...)
- No se requiere prácticamente pretratamiento de las muestras.
- Capacidad de analizar tanto en gran escala como en micro escala.
- Análisis multielemental simultáneo
- Análisis de elementos traza y de relaciones isotópicas.

Las limitaciones del método se pueden resumir de la siguiente manera:

- Efectos no estequiométricos. El arrancado de material no es uniforme.
- Técnica de micro-muestreo. Depende del tamaño del haz laser.
- Efectos de matriz.
- Carencia de materiales de referencia certificados.

El rendimiento de los análisis mediante el uso de esta técnica viene dado tanto por la cantidad y la estequiometría del aerosol generado por el láser, el grado de vaporización, atomización e ionización producidas en el ICP y la transmisión de los iones a través de la interfase de vacío, así como de las lentes empleadas en el analizador de masas. Debido a esto, son varias las fuentes de error a tener en cuenta a la hora de realizar un análisis por LA-ICPMS, por lo que conseguir una buena optimización de los equipos es un proceso que lleva bastante tiempo, aunque una vez conseguida esta, la reproducibilidad del método es buena.

En la Tabla 1 se detallan los parámetros a tener en cuenta para un análisis óptimo por LA-ICPMS.

Tabla 1 - Parámetros a tener en cuenta en la optimización de un análisis LA-ICPMS

Parámetro	Influencia en:
Longitud de onda del láser	Calor disipado en la muestra; formación de partículas
Energía del láser	Cantidad de material arrancado; profundidad del cráter y formación de partículas
Frecuencia del láser	Densidad de partículas en y alrededor del punto de ablación
Ancho del pulso del láser	Calor disipado en la muestra; formación de partículas
Volumen de la celda	Expansión de la pluma; aglomeración de partículas (perfil en profundidad)
Longitud y diámetro del tubo	Separación de las partículas; pérdida de material
Viscosidad del carrier	Transferencia de energía hacia la superficie de la muestra; formación de la pluma; densidad de las partículas
Flujo del carrier	Eficacia de transporte; duración de las partículas en la zona analítica
Potencia del ICP	Eficiencia de excitación e ionización
Flujo de gas plasmógeno	Entrada de aire al ICP y formación de interferencias poliatómicas

Para realizar análisis cuantitativos es necesario realizar algún tipo de calibración de forma que se obtenga una relación entre la concentración de la muestra y la señal analítica. Los tipos de calibración más frecuentes empleados en esta técnica son:

Calibración externa con un patrón sólido

Requiere el empleo de materiales de referencia cuya matriz sea similar a la de la muestra problema para compensar diferencias en la ablación producida.

Calibración externa con un patrón sólido combinada con una estandarización interna

Esta calibración consigue corregir las diferencias entre la ablación generada entre las muestras y el material de referencia, así como los efectos de matriz y la deriva en la señal analítica. Gracias a esta combinación se elimina la necesidad de emplear matrices similares.

El material de referencia interno ha de tener características de ablación similares a los analitos, generalmente un constituyente mayoritario cuya concentración se pueda obtener por una técnica alternativa.

Espectrometría de masas con dilución isotópica combinada con LA-ICPMS

Esta técnica es un muy buen estándar interno, además de ser un método primario de elevada eficacia.

A.4.2. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS)

Desde que se introdujo, en 1983, el primer sistema comercial en el mercado, la Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) ha ido ganado importancia como técnica de detección elemental. Esto se debe fundamentalmente a las siguientes características:

- Bajos límites de detección (ng g^{-1}).
- Obtención de espectros de masas relativamente sencillos.
- Desarrollo de sistemas alternativos de introducción de muestras, además de la posibilidad de acoplamiento con otras técnicas, como por ejemplo HPLC.
- Elevada capacidad de procesamiento de muestras.
- Capacidad multielemental. Se pueden detectar y determinar prácticamente todos los elementos en un rango de masas entre 6 (Li) y 238 (U).
- Amplio rango lineal (más de seis órdenes de magnitud).

Todas estas ventajas hacen del ICP-MS una de las técnicas más importantes actualmente para determinaciones de elementos traza y ultratrazas. Además este sistema nos permite obtener información sobre composición isotópica de los elementos estudiados.

Sin embargo, sorprende que dadas las ventajas de este sistema, 18 años después de la instalación del primer equipo, solamente se hayan instalado 4000 equipos ICP-MS en todo el mundo. Si comparamos esta cifra con la de cualquier otra técnica multielemental, como por ejemplo el ICP-OES, la diferencia es significativa. En el mismo periodo de tiempo (desde 1974 hasta 1992) se habían instalado 9000 equipos OES. Esta diferencia es más significativa si cabe si destacamos que desde 1983 se han instalado 17000 equipos ICP-OES, cuatro veces más que de equipos ICP-MS. Estas cifras son más sorprendentes aún cuando sabemos que el ICP-MS ofrece mucho más que otras técnicas, incluyendo capacidades multielementales similares a las del ICP-OES y los límites de detección del GFAA. (Absorción atómica en horno de grafito).¹²

Trayectoria de los iones a través de un ICP-MS

El plasma, considerado como el cuarto estado de la materia, consiste en un gas altamente ionizado (>1%) y conductor de la electricidad. Greenfield et al¹³, publicaron, en 1964, que un ICP a presión atmosférica podía ser empleado como fuente de excitación para el análisis elemental en Espectrometría de Emisión Atómica (AES). Este sistema, a pesar de su construcción rudimentaria comparada con la actual, consiguió demostrar las enormes posibilidades de un ICP como fuente de excitación y abrió la puerta para su utilización como generador de iones a comienzos de la década de los 80.

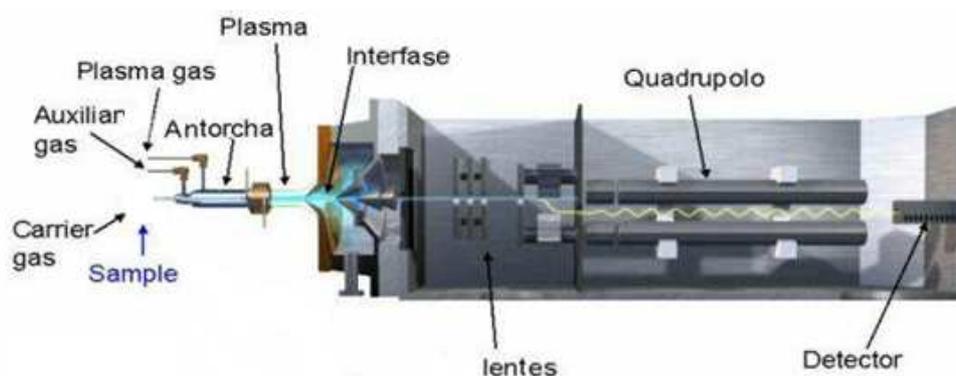


Figura 9 - Diagrama esquemático de un ICP-MS

A pesar de que el gas argón es el más adecuado para la formación del plasma en estos equipos, existen publicaciones en las que se usan otros gases como por ejemplo el helio

(He).^{14, 15} Sin embargo el empleo de este último presenta grandes desventajas frente al Ar, como son el mayor coste y la menor estabilidad del plasma generado.

El sistema de introducción de la muestra está considerado como el componente más débil de este instrumento ya que su eficacia es muy baja (1-2%). Por este motivo se le ha denominado el "Talón de Aquiles" de la técnica.¹² Una vez en el plasma, el aerosol que contiene la muestra, sufre una serie de cambios físicos (desolvatación, vaporización, atomización e ionización) para convertirse finalmente en un ion cargado positivamente. En el ICP los elementos se ionizarán en mayor o menor grado en función de varios parámetros, como son la densidad electrónica del plasma, la temperatura de éste y los diferentes potenciales de cada elemento. Como el primer potencial de ionización varía para cada elemento, en las mismas condiciones de densidad electrónica y temperatura del plasma, no todos los elementos se ionizarán en un mismo porcentaje. De este modo, elementos con un potencial de ionización inferior a 9 eV alcanzarán más de un 80% de ionización en el plasma, mientras que elementos como el P, As, Hg y Au, con potenciales de ionización más elevados se ionizarán en mucho menor grado y su sensibilidad analítica será inferior.

Una vez formados los iones son transportados hacia la interfase. Esta interfase es el nexo de unión entre el plasma (a presión atmosférica) y el analizador (a alto vacío). Dicha interfase transporta los iones desde el plasma hasta el analizador de masas eficientemente, de forma que se mantiene la integridad eléctrica de los mismos. La interfase está formada por dos conos. El primero de ellos, llamado cono de muestreo o *sampler* posee un orificio de 1.0 mm de diámetro, mientras que el segundo, denominado cono separador o *skimmer* tiene un orificio de diámetro 0.75mm. Estos conos están fabricados generalmente de Ni o Pt y, para reducir los efectos que las altas temperaturas puedan tener en ellos, la cubierta de la interfase está refrigerada.

Al atravesar ambos conos, la velocidad lineal de todos los iones es prácticamente la misma (su variación es muy pequeña), siendo la energía cinética de cada ión función exclusiva de su relación masa/carga (m/z). Además, la trayectoria libre media, esto es, la distancia que recorren los iones sin sufrir ninguna colisión con otros iones o electrones, es lo suficientemente grande como para que puedan ser extraídos y enfocados mediante un sistema de lentes de focalización colocadas inmediatamente después del *skimmer*. El enfoque de los iones se lleva a cabo mediante un sistema de lentes electrostáticas, cuya función es la de colimar y focalizar el haz de iones, separar las especies neutras y disminuir el intervalo de energías de los iones.

A continuación, los analizadores de masas separan los iones extraídos del plasma de acuerdo con su relación m/z . Para conseguir esto, los dispositivos de análisis requieren que la trayectoria de los iones esté libre de colisiones y esto se consigue mediante presiones lo suficientemente bajas (10^{-3} mbar), que son obtenidas gracias al empleo de bombas turbomoleculares. A la salida del analizador de masas los iones chocan finalmente con la superficie del detector, produciéndose unos 10^8 electrones por cada ión incidente.

B. Objetivos

B.1. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de una metodología para el marcaje y posterior análisis por LA-ICP-MS de otolitos de peces marcados isotópicamente empleando un doble spike de bario. Esto permitirá obtener tanto información de rutas migratorias, en el caso de peces oceanódromos y potamódromos (que viven enteramente en agua salada y dulce respectivamente), como de peces diádromos, que se mueven entre el agua de mar y la dulce. La optimización de la metodología empleada requiere centrarse en los siguientes puntos:

1. Desarrollo de una metodología para la extracción de los otolitos en las truchas del estudio.
2. Desarrollo de un pretratamiento de la muestra, el cual incluye la inmovilización, el desbaste y el pulido del otolito para exponer el núcleo del mismo, el cual lleva la marca isotópica.
3. Optimización de los parámetros del Láser, para conseguir unas condiciones de medida óptimas.
4. Optimización de los parámetros del ICP-MS.

Mediante este procedimiento, y empleando un análisis por LA-ICP-MS, se podrán determinar las concentraciones de bario presentes en el otolito, de forma que pueda revelarse si la marca inyectada a las madres permanece en la siguiente generación y si se puede distinguir entre los tres tipos de marca existentes. Esto permitirá marcar los peces empleados en repoblaciones para estudiar su eficacia a corto y largo plazo, determinando si dichas repoblaciones son realmente efectivas o, por el contrario, habría que desarrollar otro método más eficaz.

C. Experimental

C.1. Instrumentación

C.1.1. ICP-MS de doble enfoque.

El equipo ICP-MS empleado para este estudio fue un Thermo Finnigan Element2 (Thermo Electron, Bremen, Alemania) (Figura 10). El analizador de masas de doble enfoque está formado por un sector magnético y un sector electrostático en configuración Nier-Johnson inversa. El detector utilizado por este equipo es un multiplicador de electrones secundario (SEM). Todas las medidas de las relaciones isotópicas se llevaron a cabo con una configuración de baja resolución ($m/\Delta m = 300$) usando el modo de barrido electrostático (E-Scan), de forma que el voltaje de aceleración varía, manteniendo el campo magnético constante. Para obtener una precisión y exactitud óptimas, los parámetros de operación fueron ajustados a los valores de la tabla 4, en el apartado de procedimientos experimentales.

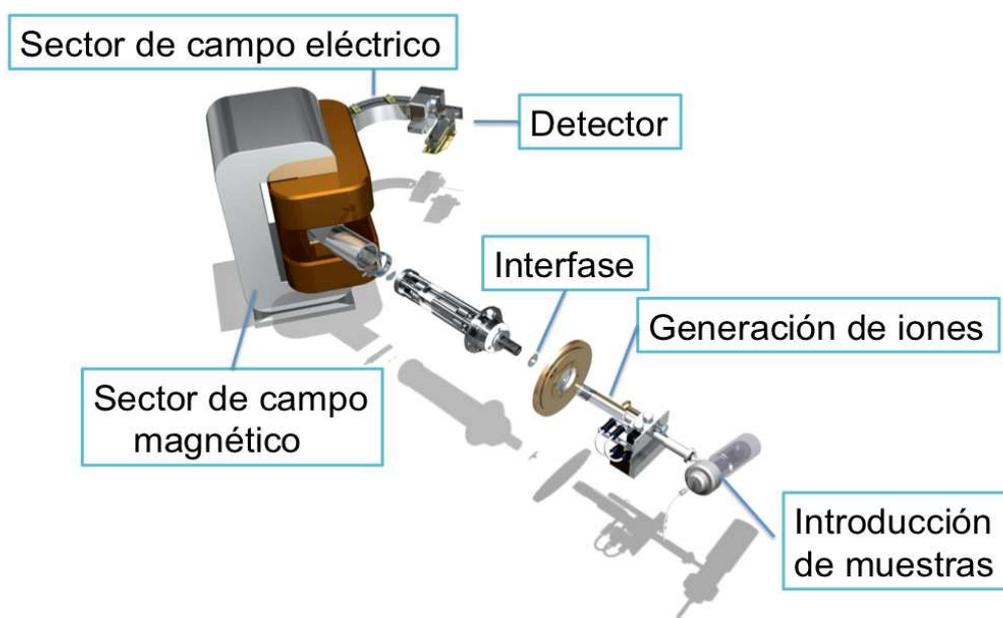


Figura 10 - Esquema de un equipo SF-ICP-MS

C.1.2. Sistema de Ablación Láser

El equipo empleado para realizar la ablación láser fue un Cetac Technologies – LSX-213 Laser Ablation System (CETAC Technologies, Omaha, NE, EEUU) (Figura 11). El aerosol generado en el láser fue transportado hacia la antorcha del ICP a través de un tubo de elevada pureza (*Teflon lined Tygon tubing*). Dada la naturaleza del acoplamiento de los equipos, y que este se realiza específicamente para este tipo de análisis, fue necesario optimizar diariamente ambos equipos, empleando un material de referencia certificado “Patrón de vidrio NIST 612” (National Institute for Standards and Technology NIST. Gaithersburg, MD, EEUU). La relación de las señales $^{238}\text{U}/^{232}\text{Th}$, que debería ser próxima a 1, fue comprobada para asegurar un bajo efecto de fraccionamiento. Además, la relación $^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}$ fue monitorizada para controlar la formación de óxido, siendo esta siempre inferior al 0.4% en las condiciones seleccionadas.



Figura 11 - Equipo de ablación láser acoplado al SF-ICP-MS.

C.1.3. Otra instrumentación.

Para la extracción de los otolitos se empleó un microscopio estereoscópico Olympus SZX9 (Olympus, Barcelona, España).

Para el pulido de las muestras se emplearon varios equipos de la casa Buehler (Illinois, EEUU).

C.2. Materiales y reactivos

Para el lavado de los otolitos después de la extracción se empleó agua ultrapura con una resistividad de 18,2 M Ω cm⁻¹ obtenida a través de un sistema de purificación de agua milli-Q modelo Gradient A10 (Millipore, Molsheim, Francia).

Los isótopos enriquecidos empleados en este trabajo ¹³⁵Ba (94,85%) y ¹³⁷Ba (82,23%) fueron suministrados por Isoflex (San Francisco, CA, USA). Las abundancias isotópicas de los dos perfiles isotópicos usados para marcar las truchas se determinaron empleando un equipo multicolector ICP-MS usando una disolución de abundancia natural de bario (Merck, Darmstadt, Alemania) para la corrección de masa. Las composiciones están en la Tabla 2:¹⁶

Tabla 2 - Composiciones isotópicas de las marcas A, B y C.

parámetro	mezcla A	Mezcla B	Mezcla C
N_{Ba137}/N_{Ba135}	2.9645±0.0087	0.9905±0.0022	0.3317±0.0013
138Ba/137Ba	0.2303±0.0006	0.2478±0.0010	0.2983±0.0007
138Ba/135Ba	0.5972±0.0024	0.2164±0.0011	0.0887±0.0003

Los reactivos *Pro analysis* HNO₃ 65% (v/v), *Pro analysis* HCl 37% (v/v) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Todo el material empleado a lo largo de este estudio ha sido concienzudamente limpiado antes de su uso siguiendo un procedimiento de limpieza en tres pasos, consistente en tres inmersiones (24h cada una) en baños de *subboiled* HCl 10% (v/v), *subboiled* HNO₃ 10% (v/v), y agua Milli-Q.

El embebido de los otolitos se llevó a cabo con una resina de poliéster (Crystic R115PA) adquirida a Resinas Castro (Porriño, España). Para el desbaste de los otolitos se empleó un disco de diamante MD-Piano 1200 (Struers, Ballerup, Alemania) cuyo tamaño de grano es de 15 μ m. Para el pulido final se emplearon discos de 45, 15 y 1 μ m, adquiridos a la misma compañía.

C.3. Muestras

Todas las truchas analizadas provienen de la Sociedad de Pescadores “El Esmerillón”, de la localidad de Arriondas, en cuyas instalaciones han estado manteniendo a los ejemplares de este estudio desde el desove, en el año 2009, hasta hoy.

De todos los especímenes de este estudio se seleccionaron 25 a los que se les extrajeron los otolitos, para el posterior análisis de las mismas para determinar relaciones isotópicas de Ba y estudiar el tipo de marca en las muestras. Para ello se eligieron ejemplares de varios muestreos, de primera generación, desde los 6 meses desde el desove, hasta los 25 meses.

Los otolitos extraídos se inmovilizaron en una resina epoxi, se desbastaron y se pulieron para exponer el núcleo del otolito y a la vez crear una superficie plana sobre la que incida el laser de ablación. Las madres fueron nombradas TB y la siguiente letra corresponde al tipo de marca que se les administró. La A corresponde a 3:1, la B, 1:1, y la C 1:3, todas ellas relaciones molares de $^{137}\text{Ba}/^{135}\text{Ba}$. Las truchas descendientes se nombraron BC ya que se mezclaron las descendientes con la marca B y las descendientes con la marca C en el desove. La trucha A murió antes de desovar por problemas en la piscifactoría, por lo que no existen descendientes con esta marca.

Tabla 3 - Individuos analizados.

Edad	Referencia	Nº Otolitos
Madres	TBA1	2
	TBB4	2
	TBC4	2
Descendientes 6 meses	BC01	-
	BC02	1
	BC03	2
	BC04	1
	BC05	2
Descendientes 9 meses	BC13	1
	BC25	2
	BC32	1
	BC34	1
Descendientes 14 meses	BC36	2
	BC39	2
	BC41	1
	BC49	2
	BC50	1
Descendientes 25 meses	BC3	1
	BC4	1
	BC5	2
	BC6	2
	BC9	2

Calendario de muestreo

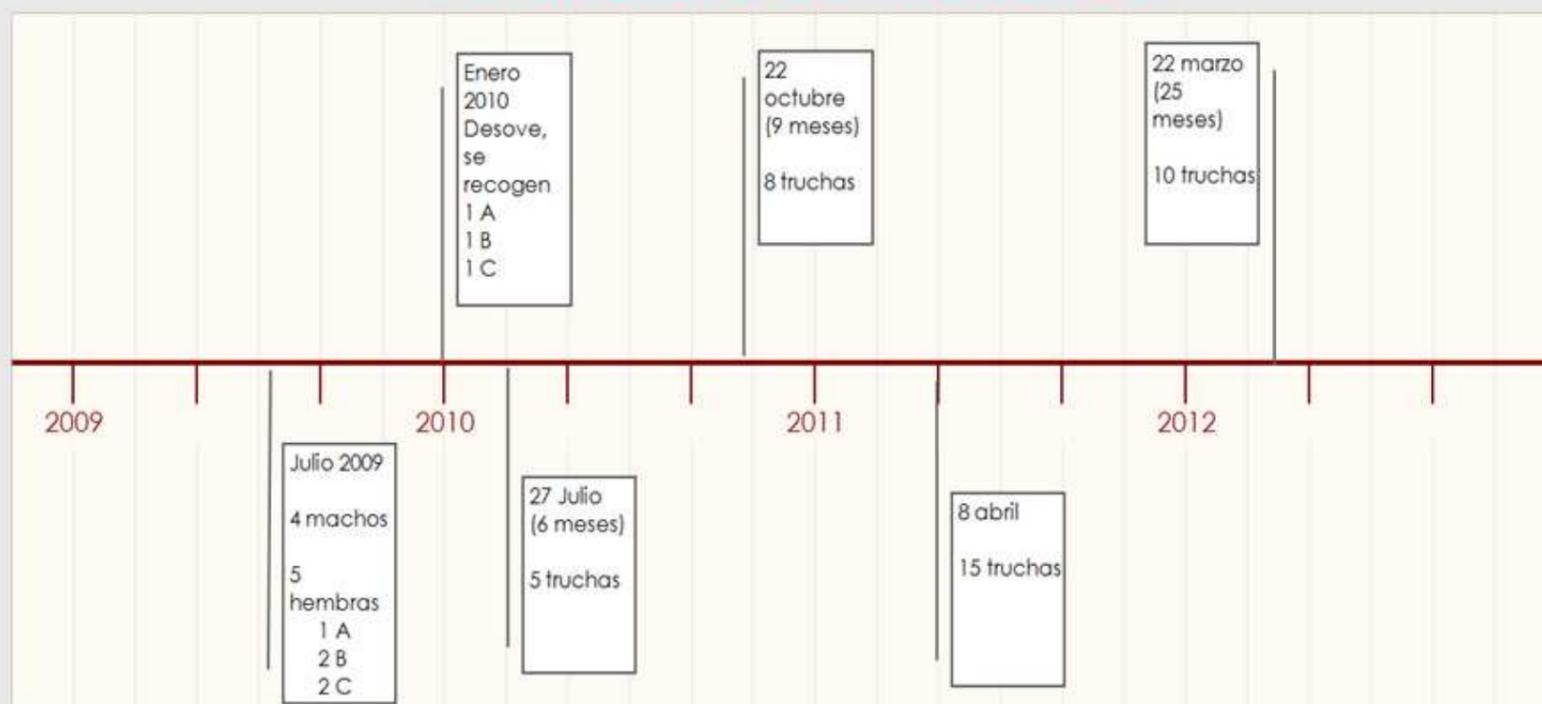


Figura 12 - Calendario de muestreo.

C.4. Procedimientos experimentales

C.4.1. Inyección

Doce truchas (*Salmo trutta*) fueron criadas en la sociedad de pescadores “El Esmerillón” (Asturias, España) fueron usadas en este estudio. Las truchas fueron marcadas mediante inyección aproximadamente 7 meses y 7 días antes del desove para comparar la eficiencia del marcaje a largo y corto plazo, respectivamente. Para estas inyecciones se emplearon las marcas elaboradas anteriormente y descritas como A, B y C. Para este proceso primeramente se anestesiaron las truchas en una cubeta que contenía una mezcla de etilenglicol y monofenil éter diluido en agua. Posteriormente fueron pesadas para determinar el volumen de inyección de cada pez, de forma que la dosis inyectada fuera de 0.3 mg Ba/kg de masa corporal. Esta solución de bario fue inyectada empleando jeringuillas de insulina. Cada pez fue reanimado posteriormente en su tanque inicial, donde se les mantuvo hasta el desove. Nueve truchas (tres A, tres B y tres C) fueron marcadas en julio de 2009 (estudio a largo plazo). En el desove se determinó que de estas truchas, solamente una A, dos B y dos C eran hembras, ya que, durante la fase de marcado no fue posible distinguir el género de las mismas. Para el estudio a corto plazo se marcaron tres hembras, una de cada tipo de marca, en enero de 2010, una semana antes del desove. Durante el desove (llevado a cabo varios días entre el 22 de diciembre de 2009 y el 26 de enero de 2010), los huevos de cada hembra fueron recogidos de forma separada.

C.4.2. Extracción de los otolitos

Los otolitos se extrajeron de los peces realizándoles primero un corte a la altura de la aleta pélvica. Posteriormente se realizaron, según el tamaño dos procedimientos.

Para los peces mayores (madres, 14 y 25 meses) se realizó un corte paralelo a la línea de los ojos, por encima de los mismos, de forma que queda expuesta la cavidad craneal, como se ve en la Figura 13c), en la que podemos ver un otolito. Éstos se extraen con la ayuda de unas pinzas y se limpian con agua MilliQ, en una placa de Petri, para retirarles toda la materia orgánica adherida a los mismos. Posteriormente se dejan secar en un papel de filtro y se almacenan en viales de microcentrífuga de 1.5mL.

Para los peces pequeños se hace un corte perpendicular a la línea de los ojos, separando el cráneo en dos mitades, y se van desmenuzando con ayuda de las pinzas hasta que encontramos los otolitos. Normalmente salen embebidos en la masa encefálica, por lo que primeramente se separa esta masa en una placa Petri y se buscan los otolitos con la ayuda de

unas pinzas o de agujas hipodérmicas. Una vez encontrados se realiza el mismo proceso de limpieza y se almacenan en viales de microcentrífuga de 1.5 mL.

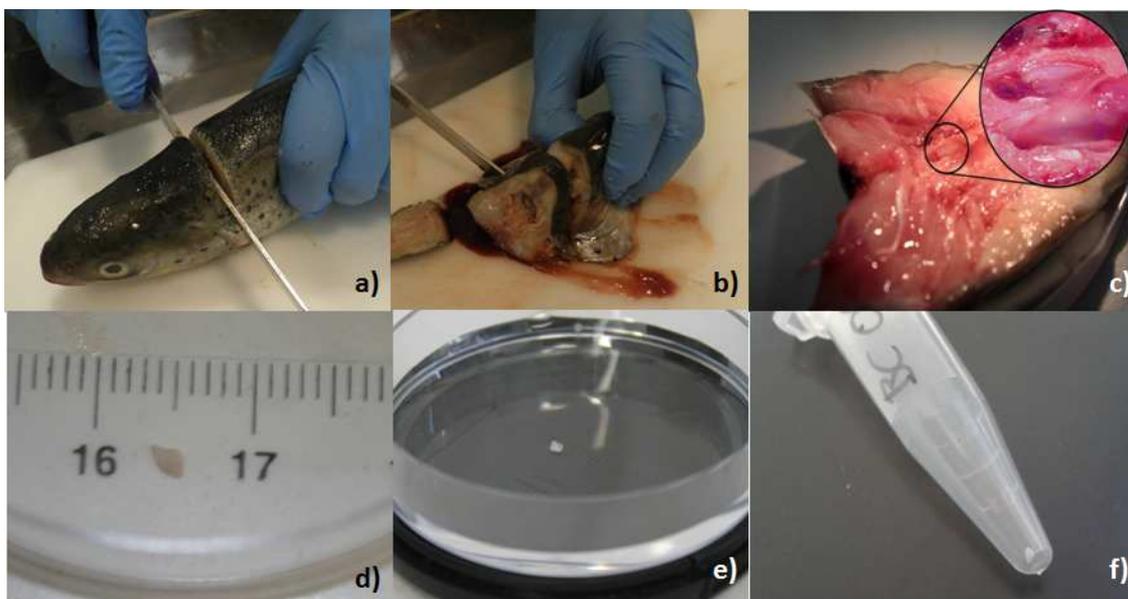


Figura 13 - Procedimiento para la extracción de los otolitos. a) Corte de la cabeza. b) Corte para lelo a la línea de los ojos. c) otolito expuesto. d) otolito antes de lavar. e) Lavado del otolito. f) almacenamiento en un vial previamente etiquetado.

C.4.3. Inmovilización de los otolitos.

Para la inmovilización en resina se pone una gota de resina en el molde, sobre la que se deposita el otolito extraído. Después se añade resina hasta cubrir aproximadamente medio centímetro del molde para evitar que quede una burbuja debajo del otolito, la cual daría problemas posteriormente en las medidas.

Luego se añade más resina, hasta alcanzar una altura de 1cm aproximadamente y se introduce la resina en un horno a 90°C para su solidificación total.

C.4.4. Desbaste y pulido de las muestras

El desbaste y pulido de las muestras se hace de forma totalmente manual, con la ayuda de pulidoras de diamante. Primeramente se realiza un desbaste inicial para exponer la parte interna del otolito y posteriormente se realizan varias etapas de pulido hasta que queda una superficie perfectamente lisa y brillante. Figura 14.

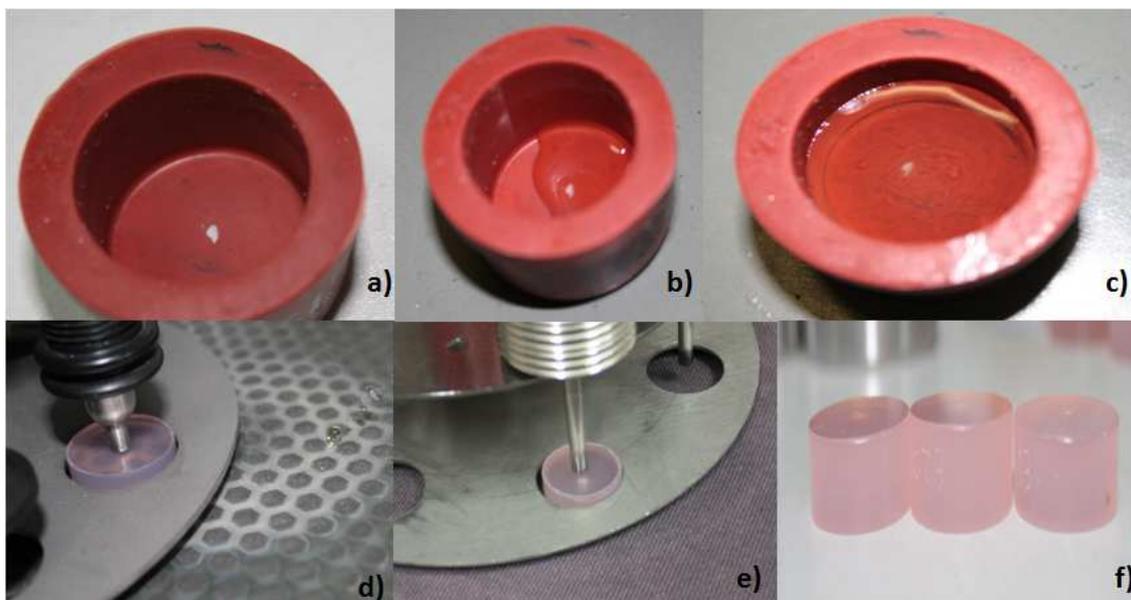


Figura 14 - a) colocación del otolito en el molde, b) adición de una pequeña cantidad de resina para evitar la formación de la burbuja debajo del otolito, c) llenado del molde, d) desbaste inicial de la muestra, e) pulido de la muestra, f) tres muestras en tres etapas diferentes del pulido, de izquierda a derecha de más a menos pulida.

C.4.5. Análisis por LA-ICP-MS

Las medidas de relaciones isotópicas de Bario, así como de Xenón, se realizaron acoplando un equipo de ablación láser a un ICP-MS de doble enfoque. Los parámetros experimentales se muestran a continuación:

Tabla 4 - Parámetros experimentales del ICP-MS Element2

Parámetros del ICP-MS	
Cooling gas	16 L min ⁻¹
Auxiliar Gas	0.87 L min ⁻¹
Sample Gas	0.98 L min ⁻¹ (nebulization)
	0.5 L min ⁻¹ (Ablation)
RF power	1275W

Tabla 5- Parámetros de adquisición del ICP

Parámetros de adquisición del Element2 SF-ICP-MS	
Settling time	0.001s
Mass window	5%
Sample time	0.001s
Points per peak	200
Runs	1
Passes	Adjusted for each sample according to the ablation time.

Tabla 6 - Parámetros del láser

Parámetros del laser	
Spot size (microns)	50
Laser Energy	100% - 5mJ
Laser repetition rate (Hz)	20
Shutter Delay	30
Scan rate (microns/s)	5.00
Ablation mode	Single line scan

C.5. Resultados y discusión

En la figura 15 se muestra un esquema de los procedimientos empleados para el correcto tratamiento de la muestra.



Figura 15 - Esquema del tratamiento de muestra

C.5.1. Extracción de los otolitos

Los otolitos de las truchas varían enormemente de tamaño según la edad del pez, pasando de 1-2mm en peces de 6 meses, hasta los 8-9mm en los de 25 meses. Debido a esto, cuanto más pequeño es el ejemplar, más difícil resulta la extracción. Para la extracción de los mismos contamos con la ayuda de Isabel Márquez, del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Alimentario (SERIDA). En los laboratorios del SERIDA, se realizaron las extracciones. Primero se seccionaron las cabezas de los peces en la sala de necropsias del centro. Posteriormente, con la ayuda de material quirúrgico, se realizaron las incisiones en la cabeza, exponiendo la masa encefálica. A veces se requirió más de un corte para llegar a la zona deseada y, otra vez, dada la imprecisión del método, se seccionaron los otolitos al realizar esta incisión, dejándolos inservibles para el estudio. Después, mediante el uso de un microscopio estereoscópico y

pinzas quirúrgicas se realizaron las extracciones de los otolitos, empleando el microscopio tanto para ayudar a extraer los otolitos como para confirmar que se habían extraído correctamente. El tiempo de extracción de los otolitos varía mucho de un espécimen a otro, pudiendo extraerse en pocos segundos, sin el empleo del microscopio, o llegando a tardar más de 10 minutos, ya que estas formaciones calcáreas, al estar rodeadas de masa encefálica, adoptan el color de la misma, siendo muy difícil su identificación tanto a simple vista como con el uso del microscopio. Por este motivo, en algunos casos se llegó a tener que desmenuzar la cabeza entera del ejemplar sobre placas de Petri e ir analizándola milímetro a milímetro, en busca del otolito. Empleando esta técnica se consiguieron extraer satisfactoriamente los dos otolitos sagitales de varios ejemplares de 6 meses, los cuales eran un reto bastante difícil dado su reducido tamaño, que era inferior a los 8cm.

C.5.2. Lavado de los otolitos

El lavado se realizó a continuación de la extracción. Para ello se emplearon placas de Petri con agua Milli-Q, en las que se sumergía el otolito y, con la ayuda de agujas hipodérmicas y pinzas, se conseguía retirar toda la materia orgánica que rodeaba las muestras.

Posteriormente se dejaban secar en papel de filtro durante aproximadamente 5 minutos, dándoles la vuelta aproximadamente a los dos minutos, para que el secado fuese por ambas caras. Luego se almacenaron en viales de microcentrífuga de 1.5mL debidamente etiquetados.

C.5.3. Inmovilización y pulido de la muestra

Una vez etiquetadas y almacenadas las muestras se enviaron al Laboratorio de Preparación de Muestras Geológicas, de la Facultad de Geología de la Universidad de Oviedo. En este laboratorio se realizó, mediante el uso de una resina epoxi bicomponente, la inmovilización de la muestra, de la forma descrita anteriormente. Posteriormente se realizaron varias etapas de desbaste, con discos de diamante, para conseguir exponer la cara interna del núcleo. El tiempo empleado en estas operaciones es diferente para cada muestra y, vistos los resultados en las medidas, no es un método reproducible ni fiable, ya que muchas veces el pulido era insuficiente y había que repetirlo, o el pulido era tan grande que el núcleo del otolito desaparecía por completo, no encontrando ningún tipo de marca en los mismos, y perdiéndose la muestra.

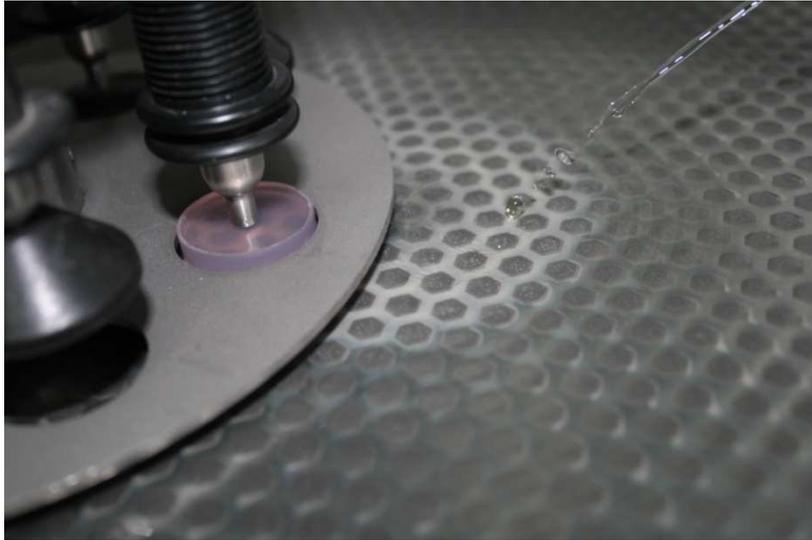


Figura 16 - Detalle del disco de diamante empleado para desbastar las muestras

En un estudio consultado⁸, la exposición del núcleo se realiza empleando una sierra de precisión de baja velocidad, con la que se puede exponer el núcleo del otolito perfectamente y sin correr el riesgo de perder la muestra.

C.5.4. Medida de las relaciones isotópicas de bario.

Una vez realizada la preparación de muestra, medimos las relaciones isotópicas de las muestras. Como el elemento a medir es bario, muy común en otros tipos de muestras, y la señal que obtenemos es muy baja debido a que el arrancado es muy poco eficiente, tuvimos que emplear en el equipo ICP-MS unos conos limpios cada vez que medíamos, ya que muchas veces la señal de fondo del equipo era tan alta (3 millones de cuentas) que no podíamos medir.

Las masas monitorizadas en las medidas fueron 130, 132, 134, 135, 136, 137, 138, correspondientes al bario, y al xenón, un interferente.

C.5.4.1. Deconvolución de perfiles isotópicos.

Para la aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos es necesario trabajar con un elemento cuyas abundancias naturales sean conocidas con sus correspondientes incertidumbres, o mejor aún, un standard certificado isotópicamente, el cual va a ser mezclado con el mismo elemento con uno de sus isótopos enriquecido. Así, en la muestra con spike o en

la mezcla que hemos preparado tenemos dos perfiles isotópicos diferentes. La cantidad (mol) de elemento en una mezcla, b , puede ser distribuida en sus dos fuentes mediante la ecuación:

$$N_b = N_{nat} + N_{enr} \quad (1)$$

En esta ecuación (1), N_b es la cantidad total de elemento en la mezcla, N_{nat} es la cantidad de elemento cuyas abundancias son las naturales y N_{enr} es la cantidad de elemento enriquecido proveniente del spike añadido.

Este mismo balance de masa se puede obtener para todos los isótopos del elemento considerado, como se ve en la ecuación (2), ilustrada para un isótopo teórico i , como ejemplo:

$$N_b^i = N_{nat}^i + N_{enr}^i \quad (2)$$

Esta ecuación (4) se puede expresar como una combinación lineal de las cantidades totales y de las abundancias isotópicas de abundancia natural y del isótopo enriquecido presentes en la mezcla:

$$N_b \cdot A_b^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad (3)$$

En donde A_b^i es la abundancia del isótopo i del elemento en la mezcla, A_{nat}^i es la abundancia natural del mismo isótopo y A_{enr}^i es la abundancia del isótopo i del elemento enriquecido isotópicamente. Cuando dividimos la ecuación (3) entre la ecuación (1), se obtiene la siguiente expresión:

$$A_b^i = x_{nat} \cdot A_{nat}^i + x_{enr} \cdot A_{enr}^i \quad (4)$$

En la que:

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad (5)$$

Y

$$x_{enr} = \frac{N_{enr}}{N_{nat} + N_{enr}} \quad (6)$$

En las expresiones (5) y (6), las variables x_{nat} y x_{enr} indican las fracciones molares del elemento en la muestra alterada isotópicamente que surgen de las dos fuentes del elemento (la natural y la isotópicamente enriquecida).

Si tenemos un elemento con n isótopos, las ecuaciones de todos los isótopos del elemento pueden obtenerse de la misma forma que la ecuación (4), y se pueden expresar en forma de matriz como sigue:

$$\begin{bmatrix} A_b^1 \\ A_b^2 \\ A_b^3 \\ \dots \\ A_b^{n-1} \\ A_b^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{enr}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{enr}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{enr}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{enr}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{enr}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{enr} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (7)$$

Como tenemos más parámetros (abundancias isotópicas) que incógnitas (fracciones molares) podemos incluir un vector error en la ecuación (7). Los mejores valores de x_{nat} y x_{enr} se obtienen minimizando el vector error “e” mediante un ajuste por mínimos cuadrados.

Si nombramos el vector de abundancias en la mezcla como “y”, la matriz de las abundancias isotópicas como “A” y el vector de las fracciones molares desconocidas como x, la solución de mínimos cuadrados de este sistema de ecuaciones sobredeterminado se puede calcular como:

$$x = (A'A)^{-1} \times (A'y) \quad (8)$$

A' indica la traspuesta de “A” y el superíndice -1 su inversa. Cuando tenemos más parámetros que incógnitas (con un mínimo de tres isótopos) podemos además determinar las incertidumbres de estos parámetros empleando para ello la matriz de varianza-covarianza, V(x). Los elementos diagonales de esta matriz son las varianzas de las variables x_{nat} y x_{enr} . Esta matriz se puede calcular mediante la siguiente regresión lineal multivariante:

$$V(x) = (A'A)^{-1} \times s_e^2 \quad (9)$$

s_e^2 es la varianza del modelo de regresión (la suma de los errores cuadráticos divididos por el número de grados de libertad, n-2). Una vez se calculan las fracciones molares del elemento y sus incertidumbres, la cantidad de elemento con abundancia natural puede calcularse con facilidad conociendo la cantidad de spike añadido y viceversa.

C.5.5. Interferencias producidas en ICP-MS

El análisis por IPC-MS está limitado por la existencia de distintos tipos de interferencias; espectrales, o no espectrales, según su origen.

C.5.5.1. Interferencias espectrales

Las interferencias espectrales son causadas por otros iones que incrementan la señal propia del analito de interés debido a que tienen la misma m/z . Dentro de estos iones interferentes se dan tres posibilidades;

- interferencias isobáricas, causadas por elementos con la misma m/z ;
- especies poliatómicas, formadas por más de un elemento;
- de iones doblemente cargados.

No existe una solución única para resolver estas interferencias. Pueden reducirse midiendo otro isótopo del mismo elemento que no esté interferido, mediante correcciones matemáticas, con separaciones previas, o mediante una combinación de ellas.

Las interferencias poliatómicas suelen ir asociadas al gas del plasma, a la matriz de la muestra, al disolvente o a la presencia de otros analitos. Otra forma de eliminar estas interferencias es mediante el empleo de equipos de alta resolución. Sin embargo, al aumentar la resolución, disminuye la transmisión iónica, por lo que la sensibilidad del aparato se ve reducida.

C.5.5.2. Interferencias no espectrales

Las interferencias no espectrales son aquellas debidas a cambios en la intensidad de la señal analítica que no pueden considerarse como un solapamiento reconocible. Este cambio en la intensidad puede ser tanto por exceso como por defecto. La causa suelen ser los efectos de matriz (por su naturaleza o por la concentración de los analitos en ella) que afectan desde que se introduce la muestra en el ICP, hasta que los iones llegan al detector.

Estas interferencias pueden corregirse mediante adiciones estándar, añadiendo una concentración conocida de todos los elementos presentes en la matriz. Otro método sería el uso de patrones internos en las muestras (de un pequeño grupo de elementos) para corregir cualquier interferencia causada por la matriz. De esta forma, cada vez que se produce un cambio en la intensidad de los patrones internos, las respuestas de los elementos son actualizadas cada vez que una muestra es analizada.¹⁷

C.5.6. Empleo de LA-ICP-MS para la medida de relaciones isotópicas

Para poder asegurar la fiabilidad de las medidas mediante LA-ICP-MS, es necesario controlar, y a veces corregir, una serie de parámetros que afectan a la exactitud y a la precisión de las medidas, los cuales se indican a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7- Parámetros que influyen en la medida de las relaciones isotópicas. Adaptado de Huelga-Suárez

<i>Parámetros que afectan a la exactitud</i>	<i>Parámetros que afectan a la precisión</i>
Interferencias espectrales	Estadística del conteo de iones
Discriminación de masa	Perfil de picos isotópicos
Tiempo muerto del detector	Perfil de la señal analítica
Blancos	

C.5.7. Parámetros que afectan a la exactitud de la medida de relaciones isotópicas

C.5.7.1. Interferencias espectrales

Para poder tener una medida exacta, es necesario controlar y eliminar las interferencias espectrales que pueda tener el elemento de interés, el bario en este caso, ya que dan una intensidad de señal por exceso. La interferencia mayoritaria, en este caso Xe-Ba, solo puede ser eliminada mediante la aplicación de correcciones matemáticas, ya que es una contaminación prácticamente inevitable en el gas plasmógeno, por lo que su eliminación del mismo sería muy costosa. Para el caso que nos ocupa, se muestran en la Tabla 8 las interferencias espectrales del bario.

Tabla 8 - Interferencias espectrales.

Isótopo	Interferencia	Corrección
130Ba	130Te, 130Xe	Corrección matemática
132Ba	132Xe	Corrección matemática
134Ba	134Xe	Corrección matemática
136Ba	136Xe, 136Ce	Corrección matemática
138Ba	138La, 138Ce	Corrección matemática

C.5.7.2. Discriminación de masa

La discriminación de masa es un efecto que se produce debido a que la transmisión de isótopos pesados es más eficaz que la de los ligeros a través de todo el equipo. Siendo la energía cinética dependiente de la masa, todo proceso de estas características dará lugar a este efecto. Esto es una fuente de error a la hora de medir relaciones isotópicas ya que la medida estará desviada hacia el isótopo más pesado. Este error es de aproximadamente un 1% de la medida (para una masa igual a 100), sin tener en cuenta el tipo de instrumentación. Este efecto es independiente del uso de cuadrupolo, doble enfoque o multicolector, y es mucho menos acusado en equipos TIMS¹⁸.

La corrección puede aplicarse mediante diferentes aproximaciones, siendo las más empleadas la corrección externa y la corrección interna. En la corrección externa, se utiliza un material de referencia isotópico certificado para bario en este caso (NIST SMR 3104a Ba(NO₃)₂). La corrección interna se realiza en la misma muestra, empleando una relación isotópica conocida y constante del elemento considerado como referencia para corregir otro (valor certificado de un material de referencia isotópico o valor IUPAC). En este caso al trabajar con muestras sólidas no se pueden aplicar este tipo de correcciones.

La corrección de la discriminación de masa se realiza mediante el cálculo de un factor de discriminación, K, que se determina a través de una ecuación matemática. Existen varias posibilidades de corrección, aunque el modelo empleado en este trabajo es el exponencial, cuya ecuación se expresa a continuación, siendo R_{corr} y R_{med} las relaciones isotópicas teórica y experimental, respectivamente; K el factor de discriminación de masa por unidad de masa; Δm la diferencia de masa entre los isótopos; y, m₁ y m₂ las masas de los isótopos en la medida de la relación isotópica¹⁹.

$$R_{\text{corr}} = R_{\text{med}} \text{EXP} (\Delta m K) \quad (10)$$

C.5.8. Parámetros que afectan a la precisión de la medida de las relaciones isotópicas

C.5.8.1. Perfil de los picos isotópicos

El perfil de los picos isotópicos puede influir en la medida de las relaciones isotópicas, aunque en este caso, al trabajar a baja resolución con un equipo de doble enfoque, se consigue que los picos obtenidos sean en meseta, y por tanto todas las medidas se obtendrán en el máximo del pico, y las pequeñas variaciones en la posición no influirán de forma significativa en los valores obtenidos. Sin embargo, un aumento de la resolución implica que los picos trapezoidales pasen

a ser triangulares, empeorándose así las precisiones.

C.5.8.2. Perfil de la señal analítica

Cuando la señal analítica varía en el tiempo, la precisión que se puede alcanzar es inferior a la de una señal constante, por lo que al emplear un láser para la ablación del sólido, las precisiones de la medida serán inferiores a las de una medida en la que la muestra se introduce de forma continua y constante, ya que el arrancado en el equipo de ablación láser no es homogéneo.

C.5.8.3. Estadística de conteo de iones

Otro de los problemas habituales a la hora de usar detectores que midan el pulso generado por cada ión, es que la precisión de las medidas esté limitada por la estadística del sistema de conteo de iones, por lo que para obtener una buena precisión, se debe de alcanzar un valor umbral de cuentas por segundo.

C.6. Resultados de la medida de las muestras mediante LA-ICP-MS

A continuación se muestran los gráficos de la ablación de los otolitos y el resultado obtenido en cada caso. Cabe señalar que debido a que la etapa de pulido es un proceso artesanal, no es reproducible 100% y en esta etapa se han perdido varias muestras a la hora de realizar el desbaste. Por este motivo los resultados obtenidos han sido quizás menores de los deseados, pero lo suficientemente buenos como para concluir que se ven perfectamente los tres tipos de marcas en los otolitos de las madres y en la descendencia.

C.6.1. TB A1

En el análisis del otolito de esta trucha (Figura 17) podemos ver, comparando la imagen de la ablación con la de los resultados obtenidos en los segundos 70 y 725 aproximadamente, cómo varían las abundancias del bario 135 y del 137 en la zona exterior del otolito, por lo que se puede determinar perfectamente que el otolito pertenece a una trucha marcada. Los datos obtenidos por el detector han sido tratados convenientemente mediante una hoja de cálculo, obteniéndose para este caso un promedio en la relación $^{137}\text{Ba}/^{135}\text{Ba}$ de 3.1337 ± 0.9216 . Este

valor se calculó únicamente en el pico final, ya que la amplitud del pico de relaciones molares es mayor y permite un mejor tratamiento de los datos. Con esta relación, podemos afirmar que la trucha denominada TB A1 presenta una marca del tipo A, con un ratio 3:1.

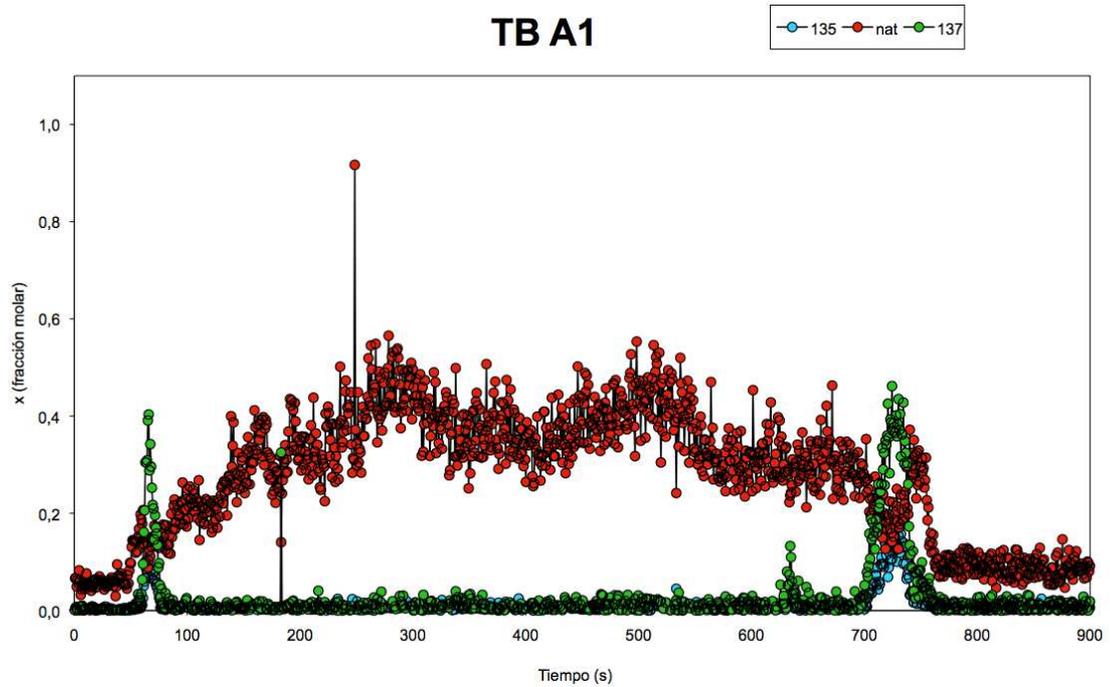


Figura 17 - Señal obtenida en la medida del otolito TB A1

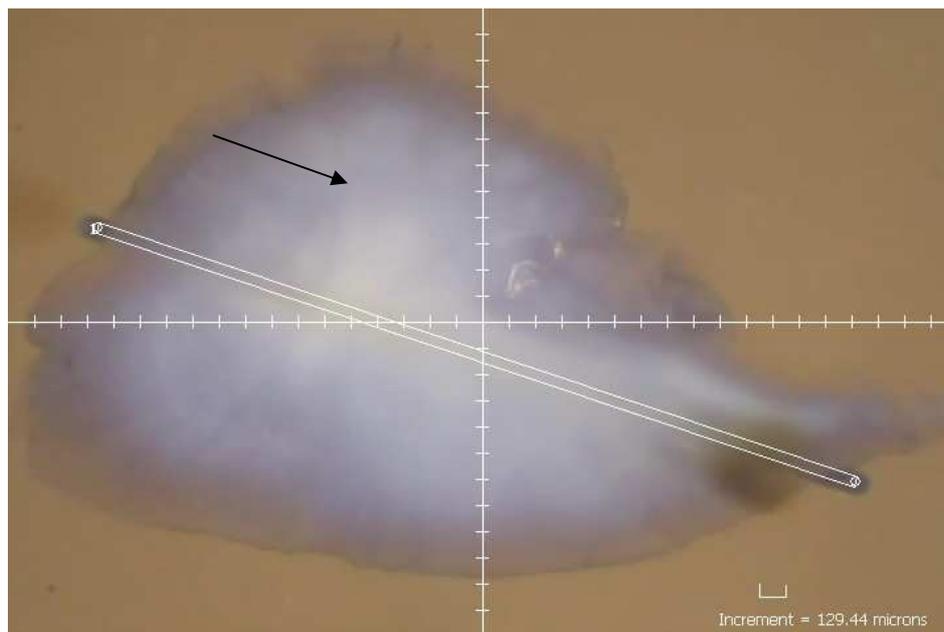


Figura 18 - Imagen del recorrido de ablación realizado en TB A1. La flecha marca el sentido en el que se realizó el proceso de ablación.

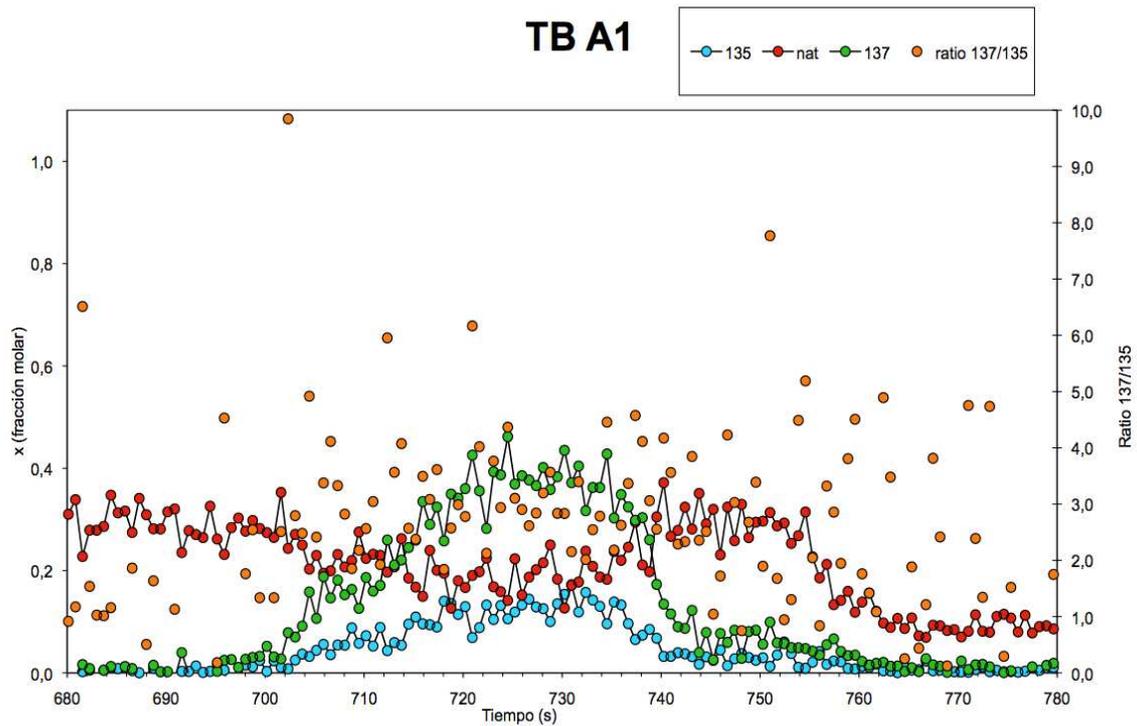


Figura 19 - Ampliación de la zona en la que se identifica el marcaje del otolito TB A1, correspondiente a una relación de fracciones molares de 3:1.

C.6.2. TB B4

Los resultados de este análisis arrojaron un resultado positivo en la marca B, correspondiente a la relación 1:1. Esta marca estaba distribuida en un anillo exterior del otolito, por lo que se confirma que la trucha es una madre inyectada. En este análisis llama la atención el tiempo durante el que se ve la marca, de aproximadamente 150 segundos en el tramo entre los 300 y los 450s (Figura 20). Se ve claramente la formación de una meseta que permanece prácticamente constante en toda la zona y, aunque las intensidades de los mismos son ligeramente inferiores a la marca A, se puede afirmar que este otolito pertenece a una trucha marcada. Al realizar el promedio de los datos en la zona elegida se obtuvo que el resultado de la relación $^{137}\text{Ba}/^{135}\text{Ba}$ en este caso fue de $1,1329 \pm 0,3885$.

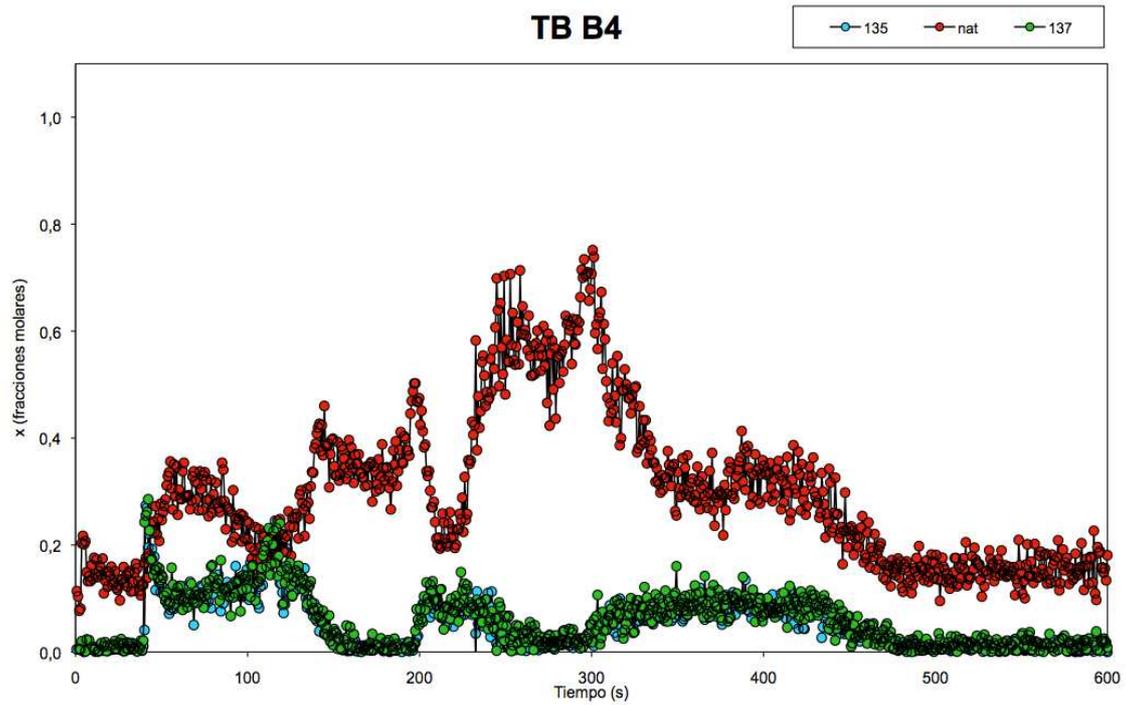


Figura 20 - Señal obtenida en la medida del otolito TB B4.

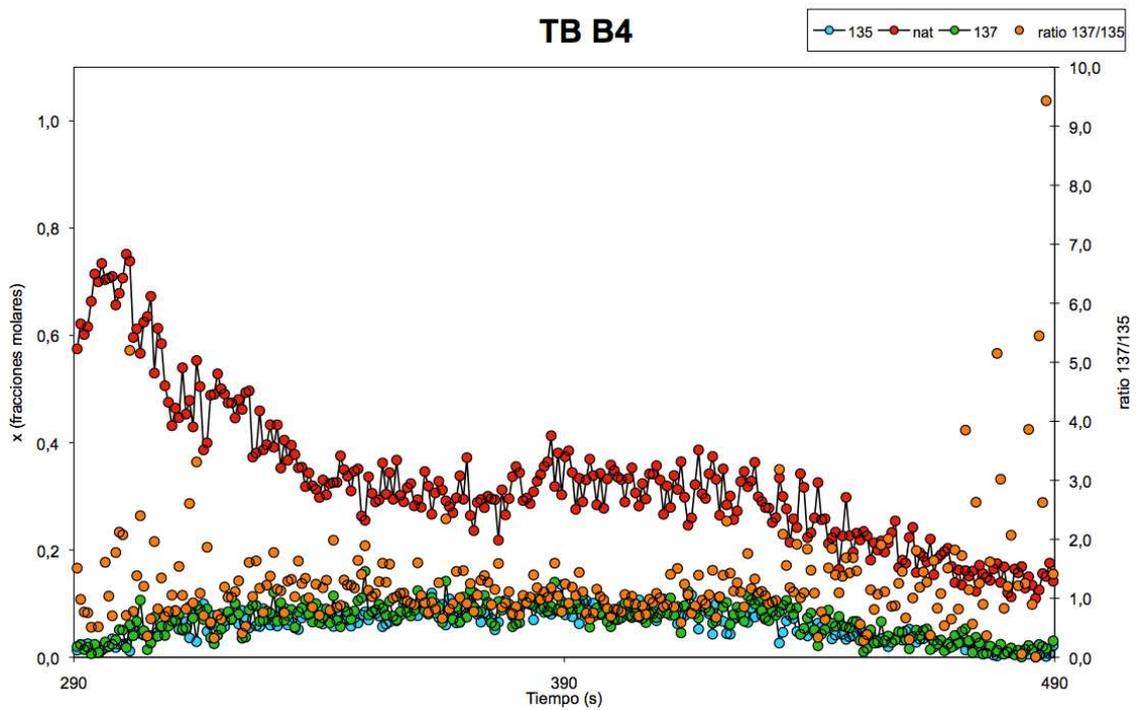


Figura 21 - Zona marcada del otolito TB B4.

C.6.3. TB C4

Este otolito pertenece a otra progenitora, cuya marca teórica corresponde a la tipo C, de relación 1:3 en el ratio $^{137}\text{Ba}/^{135}\text{Ba}$. En el gráfico (Figura 22) podemos ver que hay una pequeña marca en torno a los 90s, y otra mucho más grande entre los 600 y los 700, que forma una meseta, en la que se aprecia claramente la bajada del bario natural y la subida de los isótopos enriquecidos. Cabe destacar también que el aumento de la fracción molar de bario natural hacia los 300 segundos aproximadamente, corresponde al núcleo del otolito, en el que, al ser más compacto, la fracción molar de bario natural aumenta, por producirse un mayor arrancado de material. El tratamiento de los datos de esta marca confirma que el promedio de valores en la zona de la marca es de $0,3467 \pm 0,1584$, confirmándose así que esta trucha está marcada con el tipo C y éste es perfectamente reconocible y diferente a los otros dos.

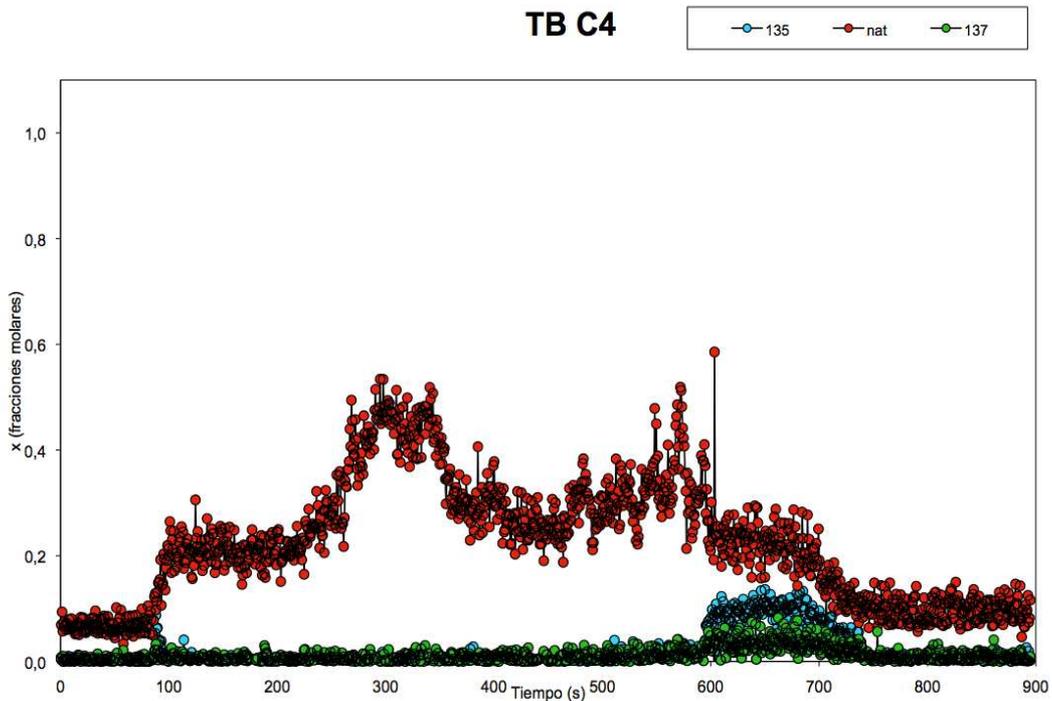


Figura 22 - Fracciones molares obtenidas en la medida del otolito TB C4.

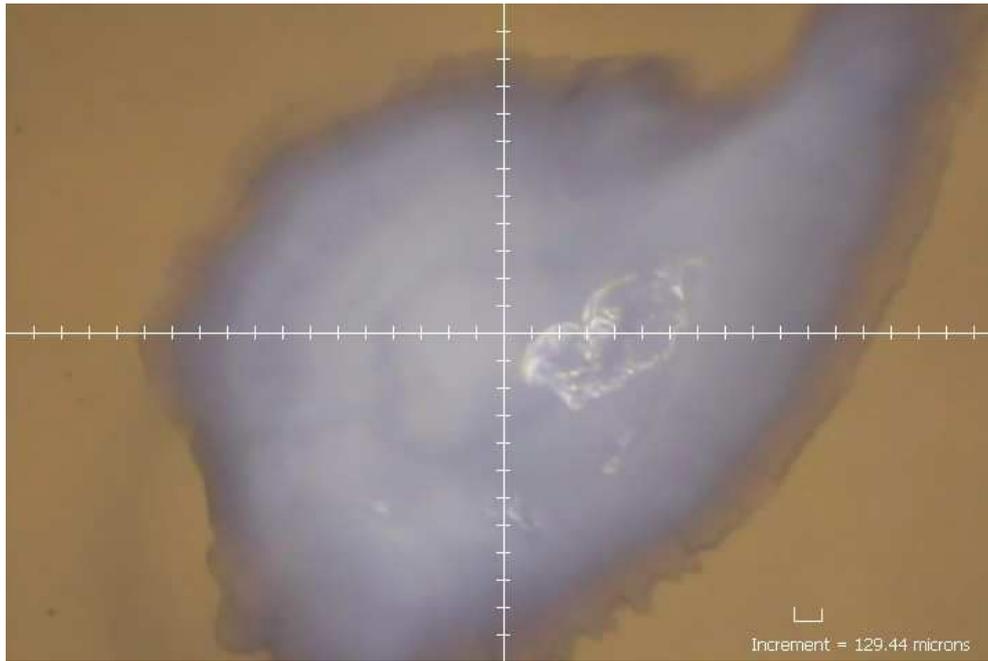


Figura 23 - Otolito TB C4

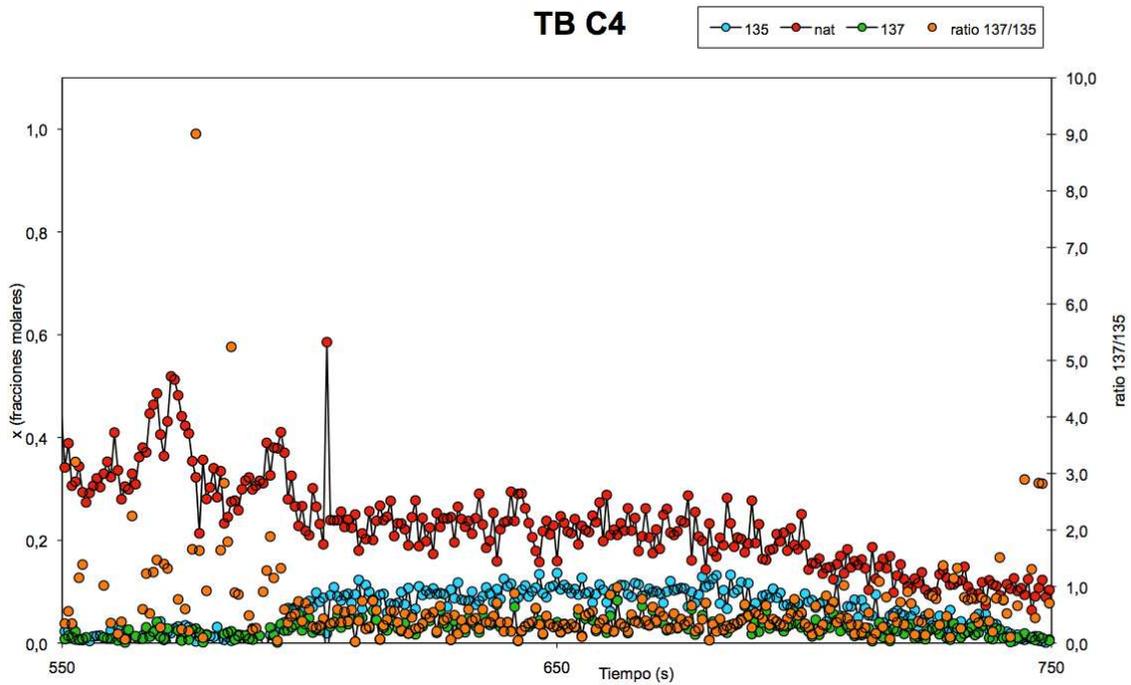


Figura 24 - Ampliación de la zona marcada. En naranja se comprueba que el ratio 137/135 oscila en torno a 0,3, lo que corresponde a una marca de tipo C.

C.6.4. BC13

Otro de los análisis con resultado positivo fue el de una trucha descendiente, con una edad de 9 meses. Este análisis es mucho más complejo que el de las truchas madre por diversos motivos. El primero es el tamaño del otolito, que como se puede apreciar en la imagen, es mucho más pequeño que el de las madres. Otra desventaja es que el núcleo no es 100% identificable y además, la marca está en una zona muy pequeña del otolito, por lo que hay que realizar varios barridos con el láser para lograr identificar la misma. En la Figura 25, podemos observar que en este análisis se realizaron 5 barridos diferentes, realizándose una parada en el tramo de 900 a 1080 segundos aproximadamente. Dicha parada se debe a que en el equipo Element2 se ha de configurar manualmente el número de pases para ajustarlos al tiempo de la ablación y, en algunos casos, sobre todo en tiempos elevados de análisis, se desajusta un poco. Como quedaba aún tiempo de análisis se configuró un último barrido a continuación de los elegidos, teniendo la suerte de encontrar la marca en el quinto pase. En este último barrido, ampliado en la Figura 26, podemos ver claramente como aumenta la fracción molar de bario natural al principio, indicando que la zona es núcleo, y como posteriormente baja esta señal, aumentando a la vez las de ^{137}Ba y ^{135}Ba , se confirma la existencia de una marca. Como se ha señalado anteriormente, las truchas descendientes fueron mezcladas en el criadero, por lo que no se sabía a priori, como en el caso de las madres, el tipo de marca existente. El promedio de la zona en la que se ve la marca arrojó el resultado en la relación de fracciones molares de 0.3149 ± 0.1303 , confirmándose que la marca existente es del tipo C.

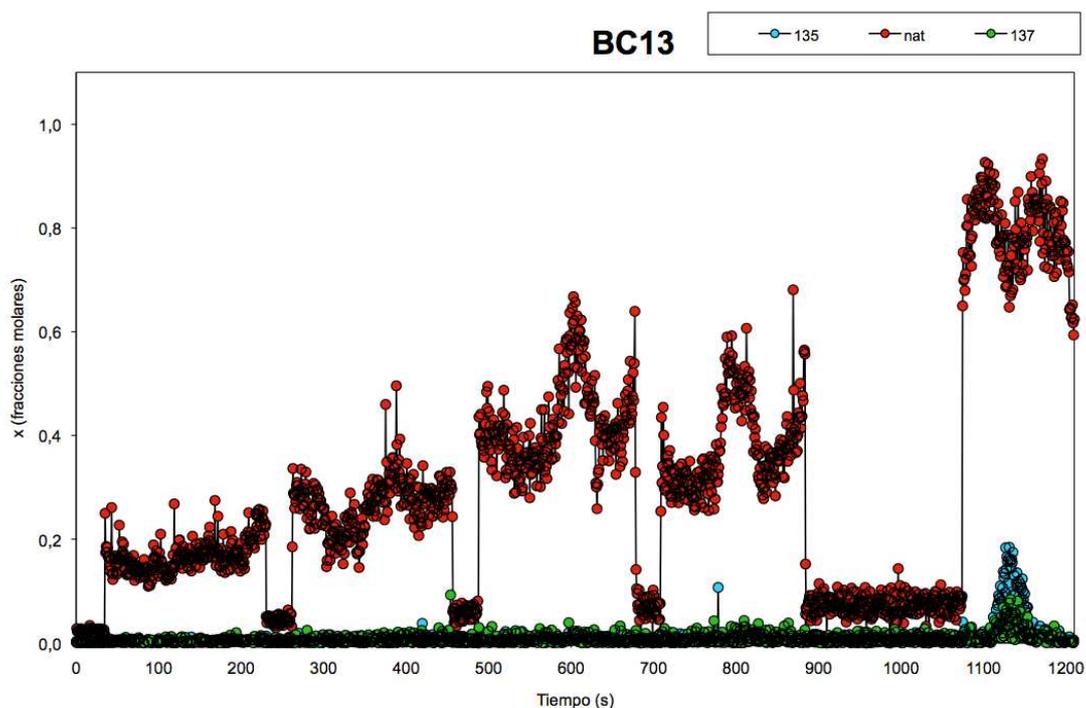


Figura 25 - Señal obtenida en los barridos de ablación láser de la muestra BC13

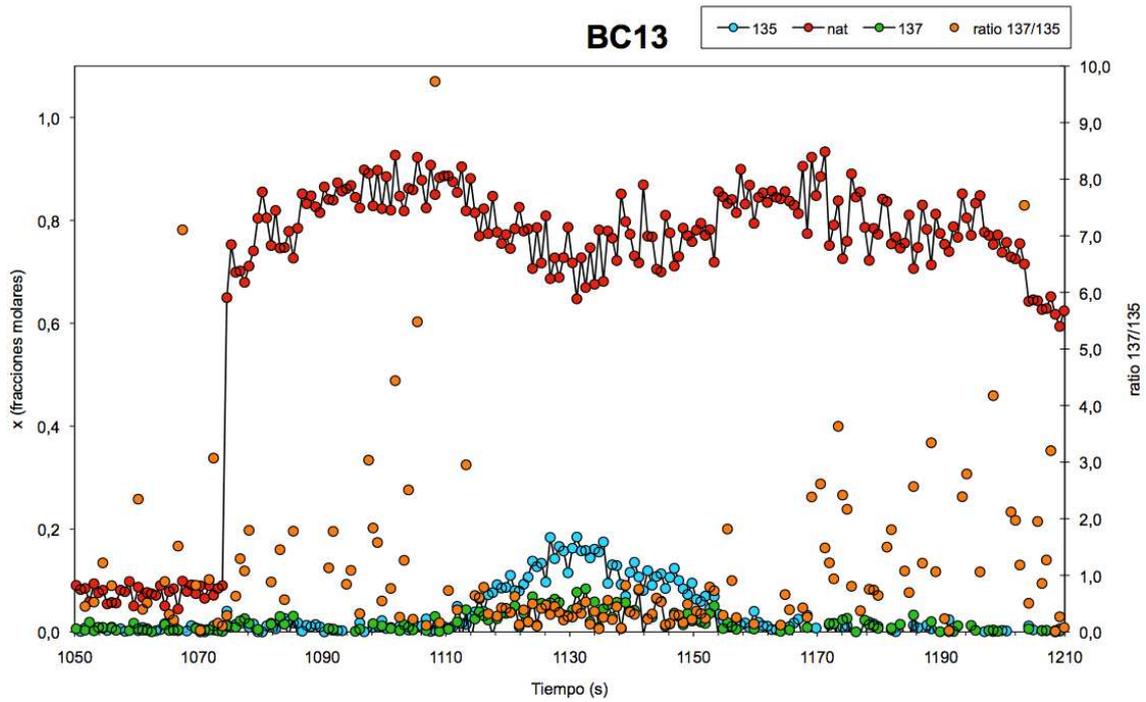


Figura 26 - Ampliación del barrido láser en el que encontramos la marca en el ejemplar BC13.

En la figura siguiente (Figura 27) se muestra un otolito de 14 meses, cuyo tamaño es similar al de la trucha analizada. Podemos ver que el tamaño es muy inferior al de las madres.



Figura 27 - Otolito de 14 meses, similar a BC13.

D. CONCLUSIONES

El presente trabajo recoge un resumen de los procedimientos a realizar para un marcaje transgeneracional que permita distinguir individuos entre sí, usando perfiles isotópicos modificados de ^{135}Ba y ^{137}Ba , variando la relación molar entre los perfiles.

Con esto se demuestra que el marcaje con dos isótopos enriquecidos es heredable a la siguiente generación.

Asimismo, se ha conseguido demostrar que la marca es visible en peces, 9 meses después del marcaje y se ha identificado el tipo de marca individual, aunque debido a problemas de contaminación con los equipos, no se han obtenido resultados en todas los otolitos analizados.

Esta metodología cubre perfectamente las necesidades de las piscifactorías para la identificación de individuos o grupos para otros estudios como pueden ser la mortalidad, la abundancia, los movimientos migratorios, el éxito de las repoblaciones y otros muchos en los que se requiera que los peces tengan una marca individual específica.

Además, el procedimiento de marcaje desarrollado es sencillo y de fácil aplicación y la deconvolución de perfiles isotópicos permite una identificación directa de los individuos gracias a la obtención de la relación de fracciones molares.

La posibilidad de un marcaje diferencial de peces, en comparación con otros procedimientos de marcaje isotópico transgeneracional es una ventaja muy grande de este procedimiento, ya que se obtienen los mismos resultados que hasta ahora solo se podían conseguir con marcas genéticas.²⁰

Hay que destacar también que aunque los isótopos enriquecidos son relativamente caros, su uso como marcadores no es más caro que el empleo de otro tipo de marcas, ya que una sola inyección permite el marcado de por vida de más de 1000 larvas con un coste aproximado de \$5.00.

Por todo esto, la metodología descrita representa un avance importante en el marcado transgeneracional con isótopos y permite sentar la base para el uso de esta técnica en futuros estudios poblacionales de peces.

²⁰ DeHaan, P. W.; Jordan, G. R.; Ardren, W. R. *Use of genetic tags to identify captive-bred pallid sturgeon in the wild: improving abundance estimates for an endangered species.* *Conserv. Biol*,9, 691–697. **2008**

Bibliografía

- ¹ http://www.azgfd.gov/w_c/Fish_Tagging_Marking_Techniques.shtml **2012**.
- ² <http://es.scribd.com/doc/19020828/3-Otolitos> **2012**.
- ³ M'Intosh, W.C.; Prince, E.E. - *On the development and life histories of the teleostean food and other fishes*. Trans. R. Soc. Edinb, 35: 665–944, **1890**.
- ⁴ Irie, T. - *On the forming season of annual rings (opaque and translucent zones) in the otoliths of several marine teleosts*. J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ., 1-311–317, **1957**.
- ⁵ Danevig, E.H. - *Chemical composition of the zones in cod otoliths* J. Cons. peur Ing. Explor. Mer, 21:156–159, **1956**.
- ⁶ Thorrold, S.R.; Jones, G. P.; Planes, S.; Hare, J.A. - *Transegnerational marking of embryonic otoliths in marine fish using barium stable isotopes*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63: 1193–1197 **2006**.
- ⁷ Almany, G. R.; Berumen, M. L.; Thorrold, S. R.; Planes, S; Jones, G. P. *Local Replenishment of Coral Reef Fish Populations in a Marine Reserve*. Science, 316, 742–744. **2007**.
- ⁸ Munro, A. R.; Gillanders, B. M.; Elsdon, T. S.; Crook, D. A.; Sanger, A. C. *Enriched stable isotope marking of juvenile golden perch (*Macquaria ambigua*) otoliths*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 65, 276–285. **2008**.
- ⁹ Huelga-Suarez, G.; Moldovan, M.; Garcia-Valiente, A.; Garcia-Vazquez, E.; Garcia-Alonso, J. I. *Individual-Specific Transgenerational Marking of Fish Populations Based on a Barium Dual-Isotope Procedure*. Anal. Chem, 84, 127-133, **2012**.
- ¹⁰ M. Guillong, I. Horn and D. Günther, J. *A comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state nd:YAG laser for laser ablation icp-ms* Anal. At. Spectrom., 18, 1224–1230 **2003**.
- ¹¹ I. Horn, D. Günther, and M. Guillong. *Design and performance of an all-solid-state 193 nm nd:YAG laser ablation system*. Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy, 58(10):1837-1846, **2003**.

-
- ¹² Thomas, R.; *A beginner's guide to ICP-MS. Spectroscopy.* **2001.**
- ¹³ Greenfield, S.; Jones, LL.; Berry, C.T.; *High-pressure plasmas and spectroscopic emission sources.* *Analyst*, 89, 713-720 **1964.**
- ¹⁴ Nam, S.; Zhang, H.; Cai, M.; Montaser, A. *A status report on helium inductively coupled plasma mass spectrometry.* *Fresenius J. Anal. Chem.*, 355, 510-520. **1996.**
- ¹⁵ Zhang, H.; Nam, S.; Cai, M.; Montaser, A. *Atmospheric pressure helium inductively coupled plasmas for elemental mass spectrometry.* *Appl. Spectrosc.*, 50, 427-435, **1996.**
- ¹⁶ Berglund, M.; Wieser, M. E. *Isotopic composition of the elements 2009.* *Pure Appl. Chem.*, 83, 397-410. **2011.**
- ¹⁷ Huelga-Suarez, G. - Desarrollo de una metodología para la medida de relaciones isotópicas de estroncio en tejido óseo de procedencia arqueológica mediante el uso de ICP-MS. Seminario de investigación. Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química. Universidad de Oviedo. **2009.**
- ¹⁸ Ruiz-Encinar, J.; Leal-Granadillo, I.; García-Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Isotope ratio measurements using gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for the assessment of organolead sources.* *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 475-480, **2001.**
- ¹⁹ Russell, W.A.; Papantastassious, D. A.; Tombrello, T. A. *Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials.* *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 42, 1075-1090. **1978.**