

Resumen en español

I Introducción general

I.1 Papel de la respiración en los ciclos biogeoquímicos

En las aguas superficiales del océano, el fitoplancton convierte el dióxido de carbono (CO_2) en carbono orgánico particulado (POC) a través de la fotosíntesis. La mayor parte de este carbono fijado se remineraliza de nuevo en la zona epipelágica o en la parte más superficial de la zona mesopelágica. De esta forma, tan solo el 5-25 % de la producción primaria neta (NPP) se transporta desde la zona eufótica y, generalmente, menos del 3 % llega a las profundidades batipelágicas (De La Rocha y Passow, 2007). De la NPP que se remineraliza en la columna de agua, el 15 % es consumida por las bacterias (Ducklow, 2000), el 30-70 % por el microzooplancton (Calbet y Landry, 2004) y el 20-35 % por el mesozooplancton (Hernández-León e Ikeda, 2005). La transferencia de la materia orgánica al interior del océano ocurre mediante una combinación de procesos de hundimiento gravitacional de las partículas, de advección o la mezcla vertical de materia orgánica disuelta y de transporte activo por el zooplancton (Fig. 1.1), conocidos en su conjunto como la “bomba biológica” (Volk y Hoffert, 1985). A pesar de que los procesos de mezcla y difusión también transportan materia orgánica disuelta y particulada en suspensión hasta el océano profundo (Aristegui et al., 2002; Hansell et al., 2012), el hundimiento pasivo de POC se considera generalmente la fuente principal de carbono para estas aguas. De ahí que numerosos programas de investigación internacionales se hayan centrado en el estudio de los flujos verticales de POC en las últimas décadas (por ejemplo, “Joint Global Ocean Flux Study, JGOFS”).

El flujo vertical de POC se puede medir de una manera directa mediante trampas de sedimento (e.g., Honjo et al., 2008) o se puede estimar indirectamente mediante el desequilibrio $^{234}\text{Th}/^{238}\text{U}$ (Moran et al., 2003) y los modelos inversos (Schlitzer et al., 2003; Usbeck et al., 2003). En condiciones estables, el descenso en el flujo de POC determinado por cualquiera de los métodos anteriores debería estar en equilibrio con la actividad heterotrófica de los organismos en la columna de agua. Sin embargo, la comparación entre las demandas de carbono microbianas y de los metazoos con la atenuación del flujo de POC han reflejado un desacople entre estas fuentes y sumideros de carbono (Burd et al., 2010; del Giorgio y Duarte 2002). A pesar de que el valor de este desfase varía espacialmente, se ha observado que las estimas de actividad heterotrófica son normalmente de 2 a 3 órdenes de magnitud superiores a los valores de flujo vertical de POC tanto en la zona mesopelágica como en la batipelágica (Baltar et al., 2009; Reinthaler et al., 2006; Steinberg et al., 2008). Esta discrepancia puede ser debida a (i) una sobreestima de las demandas de carbono y/o (ii) a una subestima del suministro de carbono para el océano profundo (Burd et al., 2010). El primero se explicaría por el uso de factores de conversión inadecuados para el océano profundo, que podrían aumentar el valor de la demanda de carbono, mientras que el segundo podría ser una consecuencia de la baja eficiencia de recolección que tienen las trampas de sedimento con respecto al POC suspendido, el cual puede contribuir significativamente al flujo total de POC (Alonso-González et al., 2010). En contraposición a estos resultados, Giering et al. (2014) han encontrado recientemente un balance entre la respiración del micro- y mesozooplankton y el flujo vertical de carbono.

Todos estos hallazgos apoyan el uso de la respiración del plancton como una alternativa para estimar los flujos verticales de carbono en la columna de agua. El método conceptual propuesto por Packard y Christensen (2004) utilizó medidas del sistema de transporte de electrones respiratorio (ETS) del microplancton para construir modelos de flujo de carbono (F_C). Posteriormente, se ha aplicado también para determinar el F_C asociado al zooplankton en las aguas de Canarias (Packard y Gómez, 2013). Este método se fundamenta en el hecho de que el plancton degrada el POC que sedimenta en la columna de agua, metaboliza esta materia orgánica en sus células y, a través de la respiración, libera CO_2 al medio marino. Matemáticamente, la integral de los perfiles verticales de producción de CO_2 mediante la respiración (R_{CO_2}) desde cualquier profundidad en la columna de agua hasta el fondo oceánico representa

el POC necesario para mantener la respiración de los organismos por debajo de dicha profundidad. Se trata del concepto inverso aplicado por Suess (1980) para calcular las tasas de respiración en la columna de agua a partir de la primera derivada de los perfiles de flujo vertical de carbono. Sin embargo, hasta la fecha, aún no se han comparado los valores obtenidos mediante el método del F_C con las medidas directas de flujo vertical de POC, tal y como se ha llevado a cabo con otros métodos indirectos (e.g., Usbeck et al., 2003).

En general, los estudios de balance de carbono han demostrado la importancia de comprender los procesos que gobiernan la remineralización de la materia orgánica desde su producción en las aguas superficiales hasta la sedimentación en el fondo oceánico. Siendo la respiración el principal proceso involucrado en el consumo de estas partículas, se hace imprescindible comprender los mecanismos que dirigen el consumo de oxígeno en las células así como los factores que influyen en este consumo.

1.2 La respiración en las células: la base bioquímica y los mecanismos de regulación

La respiración es un proceso común a todos los organismos marinos. Más del 95 % de toda la respiración aeróbica y anaeróbica en las células es debida a la actividad del ETS (Nelson et al., 2008). Este sistema está compuesto por cuatro complejos enzimáticos que son lipo-proteínas situadas con una orientación especial en la membrana interna mitocondrial de los eucariotas o en la membrana plasmática de los procariotas (Fig. 1.2). El complejo I, también llamado NADH deshidrogenasa, constituye el punto de entrada de los electrones en el sistema respiratorio junto con el complejo II ó succinato deshidrogenasa. Ambos complejos reducen la ubiquinona a ubiquinol que, a su vez, es oxidado por el complejo III (también conocido como complejo bc1) para reducir el citocromo c. El complejo IV, ó citocromo c oxidasa, es el último complejo del ETS y reduce el oxígeno molecular a agua, en el caso de la respiración aerobia, oxidando el citocromo c. Así, cada uno de estos complejos enzimáticos cataliza una reacción redox diferente a lo largo de una escala creciente de potenciales de reducción standard (E'^o), desde E'^o ($\text{NAD}^+ | \text{NADH}$) = -0.32 V hasta E'^o ($\text{O}_2 | \text{H}_2\text{O}$) = +0.82 V (Nelson et al., 2008). La reacción neta es altamente exergónica. La energía redox liberada por este transporte escalonado de electrones se utiliza para traslocar protones desde el interior hasta el exterior de la membrana, estableciéndose de esta forma un gradiente electroquímico de protones

denominado “fuerza protón-motriz”. Los complejos del ETS que contribuyen a este bombeo de protones son los complejos I, III y IV. Este gradiente es aprovechado por un quinto complejo embebido en la membrana, la ATP sintasa, para producir adenosín-5'-trifosfato (ATP) a partir de adenosín-5'-difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i). El acople entre el ETS respiratorio y la síntesis de ATP en las mitocondrias fue descrito por primera vez por Peter Mitchell en la denominada “teoría quimiosmótica” (Mitchell, 1966). Durante este proceso, se oxidan dos moléculas de NADH, los complejos translocadores de protones bombean 20 protones del interior al exterior de la membrana, una molécula de O_2 se reduce a dos moléculas de H_2O por la citocromo oxidasa y se producen de 5 a 6 moléculas de ATP. Debido a la relación estequiométrica entre el consumo de O_2 y el flujo de electrones a través del ETS, se ha aceptado que el ETS es la base bioquímica del consumo respiratorio de O_2 (R_{O_2}).

Los principales donantes de electrones del ETS son los piridín nucleótidos, tanto la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como su forma fosforilada (NADP), y el succinato. A pesar de que el succinato, junto con el NAD, son los principales donantes de electrones del ETS mitocondrial en organismos no marinos (Nelson et al., 2008), varios estudios en bacterias, protozoos, fitoplancton y zooplancton han demostrado que la enzima succinato deshidrogenasa desempeña un papel menor en el total de la actividad del ETS en los organismos marinos (Kenner y Ahmed, 1975b; Owens y King, 1975a; Savenkoff et al., 1995). Por consiguiente, esta tesis se centra en el papel de los piridín nucleótidos en la respiración.

El NAD y el NADP se encuentran tanto en forma oxidada (NAD^+ , $NADP^+$) como en forma reducida (NADH, NADPH). El NADH y el NADPH son moléculas transportadoras de electrones universales e hidrosolubles que se asocian reversiblemente con las enzimas deshidrogenasas (Nelson et al., 2008). El NADH transfiere electrones desde las reacciones catabólicas hasta la NADH deshidrogenasa en el ETS, mientras que el NADH generalmente provee de electrones a las reacciones anabólicas. Sin embargo, el NADPH también puede donar electrones al ETS respiratorio de dos formas: (i) puede reducir el NAD^+ a NADH en una reacción catalizada por la enzima $NAD(P)^+$ transhidrogenasa, y (ii) puede actuar como donante directo de electrones en el ETS (Hatefi, 1973; Moller y Rasmusson, 1998). Además, el NADPH es el principal sustrato del ETS microsomal (Strittmatter, 1968). Los nucleótidos oxidados, NAD^+ y $NADP^+$, se regeneran constantemente en las reacciones catabólicas.

Mientras que el NAD^+ es principalmente reducido durante la glicólisis y el ciclo de Krebs, el NADP^+ se reduce mayoritariamente en la ruta de las pentosas fosfato en las células animales, además de durante la fotosíntesis en las células vegetales. Así, las deshidrogenasas dependientes de NAD(P) sustraen dos átomos de hidrógeno de sus sustratos y transfieren uno al NAD(P)^+ como un ión híbrido y el otro lo libera al medio.

Debido a que estas moléculas están involucradas en prácticamente todas las rutas metabólicas, no cabe duda de que tienen un papel clave en el metabolismo energético. Así, desde el trabajo seminal de Chance y Williams (1955), donde correlacionaron el estado metabólico de las mitocondrias con los niveles de oxido-reducción de los nucleótidos, ha habido mucha información de las concentraciones de estas coenzimas en los tejidos animales. Más recientemente, se ha descifrado un gran conjunto de funciones inesperadas, tanto para el NAD como para el NADP , en la señalización celular, los procesos de antioxidación y estrés oxidativo y la muerte celular entre otras (Berger et al., 2004; Moller y Rasmusson, 1998; Pollak et al., 2007; Ying, 2008; Ziegler, 2005). Esto ha promovido su cuantificación y el estudio de su estado redox tanto en células animales como vegetales. Sin embargo, la información que se tiene de estas moléculas en los microorganismos continúa siendo muy limitada, con la mayoría de trabajos centrados en algunas especies de bacterias (Andersen y von Meyenburg, 1977; London y Knight, 1966; Setlow y Setlow, 1977; Wimpenny y Firth, 1972). En los organismos marinos, el desconocimiento es prácticamente total, a excepción de un único trabajo en el meroplancton (Schomer y Epel, 1998).

En el océano, el aceptor final de electrones en el ETS puede cambiar en función del entorno. En la superficie y en el resto de aguas óxicas, se reduce preferiblemente el O_2 mientras que en las zonas de mínimo de oxígeno y en las cuencas anóxicas se pueden reducir el NO_3^- , el NO_2^- o el SO_4^{2-} . En cualquier caso, la química básica que cataliza la oxidación de los piridín nucleótidos y la reducción de los aceptores de electrones es prácticamente idéntica en bacterias, protistas, fitoplancton y zooplancton (Packard, 1985a; Vosjan, 1982).

En base al fuerte nexo teórico entre la respiración y la actividad del ETS, así como a la amplia distribución de este sistema enzimático en los organismos, Packard et al. (1971) desarrollaron la técnica del ETS como un índice para la respiración de los organismos en el medio marino. Este ensayo enzimático requiere, por un lado, la adición de una concentración de piridín nucleótidos a

saturación para asegurar la especificidad de la reacción y la reproducibilidad de las medidas (Maldonado et al., 2012). Por otro lado, los electrones que se transfieren a través del ETS son recogidos por un aceptor artificial de electrones, el INT (cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil monotetrazolio), que se reduce a formazán, adquiriendo un color rojizo. Así, la tasa de reducción del INT en presencia de un exceso de sustratos indica la capacidad de los organismos vivos de consumir oxígeno (u otro aceptor de electrones) o, en otras palabras, su respiración potencial (Φ). Estequiométricamente, la producción de formazan a partir del INT (en μmol) se relaciona en un factor de 2 con la actividad del ETS (en $\mu\text{mol } e^-$) y en un factor de 0.5 con la Φ (en $\mu\text{mol O}_2$) (Packard y Williams, 1981).

Desde que fue propuesto, el ensayo del ETS ha demostrado ser una herramienta útil para estudiar las tasas de respiración en el océano cuando las medidas de R_{O_2} son inviables, como por ejemplo en el océano profundo (Baltar et al., 2009; Ikeda, 2011; Packard et al., 1977, 1988) y en los sedimentos oceánicos (Cammen et al., 1990; Christensen y Packard, 1977). Los problemas de exceso de individuos, inanición y/o manipulación que inevitablemente afectan a las tasas de respiración medidas mediante incubaciones se evitan así mismo mediante esta metodología. Además, durante las campañas oceanográficas, donde es esencial una alta adquisición de datos, las medidas del ETS proporcionan, por un lado, una manera rápida, simple y barata de estimar la variabilidad mesoescalar del metabolismo respiratorio de los organismos planctónicos (e.g., Fernández-Urruzola, 2014; Herrera et al., 2014b; MacKinnon et al., 2015; Minutoli y Guglielmo, 2009; Packard et al., 1985b) y por otro una manera de calcular los flujos verticales de carbono (Packard y Christensen, 2004), tal y como se ha descrito anteriormente. Aparte de su aplicación en las investigaciones oceanográficas, la actividad del ETS también se ha medido en experimentos de laboratorio para caracterizar el metabolismo respiratorio de bacterias (Christensen et al., 1980; Romero-Kutzner et al., 2015), protozoos (Finlay et al., 1983), fitoplancton (Kenner y Ahmed, 1975b; Packard et al., 1971) y zooplancton (Herrera et al., 2011; Owens y King, 1975a).

El ensayo del ETS precisa de la adición de concentraciones de sustratos a saturación pero los organismos en el medio marino es poco probable que esten en estas condiciones. Por lo tanto, las medidas de Φ se deben convertir en valores de R_{O_2} *in vivo*. A pesar de que teóricamente el R_{O_2} real es aproximadamente la mitad de la velocidad máxima del ETS (Segel, 1993), este valor puede variar

con el estado fisiológico de los organismos y debe ser comprobado para las diferentes condiciones ambientales. En la oceanografía, la manera actual de calcular la respiración del plancton es a través de las relaciones R_{O_2}/Φ . Se han utilizado estudios como los llevados a cabo por Arístegui y Montero (1995), del Giorgio (1992), Christensen et al. (1980) y Christensen et al. (1989) para estimar las tasas de respiración tanto en la zona eufótica como en las aguas del océano profundo. Esta aplicación está avalada por la buena relación entre el R_{O_2} y la Φ en todos los organismos desde bacterias hasta zooplancton, con un rango de tamaño de más de diez órdenes de magnitud (Christensen et al., 1980; Finlay et al., 1983, King y Packard, 1975). Sin embargo, se ha observado una variabilidad del cociente R_{O_2}/Φ en respuesta a cambios en la composición específica y la fisiología (Bamstedt, 1979; Hernández-León y Gómez, 1996; Herrera et al., 2011; King y Packard, 1975), lo que ha impedido el uso de un valor único y universal de este cociente. Hernández-León y Gómez (1996) estudiaron el efecto de la temperatura, el tamaño corporal, clorofila *a* y la productividad primaria en la relación R_{O_2}/Φ e identificaron la calidad y/o cantidad de alimento como los factores más influyentes. Estos autores, además, sugirieron que la variabilidad estaba asociada a cambios en el R_{O_2} en vez de en la Φ . En este sentido, la influencia de la composición del alimento sobre el R_{O_2} ha sido descrita previamente (e.g., Conover, 1966; Ikeda, 1977; Mayzaud, 1976). Sin embargo, aún se desconoce cómo se explica este efecto en los procesos bioquímicos que tienen lugar en el interior celular de los organismos marinos. A pesar de la variabilidad encontrada en este cociente, del Giorgio (1992) mostró que el error asociado con esta aplicación del ETS es similar al error en otras técnicas standard ecológicas utilizadas en los estudios de flujo de carbono, tales como el método del ^{14}C , la incorporación de timidina, etc.

Packard et al. (1996) propusieron una metodología alternativa para estimar la tasa real de R_{O_2} a partir de medidas del ETS. Estos autores identificaron que la disponibilidad de alimento era el mecanismo más obvio involucrado en el control de la actividad *in vivo* del ETS, a pesar de que reconocieron la posible contribución adicional de otros moduladores alostéricos (e.g., ADP y ATP) en la regulación global en las células. De acuerdo con esto, estos autores desarrollaron un modelo fundamental basado en las asunciones que (i) el R_{O_2} es el resultado directo de la actividad del ETS y ambos están estequiométricamente relacionados, (ii) la actividad del ETS está regulada por la concentración de sustratos al comienzo del sistema, y (iii) la reacción obedece las reglas de la

cinética enzimática. En su estudio, el modelo cinético bisustrato predijo exitosamente el R_{O_2} en la bacteria marina *Pseudomonas nautica*. Más recientemente, Aguiar-González et al. (2012) obtuvieron igualmente una buena estimación del R_{O_2} al aplicar el mismo modelo en otras especies de bacterias cultivadas con una fuente de carbono diferente. Packard y Gómez 2008, a su vez, demostraron que este modelo enzimático basado en los principios fundamentales predecía mejor la respiración en las escalas temporales cortas que un modelo basado en la biomasa de los organismos. Sin embargo, todos estos trabajos constituyen unos ejercicios de modelización heurísticos ya que incluyeron valores de sustratos y de constantes cinéticas estimados en lugar de medidos. Así, tanto la constante de Michaelis (K_m) como la de disociación (K_{ia}) se obtuvieron en estos estudios mediante la optimización de medidas realizadas en otros organismos a través de sucesivas iteraciones. El curso temporal de las concentraciones de sustrato se estimaron a partir de algoritmos basados en las fuentes de carbono y en la biomasa de los organismos. En la bibliografía, existe muy poca información sobre los valores de K_m del ETS en los organismos marinos (e.g., Owens y King, 1975a) y, toda la que existe, está basada en reacciones monosustrato. De ahí la necesidad de medir tanto las concentraciones intracelulares de NADH y NADPH como las constantes cinéticas bisustrato en los organismos marinos con el fin de verificar la capacidad de predicción de este modelo enzimático.

1.3 Objetivos y esquema de la tesis

A lo largo de esta tesis, se ha abordado el estudio de la respiración en los organismos marinos desde distintos puntos de vista. Desde un punto de vista biogeoquímico, se han utilizado las medidas de respiración para calcular los flujos verticales de carbono asociados a la actividad metabólica de los organismos en la columna de agua. Por otro lado, se ha estudiado la variabilidad del metabolismo respiratorio del zooplancton desde un punto de vista fisiológico, tanto en el medio marino como en el laboratorio, y el efecto que ejercen factores como la temperatura, la calidad del alimento y la inanición sobre este proceso. Finalmente, se han investigado los mecanismos que regulan la actividad *in vivo* de los enzimas responsables de la respiración en el interior celular. Esto permite obtener una imagen general de la importancia de la respiración en los océanos, ya que los factores que controlan las tasas de consumo de oxígeno en las células afectarán en última instancia al papel del plancton marino en la

remineralización de la materia orgánica.

Los *objetivos específicos* de esta tesis fueron:

1. Demostrar la utilidad de las medidas de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) para estudiar la variabilidad espacio temporal de los flujos de carbono así como para estimar la capacidad de retener nutrientes en la columna de agua y la producción heterotrófica de energía en el plancton marino. Para ello, se utilizaron perfiles de ETS medidos en el microplancton de las aguas del afloramiento de Perú a lo largo de sucesivos transectos perpendiculares a la costa. Este objetivo se desarrolla en el **Capítulo 2**.
2. Sin embargo, hasta la fecha, aún no se ha comprobado si los valores de flujo vertical de carbono obtenidos mediante el modelo (F_C) explicado en el objetivo 1 se ajustan a los determinados mediante una metodología más tradicional como son las trampas de sedimento. Este es el objetivo, por lo tanto, que se aborda en el **Capítulo 3**. La comparación de ambos métodos se llevó a cabo durante una campaña oceanográfica en las aguas del afloramiento de Benguela.
3. Debido a la importancia de la respiración en los ciclos biogeoquímicos, el siguiente objetivo se enfocó en el estudio de la variabilidad espacio temporal del metabolismo respiratorio del zooplancton en el océano. Se determinaron el consumo respiratorio de oxígeno (R_{O_2}), las tasas potenciales de respiración (Φ) y la concentración de los principales sustratos del ETS, los piridín nucleótidos NAD y NADP, en organismos recogidos a lo largo de 3 campañas oceanográficas en el Atlántico norte, Océano Índico, afloramiento de Benguela y las aguas costeras de las Islas Canarias (España). Asumiendo un papel importante de los sustratos en el control de la respiración a nivel intracelular, se espera encontrar una relación entre los valores de R_{O_2} y de piridín nucleótidos en el océano. Este objetivo se desarrolla en el **Capítulo 4**.
4. A la vista de los resultados obtenidos en el objetivo 3, se llevó a cabo un estudio de laboratorio más detallado del efecto de la disponibilidad de alimento sobre el metabolismo respiratorio. Para ello, se monitorizó un cultivo del dinoflagelado marino *Oxyrrhis marina* durante un periodo

largo de inanición, durante el que se tomaron medidas de R_{O_2} , Φ y concentración intracelular de NAD y NADP. La hipótesis de este estudio, que se presenta en el **Capítulo 5**, es que los patrones de R_{O_2} y de concentración de NAD y NADP presentarán una fuerte correlación durante este periodo.

5. Como último objetivo, se examinó la capacidad de un modelo enzimático bisustrato, basado en la actividad del ETS, las constantes cinéticas y la concentración de sustratos, de predecir el R_{O_2} *in vivo* en diferentes organismos y bajo diferentes condiciones tróficas. Para ello, se estudió la influencia de la cantidad y la calidad del alimento en el metabolismo respiratorio de dos especies de zooplancton, el rotífero *Brachionus plicatilis* y el misidáceo *Leptomysis lingvura*. Este objetivo se aborda en el **Capítulo 6**.

II Material y métodos generales

II.1 Muestreo de plancton

Los organismos planctónicos de tamaño inferior a 100 μm (microplancton) fueron muestreados mediante la recogida de agua de mar con botellas Niskin mientras que el zooplancton de tamaño mayor a 100 μm (mesozooplancton) fue recolectado mediante las redes apropiadas en función de los objetivos de cada trabajo. Las medidas de oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y fluorescencia se obtuvieron mediante un CTD (SBE 911+, Seabird electronics) y sirvieron para caracterizar físico-químicamente las masas de agua donde se llevaron a cabo los muestreos. Además, se tomaron muestras de agua de mar a diferentes profundidades para determinar la concentración de clorofila *a* y poder calibrar los datos de fluorescencia medidos con el CTD. Estos análisis se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Yentsch y Menzel (1963) durante las campañas oceanográficas JASON-76 y MALASPINA 2010, y mediante el método espectrofotométrico descrito por Parsons et al. (1984) durante las campañas oceanográficas CAMVALEX y SUCCESSION.

Las muestras de microplancton presentadas en los *Capítulos 1 y 2* se obtuvieron utilizando dos técnicas diferentes. Los organismos de las aguas del afloramiento de Perú se recogieron mediante botellas Niskin individuales de 30 L, mientras que los del afloramiento de Benguela se tomaron mediante 24

botellas Niskin de 10 L acopladas a una roseta. En ambos casos, se filtró un volumen variable de agua a través de filtros GF/F, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para el posterior análisis en el laboratorio de las actividades enzimáticas y el contenido proteico. El volumen de filtración dependió de la densidad de organismos en el agua, de modo que se buscó un equilibrio entre el volumen necesario para detectar señal en los análisis y el que requería un menor tiempo de filtración para evitar la degradación de los organismos en el filtro.

Las muestras de mesozooplankton para los estudios fisiológicos llevados a cabo en el *Capítulos 3* se tomaron mediante una red WP-2 estándar (UNESCO, 1968), provista de un colector de gran capacidad. La luz de malla de la red fue de $100\text{ }\mu\text{m}$, excepto en los experimentos realizados durante la campaña oceanográfica SUCCESSION, en los que fue de $200\text{ }\mu\text{m}$. Durante la maniobra de pesca, la red se bajó verticalmente hasta la profundidad de muestreo, generalmente 200 m , y se izó verticalmente a una velocidad constante de entre $0.2\text{ - }0.3\text{ m s}^{-1}$, siguiendo las recomendaciones de Sameoto et al. (2000) para la realización de estudios fisiológicos en organismos vivos. Una vez en la superficie, el contenido del colector se pasó por un sistema de tamices con el fin de obtener las clases de talla $100\text{ - }500\text{ }\mu\text{m}$, $500\text{ - }1000\text{ }\mu\text{m}$ y $> 1000\text{ }\mu\text{m}$. Posteriormente, cada tamiz se vertió con cuidado en un recipiente plástico con agua de mar filtrada previamente por $0.2\text{ }\mu\text{m}$. Tras esperar unos minutos para disminuir el stress post-captura, se eligieron los organismos sanos de una de las tallas y se introdujeron en las botellas donde se realizaron las incubaciones. El resto de organismos se mantuvo en oscuridad y a una temperatura próxima a la temperatura *in situ* hasta su posterior análisis.

Una segunda técnica de muestreo de mesozooplankton fue la utilizada en la campaña oceanográfica SUCCESSION, donde las muestras destinadas a la determinación de los flujos de carbono (*Capítulo 3*) se tomaron mediante una red MultiNet (Hydrobios GmbH, Kiel, Alemania). Esta red consta de un marco cuadrado con un área de 0.25 m^2 que lleva acopladas seis mallas, tres de ellas con una luz de malla de $100\text{ }\mu\text{m}$ y las otras tres con una luz de malla de $500\text{ }\mu\text{m}$. Se eligió esta configuración de mallas para aumentar la eficiencia de captura de la red y facilitar el fraccionado de las muestras. Al final de cada malla se acopló un colector que presentaba una abertura cubierta por una malla de $100\text{ }\mu\text{m}$ con el fin de evacuar el agua y evitar el reflujo de agua dentro de la red. Durante el muestreo, la red se bajó hasta la profundidad máxima desea-

da y posteriormente se izó a una velocidad constante. Cada uno de los pares de mallas recogió muestras de organismos en un rango de profundidades. El volumen de agua filtrado por la red se estimó mediante dos flujómetros, uno de ellos situado en la parte interna del marco mientras que el otro se colocó en la parte externa. Una vez finalizada la pesca, en superficie, se lavaron las mallas para recoger todos los organismos en los colectores, y su contenido se hizo pasar por diferentes tamices, consiguiéndose las fracciones 100 - 200 μm , 200 - 500 μm , 500 - 1000 μm y > 1000 μm . Estos organismos se transfirieron a crioviales y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), para finalmente ser almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el posterior análisis en el laboratorio de la biomasa y de las actividades enzimáticas.

II.2 Muestreo con trampas de sedimento

La sedimentación de partículas en las aguas del afloramiento de Benguela (*Capítulo 3*) se estudió mediante dos trampas de sedimento automáticas del tipo Kiel Multitrap K/MT, que se colocaron a 50 m por encima del fondo marino. Estas trampas se caracterizaron por tener un área de muestreo de 0.5 m y 21 vasos colectores que se configuraron para recoger muestras cada 24 h. Los recipientes de muestreo contenían una solución de salmuera al 70 ‰ para evitar el lavado y formaldehído al 2 % para preservar el material recogido. Después de recoger las trampas, las muestras se fraccionaron en varias alícuotas que se filtraron y recogieron en filtros de fibra de vidrio GF/F para el posterior análisis del contenido de carbono y nitrógeno particulado. En estas muestras se analizó además la composición isotópica de carbono y nitrógeno mediante un autoanalizador Carlo Erba/Fisons 1108 acoplado a un espectrómetro de masas Finnigan Mat Delta S. El contenido de sílice biogénico particulado se determinó de acuerdo con von Bodungen et al. (1991) mientras la metodología utilizada para cuantificar el fósforo total particulado fue la propuesta por Grasshoff (1976). Por otro lado, otra alícuota de las muestras se examinó bajo el microscopio para, en la medida de lo posible, identificar los organismos presentes hasta el nivel de especie. Una última fracción de la muestra se analizó mediante un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 400) acoplado a un analizador de dispersión de rayos X (EDX), que permitió identificar y cuantificar los minerales presentes en las muestras.

II.3 Cultivo de organismos en el laboratorio

En los *Capítulos 5 y 6* se estudió el comportamiento del metabolismo respiratorio de varios organismos marinos en respuesta a diversos factores tróficos. A continuación se detallan las condiciones de cultivo de cada especie.

(i) **Microalgas.** El alga criptofita *Rhodomonas salina* (ESD 6.3 - 6.5 μm) fue obtenida de la colección de cultivos de microalgas del Instituto de Ciencias Marinas de Barcelona (ICM-CSIC, España). Una vez en nuestro laboratorio, se cultivó en medio f/2 (Guillard, 1975) preparado con agua de mar (38 PSU) autoclavada y filtrada por 0.2 μm . Estos cultivos se mantuvieron en crecimiento exponencial a una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y bajo unas condiciones de iluminación de $31.5\text{ }\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de intensidad y un ciclo de día: noche de 12:12 h. Este alga se utilizó como alimento para el estudio del metabolismo del dinoflagelado *Oxyrrhis marina* (*Capítulo 5*).

Otra especie de microalga cultivada en el laboratorio fue *Nannochloropsis* sp. (ESD 2 - 3 μm), cuya cepa inicial fue suministrada por el grupo de Acuicultura de la ULPGC. Al igual que *R. salina*, se cultivó en agua de mar filtrada y enriquecida con medio f/2 (Guillard, 1975). Sin embargo, las condiciones de temperatura e iluminación fueron ligeramente superiores, siendo de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $31.5\text{ }\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, respectivamente. Además, en este caso el ciclo día: noche fue de 16:8 h. Este alga es rica en ácidos grasos poliinsaturados y constituyó uno de los alimentos suministrados a los rotíferos en los experimentos presentados en el *Capítulo 6*.

(ii) ***Oxyrrhis marina*.** Este dinoflagelado heterótrofo (ESD 16 μm) se obtuvo del Instituto de Ciencias Marinas de Barcelona (ICM-CSIC, España), junto con la cepa de *R. salina*. Las condiciones de cultivo fueron similares a las del alga, con una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una salinidad del agua de mar filtrada de 38 PSU. Sin embargo, los cultivos de *O. marina* se expusieron a una intensidad de luz inferior, de aproximadamente $0.8\text{ }\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Asimismo, estos organismos se mantuvieron en la fase exponencial de crecimiento mediante cambios periódicos del medio de cultivo.

(iii) ***Brachionus plicatilis*.** Al igual que *Nannochloropsis* sp., este rotífero fue suministrado por el grupo de Acuicultura de la ULPGC. Su cultivo se llevó a cabo en tanques de plástico que contenían 20 L de agua de mar filtrada por

0.2 μm y diluida hasta 23 PSU. Se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y con una aireación moderada para asegurar condiciones de saturación de oxígeno en el cultivo. En función del tratamiento correspondiente (*Capítulo 6*), los rotíferos de uno de los tanques se alimentaron con *Nannochloropsis* sp. a razón de 1.2×10^5 células rotífero⁻¹ día⁻¹, mientras que a los organismos de otro de los tanques se les suministró levadura seca en tomas de 0.8 g rotífero⁻¹ día⁻¹. En ambos tanques, se alcanzaron unas densidades de aproximadamente 200 rotíferos mL⁻¹ gracias a un aporte continuo de alimento mediante una bomba peristáltica. No obstante, para evitar un aumento de la concentración de NH₄⁺ por encima de 0.1 mg L⁻¹, se realizaron cambios de entre un tercio o un cuarto del volumen total de agua diariamente, así como un sifonado minucioso del fondo del tanque para retirar la materia orgánica muerta. Además, los organismos se examinaron periódicamente bajo la lupa con el fin de comprobar la evolución del cultivo. De esta forma, se utilizó el porcentaje de hembras con huevos como índice del buen estado del mismo.

(iv) *Leptomysis lingvura*. Los misidáceos se obtuvieron mediante inmersiones de buceo en la costa de Risco Verde, en el sudeste de Gran Canaria. Se recolectaron a una profundidad de entre 8 a 12 m, sobre los fondos arenosos de la zona. Para ello, se utilizó una red de mano con una luz de malla de 500 μm y unos contenedores plásticos para almacenar los organismos, provistos de la misma malla en la tapa para permitir el intercambio de agua durante el muestreo. Posteriormente, se transfirieron a las instalaciones del laboratorio donde se eligieron los individuos de la especie *L. lingvura* del total de la muestra para realizar los experimentos ya que su tasa de supervivencia en cultivo es mayor (Herrera et al., 2011). El sistema de acuarios estaba constituido por 12 acuarios de vidrio con una capacidad de 40 L cada uno, que estaban conectados entre sí. De esta forma, un volumen de agua de mar tan grande (~ 480 L) junto con una filtración mecánica y biológica, permitió mantener los niveles de NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻ por debajo de los niveles recomendados por Lussier et al. (1988) de 0.1, 0.02 y 0.2 mg L⁻¹, respectivamente. La temperatura de cultivo se mantuvo próxima a la temperatura in situ (18 °C) mediante un enfriador de agua. Para llevar a cabo los experimentos del *Capítulo 6*, estos organismos fueron sometidos a dos dietas diferentes. A un grupo de misidáceos se les suministró un alimento rico en ácidos grasos que consistió en nauplios de *Artemia* sp. de 48 h, enriquecidos previamente con Selco Easy-DHA (INVE, Bélgica). Otros

individuos, en cambio, fueron alimentados con rotíferos cultivados con levadura, de manera que su contenido lipídico fue considerablemente menor. La dosis diaria de alimento fue de 100 Artemias por misidáceo y 400 rotíferos por misidáceo, de acuerdo a las recomendaciones de Domingues et al. (2001).

II.4 Medida de la respiración mediante incubaciones

El método de las incubaciones en botella ha sido tradicionalmente utilizado para medir el consumo de O_2 respiratorio en los organismos marinos. En la presente tesis, este tipo de medidas se han realizado en el zooplankton recolectado en el medio marino (*Capítulo 4*) así como en los organismos cultivados en el laboratorio (*Capítulos 5 y 6*). En todos los casos, los organismos se transfirieron delicadamente a unas botellas winkler de 60 mL que posteriormente se colocaron en una cámara de metacrilato. Ésta, a su vez, estaba conectada con un baño termostático, de manera que la recirculación de agua en su interior permitió mantener la temperatura estable durante las medidas. En cada serie de incubaciones, al menos una de las botellas fue rellena únicamente con agua de mar filtrada para actuar como control. Una vez colocados los electrodos tapando cada botella, el sistema se oscureció para evitar que otros procesos biológicos pudieran interferir en las medidas y el consumo de O_2 se monitorizó mediante un sistema de electrodos de 6 canales (modelo 928 Strathkelvin Oxygen System[®]). El tiempo de incubación varió entre 60 y 120 min, en función de la densidad de organismos dentro de las botellas. De esta forma, la tasa de consumo de O_2 se determinó como el cambio en la concentración de O_2 disuelto durante el tiempo de incubación. Estos valores fueron corregidos por los valores obtenidos en las botellas control. Al finalizar cada serie de incubaciones, los organismos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior estudio de la actividad ETS y la determinación de las concentraciones de proteína, piridín nucleótidos y nucleótidos de adenina, en función del experimento correspondiente.

Antes de realizar las medidas, los electrodos de O_2 se calibraron de acuerdo al manual suministrado por Strathkelvin. Así, la concentración de cero de O_2 se obtuvo en agua tratada previamente con Na_2SO_4 mientras que la concentración máxima se obtuvo en agua saturada de O_2 . Esta calibración fue repetida periódicamente durante los experimentos.

II.5 Análisis de la actividad del sistema de transporte de electrones y de sus constantes cinéticas

En general, la actividad ETS a lo largo de esta tesis se analizó cinéticamente de acuerdo a las modificaciones introducidas por Packard et al. (1996) del método original descrito por Packard et al. (1971). Una excepción fueron las medidas realizadas en las aguas de Perú (*Capítulos 2*) donde se utilizó el método del punto final. En ambos casos, el análisis esta basado en añadir concentraciones de los sustratos NADH y NADPH a saturación (1.7 mM y 0.25 mM, respectivamente), de manera que se obtiene la velocidad máxima ($V_{\max}$) a la que estos enzimas pueden reaccionar. El NADH y el NADPH constituyen los principales donantes de electrones del ETS. Como aceptor final de electrones, el O_2 es sustituido por un aceptor artificial, el INT (cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil monotetrazolio), que al reducirse produce INT-formazan.

El primer paso de los análisis consistió en la homogenización de las muestras. Ésta fue mecánica en el caso de los organismos recogidos con los filtros GF/F, mientras que en el zooplancton se realizó mediante la sonicación. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la pérdida de actividad. Los extractos se centrifugaron durante 8 min a 4000 rpm y 0 °C, y el sobrenadante se reservó para su análisis. Inmediatamente antes de comenzar las medidas en el espectrofotómetro, se mezcló el extracto con el tampón de reacción y una solución de INT (4 mM) en una proporción de 1:3:1, respectivamente. El tampón de reacción consistió en tampón fosfato con la concentración correspondiente de NADH y NADPH. Asimismo, se realizó un blanco de cada muestra con tampón fosfato sin sustratos, con el fin de cuantificar la reducción no enzimática del INT y corregir las medidas (Maldonado et al., 2012). En los análisis cinéticos, se monitorizó continuamente la producción de INT-formazan a una λ de 490 nm durante 6 minutos. En el método del punto final, en cambio, se tomaron dos medidas de absorbancia a la misma λ , una al comienzo de la reacción y otra después de 20 min, y se calculó la diferencia entre las dos. En ambos métodos, se utilizó la pendiente de la línea de regresión entre la absorbancia y el tiempo para estimar la actividad ETS y la respiración potencial (Φ) de acuerdo a Packard y Williams (1981). Así, debido a que el INT acepta dos electrones mientras que el O_2 acepta cuatro, la producción de INT-formazan se relacionó con la actividad ETS y con Φ mediante un factor de 2 y 0.5, respectivamente. Todos los análisis se llevaron a cabo en condiciones controladas de temperatura, mediante la utilización de

un baño termostático. No obstante, en las muestras oceanográficas, se aplicó la ecuación de Arrhenius para corregir los valores por la temperatura *in situ* (Packard et al., 1975).

En el *Capítulo 6* se determinaron las constantes cinéticas del ETS. Para ello, en determinadas muestras, se midió la actividad ETS a 6 concentraciones diferentes de NADH y NADPH, de manera que se obtuvo una matriz de datos de 6×6 . La concentración más alta en ambos casos correspondió a la del ensayo normal (saturación), y se realizaron diluciones seriadas hasta una última combinación donde el nucleótido correspondiente no fue añadido. Para comprobar si las constantes cinéticas permanecieron estables durante el periodo de inanición, se realizaron varias medidas en cada organismo al comienzo del experimento y al final de dicho periodo. Los datos fueron linearizados siguiendo la transformación doble recíproca de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934). Con estos valores, se construyeron los diagramas primarios de NADH ($1/v$ versus $1/[NADH]$) y de NADPH ($1/v$ versus $1/[NADPH]$). La pendiente de cada línea de regresión estuvo definida por $(K_{mA} + K_{iaA}K_{mB}/[B])/V$, mientras que el intercepto en la ordenada representó $(1 + K_{mB}/[B])/V$. En ambas fórmulas, *A* y *B* correspondieron con el sustrato principal y el cosustrato, respectivamente. Las constantes de Michaelis (K_m) y de disociación (K_{ia}) para cada sustrato se determinaron a partir de los diagramas secundarios obtenidos al graficar los inversos de las concentraciones de los cosustratos frente a los interceptos en las ordenadas y a las pendientes de sus respectivas líneas en el diagrama primario (Bisswanger, 2008). El sustrato principal considerado en cada caso fue cambiado con el fin de obtener los valores de K_{ia} para el NADH y el NADPH. La Fig. 6.2 muestra el ejemplo de construcción de los diagramas primarios y secundarios para el NADH.

II.6 Determinación de la concentración de proteína, piridín nucleótidos y nucleótidos de adenina

La concentración de estos compuestos se infirió a partir de curvas standard realizadas con los reactivos puros correspondientes en cada análisis.

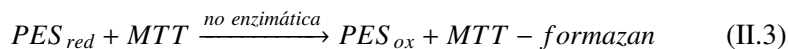
(i) **Proteínas.** El contenido proteico de los organismos utilizados en cada trabajo de esta tesis se determinó mediante la metodología propuesta por Lowry (1951) y de acuerdo a las modificaciones introducidas por Rutter (1967). Las concentraciones de proteína en las muestras se determinaron a partir de

curvas estándar realizadas con albúmina de suero bovino (BSA).

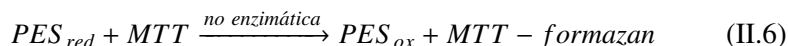
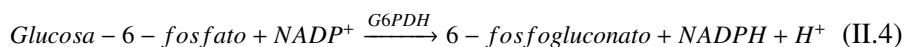
(ii) Piridín nucleótidos. Los piridín nucleótidos cuantificados en los *Capítulos 5 a 7* fueron nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), tanto en sus formas oxidadas como reducidas. La metodología aplicada para ello fue la descrita por Wagner y Scott (1994) para células de la sangre, de manera que fue necesario realizar determinadas modificaciones para adaptarla a los organismos marinos. El principal cambio consistió en una homogenización de las muestras mediante sonicación, y una centrifugación posterior de 8 min a 4000 rpm y 0 °C. La fracción analizada fue el sobrenadante, mientras que el sedimento fue desechado. Esta técnica esta basada en un procedimiento de extracción único que diferencia entre las formas oxidadas y reducidas de los nucleótidos mediante la aplicación de calor. Así, una incubación del extracto durante 30 min a 60 °C destruyó las formas oxidadas pero no tuvo ningún efecto sobre las formas reducidas. Por lo tanto, el contenido total de piridín nucleótidos fue cuantificado en el extracto sin calentar mientras que las formas reducidas fueron determinadas en el extracto incubado; la diferencia entre ambos valores indicó la concentración de las formas oxidadas. Por otro lado, las formas fosforiladas y las no fosforiladas de los nucleótidos se diferenciaron mediante el tampón de reacción involucrado en cada caso.

La determinación de NAD(H) se llevó a cabo con 100 µL del extracto calentado o sin calentar que se añadieron a 800 µL de tampón de reacción para el NAD y se incubo a 37 °C durante 5 min en oscuridad. Este buffer contenía tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0), 0.5 mM de azul de tiazolil (MTT), 1 mM de etosulfato de fenazina (PES), 0.2 mg mL⁻¹ de alcohol deshidrogenasa (ADH) y 1 % de albúmina de suero bovino. Una vez finalizó la incubación, se inició la reacción tras añadir 100 µL de etanol. Antes de medir la producción de MTT-formazan en el espectrofotómetro, se realizó una corta centrifugación (16000 g, 30 s) para eliminar el material soluble que se pudiera haber formado en la mezcla. Posteriormente, se midió el cambio en la absorbancia a 570 nm durante 3 min a 37 °C. Las reacciones seriadas que tuvieron lugar en el ensayo fueron las siguientes:





El NADP(H) se determinó igualmente con 100 μL del extracto calentado o sin calentar y 800 μL de tampón de reacción para el NADP. Este tampón fue preparado con tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0), 0.5 mM de azul de tiazolil (MTT), 2 mM de etosulfato de fenazina (PES), 5 mM de Na_4EDTA y 1.3 IU mL^{-1} de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Tras una incubación de 5 min a 37 °C se añadieron 100 μL de glucosa-6-fostato (G6P, 10 mM) para comenzar la reacción. En este caso, no fue necesario realizar ninguna centrifugación corta ya que no se formó material insoluble. Al igual que en el NAD, se monitorizó la reacción durante 3 min a 37 °C. Las reacciones seriadas que tuvieron lugar en el tampón de reacción fueron las siguientes:



La pendiente de producción de MTT-formazan fue utilizada para cuantificar la cantidad de piridín nucleótidos presente en cada muestra. Para ello, se realizaron soluciones standard de NADH y NADPH de concentraciones que variaron entre 0 y 1000 nM y se analizaron como se ha descrito anteriormente. La curva standard se obtuvo al enfrentar estas pendientes con las correspondientes concentraciones.

(iii) Nucleótidos de adenina. Tanto el adenosín difosfato (ADP) como el adenosín trifosfato (ATP) fueron determinados mediante un sistema cromatográfico del modelo Varian Prostar (Varian Inc, España), que consistió en una bomba, un autoanalizador, un módulo de columna de válvula con un horno interno y un detector de fotodiodos en serie midiendo a 254 nm. Ambos metabolitos se separaron en una columna PRP-1 (5 μm , 2.1 $\times$ 150 mm) (Hamilton, EEUU) a 50 °C. La fase móvil A estuvo compuesta por 100 mM KH_2PO_4 (pH

7.0), 1mM tetrabutilamonio fosfato y 2.5 % de metanol, mientras que la fase móvil *B* se preparó con el eluyente *A* y 20 % de metanol. La elución se llevó a cabo siguiendo un gradiente que se inició con un 1 % de la fase móvil *B* durante los primeros 3 min y, posteriormente, aumentó al 15 % en 10 min, al 55 % en 15 min, al 95 % en 16 min y al 99 % en 20 min. A los 25 min, el gradiente volvió al 1 % de la fase móvil *B* y se mantuvo 5 min para equilibrar la columna para la siguiente inyección. El flujo se estableció en 0.3 mL min^{-1} , mientras que el volumen de inyección fue de 10 μL . Con el fin de estimar la concentración de cada nucleótido en las muestras, se realizaron curvas estándar en el rango de 0.01 - 50 μM que presentaron coeficientes de correlación iguales o superiores a 0.992 en todos los casos. Los límites de cuantificación del ensayo se determinaron como la concentración a la que la relación señal ruido fue mayor o igual a 10, y fueron de 0.002 μM para el ADP y de 0.0005 μM para el ATP. Por otro lado, para evaluar la precisión de las medidas, estimada como la desviación estándar relativa (% RSD), se analizaron 6 réplicas a dos niveles de concentración (0.1 y 10 μM), obteniéndose unos valores de repetibilidad por debajo del 9 % en ambos casos.

III Principales resultados y discusión

III.1 Respiración planctónica en el afloramiento de Perú: cálculos de flujo de carbono, de la eficiencia en la retención de nutrientes y de la producción heterotrófica de energía (*Capítulo 2*)

En el presente trabajo, las medidas de la actividad del ETS en el microplankton se utilizaron para obtener secciones perpendiculares a la línea de costa de la producción respiratoria de CO_2 (R_{CO_2}), de los flujos de carbono (F_C) así como de la eficiencia en la retención de nutrientes (NRE) y de la producción heterotrófica de energía (HEP) en las aguas del afloramiento de Perú.

En primer lugar, se determinó la respiración potencial (Φ) y el consumo respiratorio de O_2 (R_{O_2}) a partir del conjunto de datos del ETS de acuerdo a Packard y Christensen (2004) y Packard y Codispoti (2007). La relación R_{O_2}/Φ utilizada fue de 0.26. Posteriormente, estos valores se convirtieron en unidades de carbono para obtener el R_{CO_2} (Tablas 2.2 y 2.3). En las aguas óxicas, el R_{CO_2} fue calculado a partir de los valores de R_{O_2} mediante una relación de Redfield (C/O_2), revisada por Takahashi et al. (1985), de 0.71. En las aguas anóxicas donde la respiración utilizó óxidos de nitrógeno como aceptores de

electrones en vez de O_2 (Tabla 2.3), los cálculos fueron diferentes. Primero, se estimó la tasa de producción de nitrógeno durante el proceso de desnitrificación (R_{N_2}), que fue medida igualmente a través del análisis de la actividad del ETS (Codispoti et al., 2001; Codispoti y Packard, 1980). Posteriormente, se utilizó la relación de Redfield (C/N_2) para el carbono producido (en forma de CO_2) durante la desnitrificación de NO_3^- (Gruber y Sarmiento, 1997). De esta forma, la ecuación general fue: $R_{CO_2} = [106/60 \text{ mol C (mol } N_2)^{-1} \times \text{ETS activity (mol } e^- \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3})] / [105 \text{ mol } e^- (\text{mol } N_2)^{-1}]$.

A partir de estos valores de R_{CO_2} se determinaron los F_C para cada estación. Para ello, se ajustaron modelos potenciales a los perfiles de R_{CO_2} (Tabla 2.4), que previamente se normalizaron por la profundidad donde la R_{CO_2} fue máxima (z_m). Estos modelos se representaron mediante la ecuación $R = R_m (z/z_m)^b$, donde R_m indicó la R_{CO_2} máxima y b la máxima curvatura del perfil de respiración. Conceptualmente, la R_{CO_2} planctónica dentro de un hipotético cubo de agua de mar equivale a la diferencia entre el F_C que entra en ese cubo por la parte superior y el F_C que sale por la parte inferior. Aplicando este modelo conceptual y asumiendo que el transporte lateral y la sedimentación de carbono eran mínimos en comparación con el flujo gravitacional, el F_C se calculó integrando los modelos de R_{CO_2} desde una profundidad dada hasta el fondo oceánico de acuerdo a las Eq. III.1 y III.2.

$$F_{f-s} = \int_{z_f}^{z_s} R_{CO_2} dz = \int_{z_f}^{z_s} R_m (z/z_m)^b dz \quad (\text{III.1})$$

$$F_{f-s} = \{R_m / [(b+1) z_m^b]\} (z_s^{b+1} - z_f^{b+1}) \quad (\text{III.2})$$

donde z_f indicó cualquier profundidad entre la parte superior de la columna de agua y el fondo oceánico ($z_t \leq z_f \leq z_s$). Al resolver estos cálculos para diferentes profundidades, siempre por debajo de la E_z , y al representarlos gráficamente frente a las profundidades correspondientes, se obtuvieron los modelos de F_C .

A partir de estos cálculos, se determinó la NRE de esas mismas aguas debida a los procesos de remineralización llevados a cabo por el microplancton. La NRE se define como el porcentaje del flujo de carbono que entra en una capa de agua que es consumido por la respiración en esa misma capa ($(R \times \Delta z)/F_C$). Esta medida, a su vez, está relacionada inversamente con la eficiencia de transferencia (T_{eff}) descrita por Buesseler et al. (2007b), que se calcula como el porcentaje de flujo de carbono medido a 150 m que llega a 500m (100

$\times F_{C_{500}}/F_{C_{150}}).$

Por último, se estimó la HEP por parte de estos organismos, en base a la relación entre la actividad del ETS respiratorio y la fosforilación oxidativa heterotrófica. Así, a partir de los datos de R_{O_2} y R_{N_2} se obtuvieron los valores presentados en la Tabla 2.7. En las aguas óxicas $HEP = 2 \times 2.5 \times 48 \times R_{O_2}$, donde 2 representa el número de pares de electrones necesario para reducir O_2 a $2H_2O$, 2.5 indica la relación $ATP/2e^-$ (Ferguson, 2010) y 48 es el ΔG en J por mmol de ATP (Alberty and Goldberg, 1992; Moran et al., 2012). En el caso de la respiración anóxica, $HEP = 5 \times 1.0 \times 48 \times R_{N_2}$, donde 5 es el número de pares de electrones necesario para reducir NO_3^- a N_2 , 1.0 es la relación $ATP/2e^-$ (van Loosdrecht et al., 1997; Smolders et al., 1994), y 48 indica el ΔG como se ha mencionado anteriormente.

La toma de muestras se llevó a cabo a bordo del B/O *Eastward* durante la campaña oceanográfica CUEA-JOINT II, cuyos estudios se centraron en la Línea-C que se extendía desde la posición costera C1 hasta la posición C14 en mar abierto, a 185 km de la costa (Fig. 2.1a). Durante este periodo, las propiedades oceanográficas de las masas de agua evidenciaron un afloramiento clásico (Packard et al., 1986; Rykaczewski and Checkley, 2008; Smith, 1968). Así, tanto la densidad del agua (σ_t) como la concentración de NO_3^- aumentaron hacia la superficie en la zona cercana a costa (Fig. 2.1b), desde unos valores de 26.0 y 12 μM hasta 26.1 y 16 μM , respectivamente. A medida que estas aguas ricas en nutrientes ascendían, fertilizaron las aguas superficiales del centro del afloramiento (C3, Brink et al., 1981; MacIsaac et al., 1985), y se desplazaron hacia mar abierto hasta las posiciones C5 y C8, donde el fitoplancton presentó su máximo crecimiento con valores de 7 $mg\ m^{-3}$ clorofila *a* y 18 $mg\ C\ h^{-1}\ m^{-3}$ de productividad primaria (Tabla 2.1 y Fig. 2.1b). De igual forma, la dinámica de este proceso quedó reflejada en la variabilidad de la profundidad de la zona eufótica (E_z). Ésta fluctuó desde 21 m en la C5, coincidiendo con los valores máximos de biomasa y metabolismo, hasta 43 m en la C14, la posición más oceánica (Tabla 2.1). La mayor variabilidad temporal fue registrada en el borde de la plataforma continental (C12), donde la E_z disminuyó desde 40 m a 21 m en una semana. Por el contrario, la menor variabilidad temporal tuvo lugar en la posición C8, donde la E_z se mantuvo estable en 29 m durante 6 días (Tabla 2.1). En general, una E_z más superficial estuvo causada por una mayor biomasa de fitoplancton que, a su vez, indicaba un alto potencial de metabolismo, mientras que las condiciones opuestas se asociaron con una E_z más profunda.

El R_{O_2} presentó una variación superficial de casi 6 veces, aumentando desde los $24.1 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ medidos en el centro del afloramiento hasta los $144.7 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ registrados en la posición C12 al borde de la plataforma, a 93 km de la costa (Tabla 2.1). Por otro lado, el R_{O_2} mostró una variabilidad temporal tanto en las aguas costeras como oceánicas (Tabla 2.3). En el periodo de una semana, el R_{O_2} aumentó de $24.1 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a $84.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en la posición C3 (estaciones 15 y 21), mientras que en la posición C12 (estaciones 17 y 35) aumentó de $47.1 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ a $144.7 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Tabla 2.2). La alta R_{O_2} registrada en la estación 35 coincidió con la floración de las diatomeas *Chaetoceros compressus* y *Ch. lorenzianus*. Así mismo, en estas posiciones C3 y C12, se observaron incrementos similares en la concentración de clorofila y en la productividad primaria neta (Tabla 2.1), sugiriendo que el aumento en el R_{O_2} en estas zonas fue debido principalmente al fitoplancton. Por debajo de la superficie, el R_{O_2} aumentó hasta un máximo subsuperficial dentro de la E_z y posteriormente descendió drásticamente con la profundidad (Tablas 2.2 y 2.3).

Por otro lado, el R_{CO_2} (Fig. 2.2a) fluctuó en la E_z desde $0.4 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el centro del afloramiento (C3, estación 15) hasta $3 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en el borde de la plataforma (C5, estación 20). Los valores epipelágicos más bajos de R_{CO_2} (Tabla 2.5) coincidieron con los obtenidos en un afloramiento asociado a un remolino estudiado en el mar de China Meridional (Jiao et al., 2014). En la zona de mínimo de oxígeno (OMZ) donde se dio la desnitrificación, el R_{CO_2} se encontró en el rango micromolar, variando de los $4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ medidos en la posición C5 (estación 37) hasta los $133 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ presentes en el centro del afloramiento (C3, estación 21). En las aguas mesopelágicas, por debajo de los 500 m (Tabla 2.5), el R_{CO_2} en la posición C8 incrementó de 0.4 a $6.1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en una semana. En el resto de estaciones, los valores variaron dentro de este rango. En la zona batipelágica, el R_{CO_2} varió desde un mínimo de $0.3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en la posición sobre la fosa (C10) hasta un máximo de $3.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en la C8 sobre la plataforma continental (Tabla 2.5). La suma del R_{CO_2} consumido en el bentos y el carbono enterrado en los sedimentos (Tabla 2.5 and Fig. 2.3a) fluctuó, a su vez, desde un máximo de $90 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ medido en el centro del afloramiento (posición C3) hasta un mínimo de $0.09 \text{ mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ registrado en la C10, donde la profundidad de la columna de agua era de 4300 m. La sección de R_{CO_2} en la Fig. 2.2a muestra la magnitud de la respiración y la

remineralización asociada a ella en los primeros 50 m de la columna de agua, así como un filamento de alta respiración descendiendo a mayor profundidad en la posición C8 a 50 km de la costa.

La Fig. 2.2b presenta el F_C que mantenía la respiración del microplancton en la columna de agua. Los valores de F_C medidos a 150 m, variaron entre 3 y 6 mmol CO₂ m⁻³ d⁻¹ desde la C8 hacia mar abierto (Tabla 2.6), concordando con el rango de valores descritos recientemente por Jiao et al. (2014) a 100 m de 2.5 a 6.2 mmol CO₂ m⁻³ d⁻¹. Como era de esperar con unos valores de F_C muy altos, incluso a 1000 m, la T_{eff} en la posición C8 fue alta (82 %) mientras que la NRE fue baja (18 %, Tabla 2.6, Fig. 2.3b). Sorprendentemente, a pesar del descenso en la columna de agua del F_C en la posición C8 entre el 17 y el 23 de septiembre, la T_{eff} se redujo por un factor inferior a 2, hasta el 45 % (Tabla 2.6). El impacto en la NRE, en cambio, fue mayor, aumentado 3 veces hasta el 55 %. En el resto de posiciones, la T_{eff} varió desde el 28 % en la C10 hasta el 47 % en la C14 (Fig. 2.3b). A parte de la variabilidad temporal en los F_C descrita previamente, la Fig. 2.2b muestra la variabilidad espacial a mesoescala. Este transecto refleja un máximo a través de la columna de agua a 50 km de la costa, en la posición situada sobre el comienzo del talúd (C8). Como evidencian la Tabla 2.5 y la Fig. 2.3a, la respiración bentónica y el carbono enterrado fueron asimismo altos en esta posición. La Fig. 2.3a destaca además la importancia de la curvatura máxima de los perfiles de respiración. Según $|b|$ aumentó hacia 2, la NRE aumentó hasta el 70 % y la $T_{\text{eff}150-500}$ disminuyó hasta el 30 %.

Considerando que el R_{CO_2} filtra el carbono orgánico particulado (POC) lábil que sedimenta hacia el fondo oceánico, se esperaba encontrar una relación inversa entre el R_{CO_2} y la suma de la respiración bentónica y el carbono enterrado. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos en la posición C8, se deduce que la relación entre ambas variables es más compleja (Figs. 2.2a and 2.3a). A pesar de que en esta posición se midieron las mayores tasas de R_{CO_2} (Tabla 2.5), no se encontraron los valores más bajos de respiración bentónica y el carbono enterrado (Fig. 2.3a). De hecho, a partir de la diferencia entre integrar la Eq. III.1 hasta infinito y hasta el fondo oceánico, se calcularon unos niveles altos de respiración bentónica y el carbono enterrado (Fig. 2.3a). Los valores mínimos de NRE medidos en esta posición (Fig. 2.2c) fueron la explicación a esta discrepancia. Así, el transporte de POC lábil hacia el fondo marino no depende exclusivamente del F_C sino de la relación entre la respira-

ción en la columna de agua y el propio F_C (Fig. 2.2b). Los estudios recientes llevados a cabo sobre preservación de carbono orgánico en la parte superior de la plataforma continental de Perú (Dale et al., 2015), apoyan las altas tasas de sedimentación registradas en el presente trabajo (Fig. 2.3a). Dale et al. (2015) encontraron unas tasas altas de sedimentación entre los 200 m y 400 m, y las atribuyeron a la anoxia presente en esas aguas. Una sección de T_{eff} en la Línea-C hubiera revelado un máximo en la posición C8, tal y como se deduce de la Fig. 2.3b.

La HEP en la E_z sobre la plataforma continental (Fig. 2.2d y Tabla 2.7) fluctuó desde el valor máximo de $555 \text{ J d}^{-1} \text{ m}^{-3}$ medido en la C5 (estación 20), coincidiendo con el máximo de respiración, hasta el mínimo de $69 \text{ J d}^{-1} \text{ m}^{-3}$ registrado en el límite de la E_z en la C3 (estación 21). Sobre el talud continental presentó una ligera disminución, para posteriormente volver a aumentar hasta un valor de $880 \text{ J d}^{-1} \text{ m}^{-3}$ sobre la fosa continental (C12, Fig. 2.2d). En las posiciones más oceánicas alcanzó valores de $315 \text{ J d}^{-1} \text{ m}^{-3}$. En contraposición, como ejemplo de una baja HEP, se midieron valores de $0.02 \text{ J d}^{-1} \text{ m}^{-3}$ sobre la fosa a 4755 m de profundidad. En general, el rango de HEP debida al acople entre el ETS respiratorio y la fosforilación oxidativa abarcó 4 órdenes de magnitud en esta zona del afloramiento de Perú. Los valores máximos y mínimos de la HEP integrada en la zona epipelágica (0 - 150 m) fueron de $6.6 \times 10^{-3} \text{ MJ d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ y $0.39 \text{ MJ d}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (Tabla 2.7), respectivamente, con un promedio de $0.09 \text{ MJ d}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Este valor promedio constituyó únicamente un 0.7 % de la radiación solar media registrada en la superficie del agua a lo largo de la Línea-C entre el 12 y el 24 de septiembre de 1976 (Packard y Jones, 1976). Los valores de HEP presentados en este trabajo constituyen los primeros datos de producción biológica de energía determinados en el océano (Karl, 2014). Tanto la HEP como el R_{CO_2} presentaron una distribución temporal y espacial similar en el sistema de afloramiento de Perú (Figs. 2.2a y 2.2d). Así, la pequeña diferencia en la relación de $\text{ATP}/2e^-$ entre la fosforilación oxidativa y la tasa de transferencia de electrones en el metabolismo aerobio ($\text{ATP}/2e^- = 2.5$) y en la desnitrificación ($\text{ATP}/2e^- = 1.0$) tuvo un mínimo impacto. Al ritmo al que avanza el conocimiento sobre el proceso de anammox, pronto se podrá cuantificar la contribución de este proceso al total de la HEP. En cualquier caso, en las aguas anóxicas se produce menos ATP, por lo que los valores de HEP serán más bajos. En un futuro sería interesante estudiar estas diferencias en secciones de HEP realizadas en sectores óxicos y anóxicos de los sistemas

de afloramiento.

Tal y como se ha demostrado aquí, las medidas de ETS no sólo pueden utilizarse para calcular el F_C , NRE y HEP, sino que además permiten estimar la producción biológica de calor (Pamatmat et al., 1981), la edad y la velocidad del flujo de las aguas profundas (Packard, 1985b). En las aguas anóxicas, siempre que se conozca el contexto químico en el que se encuentran (Richards, 1965), las medidas de ETS proporcionan un índice de las tasas de desnitrificación (Codispoti y Packard, 1980; Dalsgarrrd et al., 2012; Packard, 1969wj), así como de producción de NO_2^- , óxido nitroso y sulfuro (Packard et al., 1983), e incluso de reducción de hierro y magnesio (Lane et al., 2010). Todas estas formas de metabolismo microbiano están controladas por el mismo ETS respiratorio básico, donde la enzima NADH deshidrogenasa (Complejo I) constituye el punto común de inicio.

III.2 Patrones temporales de flujo vertical de partículas en el norte de Benguela: comparación entre el flujo gravitacional de carbono orgánico particulado y el consumo respiratorio de carbono (Capítulo 3)

En este capítulo se estudió la variabilidad temporal de los flujos de carbono en dos estaciones sobre la plataforma continental del afloramiento de Namibia (20° S) mediante dos metodologías diferentes. Por un lado, se aplicó el modelo conceptual descrito en el *Capítulo 2*, que consiste en el cálculo de los flujos de carbono (F_C) integrando los perfiles verticales de producción de CO_2 a través de la respiración (R_{CO_2}). Por otro lado, se colocaron dos trampas de sedimento a 50 m por encima del fondo oceánico (Fig. 3.1, Tabla 3.1), configuradas con una frecuencia de muestreo de 24 h. De esta forma, se pudo comparar una metodología tradicional utilizada en la cuantificación de flujo gravitacional de carbono orgánico particulado (POC) con el método propuesto por nuestro grupo de investigación. Además, se aplicó este modelo en muestras de zooplankton recogidas en transectos perpendiculares a costa realizados durante la misma campaña abordo del B/O *Maria S. Merian*.

(i) Características hidrográficas. La variabilidad temporal de las propiedades hidrográficas medidas en las dos estaciones fue mayor que el efecto debido a la distancia a costa o al centro del afloramiento. En el trabajo publicado por Mohrholz et al. (2014) se evidencia la presencia de diferentes masas

de agua en la zona durante el muestreo, así como la influencia de filamentos de agua fría provenientes del sur. De esta forma, las estaciones NAM006R y NAM011D presentaron características hidrográficas similares entre si pero notablemente diferentes a las registradas en la NAM011R (Tabla 3.1). El agua superficial en las dos primeras estaciones se caracterizó por una temperatura y una salinidad bajas, y una alta concentración de O_2 . Además, no se observó una estratificación de la columna de agua y se midió un máximo superficial de clorofila de 12 mg m^{-3} y 17 mg m^{-3} en ambas estaciones. Por el contrario, la NAM011R mostró una mayor estratificación de la columna de agua, una mayor temperatura y salinidad, y una menor concentración de O_2 . La clorofila, en este caso, alcanzó un valor máximo de 0.78 mg m^{-3} a 50 m, siendo característico de una transición hacia un máximo profundo de clorofila en una situación oligotrófica (Pollehne et al., 1993a). Los tres perfiles en la columna de agua se realizaron al amanecer de manera que la zona eufótica (E_z), definida como la profundidad a la que llega el 1 % de la luz que incide en la superficie, se ajustó a 60 m de acuerdo a las medidas tomadas en las estaciones contiguas durante los transectos. En los cálculos de flujos de carbono realizados en el zooplankton recolectado durante estos transectos, se utilizó la E_z propia de cada estación.

(ii) Variabilidad temporal de la estructura de la comunidad y de la composición de las partículas que sedimentan. La Tabla 3.2 muestra el ejemplo del cálculo de la actividad del ETS, de la respiración potencial (Φ) y del consumo de O_2 (R_{O_2}) a partir de las tasas de producción de INT-formazan en el microplancton de la NAM011D. Como estas variables están relacionadas estequiométricamente por constantes, los cambios en la actividad ETS se relacionarán linealmente con los cambios en Φ y R_{O_2} . La Fig. 3.3 muestra los perfiles de R_{O_2} en las 3 estaciones. El perfil del microplancton se asemejó al perfil de clorofila en los 3 casos, aunque la correlación entre ésta y el R_{O_2} fue mayor en la NAM006R y la NAM011D que en la NAM011R, sugiriendo una mayor proporción de organismos no fotosintéticos en esta última estación. Los valores máximos de R_{O_2} en el microplancton se midieron en las aguas superficiales de las estaciones NAM006R y NAM011D, duplicando los encontrados en la estación NAM011R. En cuanto al zooplankton, los valores más altos fueron determinados en la talla de 200 - 500 μm en las estaciones NAM006R y NAM011D, mientras que en la NAM011R la respiración en la columna de

agua estuvo dominada por la talla de $> 1000 \mu\text{m}$. Las tallas $100 - 200 \mu\text{m}$ y $500 - 1000 \mu\text{m}$ tuvieron una contribución menor durante el muestreo de estas aguas.

Las tasas de producción de CO_2 (R_{CO_2}) se calcularon a partir de los valores de R_{O_2} de la Fig. 3.3 y la relación molar de Redfield (C/O_2) de 0.71 (Takahashi et al., 1985). Posteriormente, se obtuvieron los mejores ajustes para los perfiles de R_{CO_2} . La Fig. 3.4 muestra un ejemplo para el microplancton de la estación NAM006R, donde se determinó que los mejores ajustes fueron las funciones logarítmicas y potenciales. Se eligió esta última ya que representaba mejor los valores, a pesar de que las diferencias entre ambos ajustes no fueron significativas (ANOVA de 1 vía, $p = 0.653$). La Tabla 3.3 muestra los parámetros de las funciones potenciales aplicadas en cada caso. El R_{CO_2} total se refiere a la suma del R_{CO_2} modelado en el microplancton y en el zooplancton de cada estación. El F_C se determinó integrando este R_{CO_2} total desde la base de la E_z hasta el fondo oceánico, de acuerdo a la Eq. III.3. En este caso, la profundidad para la normalización de la ecuación fue la superficie de la columna de agua (1 m).

$$F_{f-s} = [R_0/(b + 1)][z_s^{(b+1)} - z_f^{(b+1)}] \quad (\text{III.3})$$

La función que mejor describió los F_C en los 3 perfiles fue la logarítmica ($r^2 > 0.99$, Fig. 3.5). Las ecuaciones fueron las siguientes: $F_C = -10.47 \ln(z) + 56.37$ en la NAM006R; $F_C = -12.96 \ln(z) + 77.96$ en la NAM011D; y $F_C = -11.54 \ln(z) + 69.13$ en la NAM011R, todas en unidades de $\text{mmol C m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Estas ecuaciones se aplicaron para determinar los F_C basados en la respiración a 150 m y 320 m con el fin de compararlos con los valores obtenidos mediante las trampas de sedimento.

Los flujos verticales de partículas en ambas estaciones se dividieron en periodos de alta y baja sedimentación (Fig. 3.6). De nuevo, la variación temporal en estos flujos fue mucho mayor que la variabilidad espacial debida a diferencias en la profundidad en la columna de agua o en la distancia a costa. Por lo tanto, en vez de comparar los valores entre las trampas de sedimento, se compararon los datos de los dos regímenes de sedimentación. En la Tabla 3.4 se muestran las medias aritméticas de los flujos durante las fases de alta y baja sedimentación, así como las relaciones elementales que fueron calculadas como el total de masa acumulada dividido por el correspondiente periodo de tiempo. El límite superior del periodo de baja sedimentación fue $2.53 \text{ mmol POC m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Los dos conjuntos de datos fueron claramente distintos ya que el límite

inferior del periodo de alta sedimentación fue más de dos veces superior a este valor.

Durante la fase de alta sedimentación, los flujos de masa y elementos fueron entre 4 y 6 veces superiores a los valores medidos durante la baja sedimentación, siendo esta diferencia incluso mayor (11 veces) para el sílice biogénico particulado (PSi). Se registró una alta abundancia de diatomeas, siendo las principales especies *Pseudonitzschia australis* (Fig. 3.7A) y *Coscinodiscus wailesi* (Fig. 3.7B). Además, las composición mineralógica presentó una alta contribución tanto de ópalo como de una mezcla de cuarzo unido a fracciones de diatomeas, o incluso a células enteras. Por el contrario, la fase de baja sedimentación estuvo caracterizada por unos flujos de masa y elementos que fueron desigualmente menores para el POC, PON, POP y PSi. Durante este periodo, los cocolitofóridos (Fig. 3.7C) aumentaron junto con los minerales carbonáceos (CaCO_3) y CaPO_4 y las mezclas de feldespato. Las relaciones entre los elementos también mostraron diferencias entre las fases (Tabla 3.4). Debido al alto contenido en diatomeas, el cociente atómico C/Si en las muestras recogidas durante el periodo de alta sedimentación representó la mitad del valor obtenido en la fase de baja sedimentación, al igual que el porcentaje de carbono frente al total de peso seco. El cociente C/N fue menor en el periodo de baja sedimentación, mientras que el cociente C/P fue ligeramente superior.

De esta forma, tanto los perfiles de respiración de la comunidad de organismos como los patrones de sedimentación de partículas medidos con las trampas de sedimento, mostraron una dominancia de la variabilidad temporal con respecto a la espacial. A pesar de que este resultado no sigue el esquema general de un sistema que madura estrictamente con respecto a la distancia al centro del afloramiento, sí concuerda con los complejos patrones espaciales descritos en el afloramiento de Benguela, donde dominaban los filamentos y remolinos (Mohrholz et al., 2014). En general, los patrones de transporte de partículas reflejaron el estado y la estructura del sistema pelágico en la capa de mezcla superficial. Independientemente de la posición geográfica y la profundidad, se diferenciaron dos escenarios en base a la calidad y la cantidad del material sedimentado. El primero se relacionó con un filamento eutrófico del afloramiento (Mohrholz et al., 2014), que estuvo caracterizado por una alta biomasa de fitoplancton debida a un fuerte crecimiento de diatomeas (Hansen et al., 2014). En el otro escenario, las partículas sedimentadas se originaron en una capa de mezcla que contenía elementos provenientes tanto del agua

del afloramiento como de agua más oligotrófica del Atlántico. En este caso, el estado oligotrófico fue descrito como una fase tardía del sistema de afloramiento, que tras un periodo de calentamiento, mezcla y pérdida de nutrientes se transformó de un sistema típico de producción nueva a uno de producción regenerada. El cambio en la comunidad de organismos hacia un porcentaje mayor de células más pequeñas y heterotróficas quedó reflejado en los valores similares de C/P, menores de C/N y mayores de C/Si (Tabla 3.4). Por otro lado, cabe mencionar que las medidas de POC registradas en el presente trabajo coincidieron con los rangos obtenidos en otros afloramientos (Pilskaln et al., 1996; González et al., 2009).

De una manera similar, los perfiles de respiración reflejaron un cambio en la estructura de la comunidad entre las dos situaciones básicas. Las aguas originadas en el filamento del afloramiento estuvieron dominadas por el microplancton y el zooplancton de la talla 200 - 500 μ , mientras que en las aguas más oligotróficas dominó el zooplancton de > 1000 μ m. Estos resultados concordaron con el modelo propuesto por Vinogradov et al. (1972) sobre la sucesión de las comunidades en los afloramientos. La magnitud de la respiración del microplancton fue inferior a la descrita por (Chapman et al., 1994) en la zona sur del afloramiento, probablemente debido a sus mayores niveles de productividad primaria. Sin embargo, los valores de respiración del zooplancton fueron ligeramente superiores a los encontrados en otros sistemas de afloramiento, siendo igualmente la causa más plausible de esta discrepancia los diferentes niveles de productividad primaria.

(iii) Comparación y combinación de ambas metodologías: flujo gravitacional de partículas y flujo modelado a partir de la respiración (F_C). El principal objetivo del presente trabajo fue comparar el POC que se sedimenta desde la E_z y que llega a las trampas de sedimento con el F_C calculado a las mismas profundidades en base a la respiración en la columna de agua. En la Fig. 3.8 se muestra tal comparación. Como se ha explicado anteriormente, el conjunto de datos recogidos por las trampas de sedimento se dividió en una fase de alta sedimentación y una fase de baja sedimentación, que se atribuyeron a eventos de alta y baja productividad primaria en la capa superficial, respectivamente (Eppley y Peterson, 1979). Los valores medios ($\pm$ SD) de POC durante los periodos de alta sedimentación fueron de 8.54 ($\pm$ 2.26) en la NAM006 y 7.39 ($\pm$ 1.54) en la NAM011, mientras que cuando la sedi-

mentación de partículas fue baja, los valores disminuyeron a $1.67 (\pm 0.66)$ en la NAM006 y $1.18 (\pm 0.79)$ en la NAM011. Las unidades de todos los valores son $\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. En cuanto a los perfiles en la columna de agua, se atribuyeron a su vez a periodos de alta y baja productividad utilizando la concentración de clorofila para estimar dicha productividad de acuerdo a Brown et al. (1991). De esta forma, la NAM006R y la NAM0011D coincidieron con un periodo de alta producción mientras que la NAM011R se asoció con una menor productividad. En la profundidad de las trampas de sedimento (150 m y 320 m), los F_C presentaron unos valores de 3.90, 3.43 y $2.57 \text{ mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en la NAM006R, NAM011D y NAM011R, respectivamente. Entonces, estos flujos para la NAM006R y la NAM011D se compararon con los valores de POC registrados en las trampas de sedimento durante el periodo de alta sedimentación, obteniéndose un valor dos veces superior mediante esta última metodología. Sin embargo, esta diferencia fue únicamente significativa para la NAM011D (t de Student, $p < 0.05$). El valor de F_C en la NAM011R, en cambio, se comparó con la concentración de POC medida en las trampas de sedimento cuando la sedimentación fue baja. En este caso, el valor a partir del F_C fue superior, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas (t de Student, $p = 0.11$).

De esta forma, se identificaron dos escenarios al realizar esta comparación. Independientemente de la distancia a costa, durante el periodo de alta sedimentación, los valores de flujo de POC obtenidos mediante las trampas de sedimento fueron superiores a los estimados mediante el método F_C basado en la respiración. Por el contrario, cuando la sedimentación fue baja, los valores de F_C fueron el doble de los medidos por las trampas de sedimento. Esta discrepancia pudo ser debida a las diferencias en la estructura de la comunidad planctónica en las aguas superficiales. Así, el escenario de alta sedimentación estuvo dominado por diatomeas grandes (Fig. 3.7A y B), que se agregan fácilmente formando partículas de sedimentación rápida (ver Thornton, 2002). Además, la alta presencia de material litogénico ($\sim 45\%$) pudo contribuir a este flujo mediante un efecto de lastre (Armstrong et al., 2001). Cabe suponer que las partículas que sedimentan tan rápido (100 m d^{-1}) están menos afectadas por los procesos de transporte lateral o por el consumo de los organismos y, por lo tanto, el material recogido por las trampas de sedimento está sincronizado con la producción en la superficie. Durante el periodo de baja sedimentación, la abundancia relativa de las diatomeas disminuyó notablemente

mientras que la de los cocolitofóridos aumentó. A pesar de que estos organismos pueden formar agregados que sedimentan a unas tasas incluso superiores a las diatomeas, necesitan de un mayor tiempo, una mayor densidad de células y la liberación de los cocolitos tras la rotura celular para que ocurra (Iversen y Ploug, 2010). Nuestros resultados, sin embargo, muestran una biomasa baja de fitoplancton, una contribución baja de material litogénico y una comunidad que no se encuentra en una fase de senescencia. Además, las observaciones microscópicas del material recogido evidenciaron la presencia de células intactas (Fig. 3.7C). Por lo tanto, todos estos datos sugirieron que este periodo estuvo dominado por partículas de sedimentación lenta, las cuales son más susceptibles de ser consumidas por el zooplancton de la zona intermedia de la columna de agua. Paralelamente, pudo ocurrir que una fracción de partículas de sedimentación lenta con origen en un filamento previo del afloramiento contribuyeran a aumentar las tasas de respiración en las aguas más profundas (Packard et al., 1977). Considerando las rápidas fluctuaciones encontradas entre las fases de alta y baja sedimentación así como las bajas velocidades de sedimentación de estas partículas de apenas unos metros al día, los patrones de producción en la superficie y el inventario de este grupo de partículas en las aguas más profundas pudieron estar fácilmente desacoplados. Por el contrario, las partículas de sedimentación rápida están más o menos sincronizadas con su producción en la superficie durante los primeros cientos de metros de la columna de agua. Así, el material que sedimenta más lento aumentará la respiración en las aguas de profundidad intermedia, mientras que las que sedimentan más rápido serán menos remineralizadas. Además, estas partículas que sedimentan más lento son más susceptibles de ser transportadas lateralmente por las corrientes, disminuyendo la eficiencia de recogida de las trampas de sedimento. En nuestro trabajo, la permanencia de partículas de sedimentación lenta en las aguas más profundas y su remineralización pudieron ser la causa del desacople encontrado entre los flujos medidos por los dos métodos. En consonancia con nuestros resultados durante este periodo, varios estudios recientes han medido unas demandas metabólicas de carbono para la comunidad planctónica superiores al aporte vertical de POC (Steinberg et al., 2008; Baltar et al., 2009). En estos estudios se registró una alta contribución de material de sedimentación lenta, de manera que el consumo de este grupo de POC que no se recoge en las trampas de sedimento podría explicar el desacople entre las dos variables (Alonso-González et al., 2010). Además, Alonso-González et al. (2010) sugi-

rieron que si las partículas de sedimentación rápida dominaran en la columna de agua ese desacople aparente entre la demanda metabólica de carbono y el flujo vertical de POC sería menor. En el presente trabajo, se ha demostrado que para el caso específico del afloramiento de Benguela y cuando estas partículas dominaban en la columna de agua, los valores de flujo de POC vertical fueron superiores a los estimados a partir de la respiración. En cualquier caso, los patrones observados en Benguela evidencian la influencia de la velocidad de sedimentación de las partículas en la eficiencia de recolección de las trampas de sedimento.

El método del F_C se ha aplicado previamente en las aguas del Golfo de Maine (Packard y Christensen, 2004) y más recientemente en las aguas de Canarias (Packard y Gómez, 2013). Así, demostró ser una buena herramienta para estudiar los flujos verticales de carbono en estas aguas, que se caracterizan por ser más oligotróficas y por presentar una sedimentación y una respiración bentónica insignificante. En el presente trabajo, debido a la alta productividad de las aguas del norte de Benguela, el F_C pudo subestimar parcialmente el flujo vertical total de carbono. Sin embargo, la combinación de este método con los datos de las trampas de sedimento permitió estimar los flujos integrados de partículas a la vez que se cuantificaron los procesos responsables de la pérdida de partículas en la columna de agua. Esto favoreció la comprensión simultánea de los procesos cuantitativos y cualitativos del funcionamiento del sistema. De esta forma, asumiendo una productividad primaria (PP) de $201 \text{ mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en las aguas superficiales de la zona de transición (Fernández-Urruzola et al., 2014), se consumió un 20.2 % de esta PP desde el límite de la E_z hasta la profundidad de las trampas de sedimento mediante la respiración del plancton. La cantidad de POC promedio que recolectaron las trampas fue de $4.7 \text{ mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, representando un 2.3 % de la PP. Estos valores concordaron con otros estudios previos realizados en los márgenes continentales de los océanos Atlántico y Pacífico (Walsh et al., 1981; Anderson et al., 1994; Pilskaln et al., 1996). La suma de ambos valores reflejó el porcentaje de PP que se exportó de la E_z , es decir, el e -ratio (Buesseler et al., 2007b). El valor obtenido de $\sim 23 \%$ fue similar a los rangos encontrados en otros sistemas muy productivos (Martin et al., 1987; Schlitzer, 2000; Buesseler y Boyd, 2009).

(iv) Cambios del F_C con respecto a la distancia a costa. Un objetivo secundario en este trabajo fue aplicar el método del F_C para cuantificar la con-

tribución del zooplancton a los flujos verticales de carbono en un transecto perpendicular a la costa. Se determinaron los perfiles de R_{CO_2} con la profundidad y se integraron desde la base de la E_z aplicando igualmente la Eq. III.3. La Tabla 3.5 muestra los ajustes logarítmicos, exponenciales y potenciales de los perfiles de F_C en diez estaciones realizadas a lo largo del transecto. El mejor ajuste en las estaciones costeras y en la zona de transición fue el logarítmico, mientras que en las estaciones oceánicas fue el exponencial. No obstante, estas diferencias únicamente fueron significativas en las estaciones de la zona de transición (ANOVA de 2 vías, $p < 0.05$). La pérdida de carbono asociada con la respiración del zooplancton ascendió a 17.32, 39.72 y 16.63 mmol C m⁻² d⁻¹ en las zonas costera, de transición y oceánicas, respectivamente. Estos valores representaron la demanda de carbono para la respiración del zooplancton en el total de la columna de agua. Con estos modelos de F_C se estimó además la relación de carbono transportado desde la E_z (e -ratio) que está asociado al zooplancton, la eficiencia de transferencia de carbono (T_{eff}) y la eficiencia en la retención de nutrientes (NRE). En este caso, el e -ratio representa el porcentaje de la productividad primaria que es consumido por la respiración del zooplancton por debajo de la E_z . Estos valores variaron desde el 2 % al 13 % en las tres zonas, con los mayores e -ratios medidos en las estaciones oceánicas. En este caso, no se consideró el consumo de POC por parte del microplancton ni la acumulación de carbono en los sedimentos, por lo que los valores obtenidos se encontraron en el límite inferior de los rangos obtenidos en otros estudios (Berger et al., 1989; Schlitzer, 2000; Buesseler et al., 2007b). La T_{eff} (Buesseler et al., 2007b) se define como la relación entre el F_C a 500 m y el F_C a 150 m, multiplicado por 100 para expresarlo como porcentaje. Unos valores más altos indican una mayor eficiencia del sistema para transferir el carbono desde la superficie hacia el fondo oceánico. Contrariamente al e -ratio, la T_{eff} se mantuvo constante en torno al 60 % en las estaciones más alejadas a la costa, las únicas con la suficiente profundidad como para determinar este parámetro. La NRE fue propuesta por Packard y Gómez (2013) y se refiere a la capacidad del sistema de mantener los nutrientes en la capa superior de la columna de agua ($z \leq 500$ m). De manera general, este parámetro refleja el concepto opuesto de la T_{eff} y el e -ratio, y como tal, debería correlacionarse de una manera directa con la producción regenerada e inversamente con la producción nueva (*sensu* Dugdale y Goering, 1967). Los valores obtenidos en el afloramiento de Benguela fueron de alrededor de 40 % (Tabla 3.6), excepto en la estación

NAM026, donde la transferencia de carbono fue mayor. En resumen, los resultados mostraron que en las estaciones donde la respiración del zooplancton fue más alta (NAM014), también lo fue la NRE y, por consiguiente, menor fue la T_{eff} . En cambio, cuando los valores de respiración fueron menores, como en la NAM026, la remineralización del POC fue menor, reflejándose en menores valores de NRE. Finalmente, en las estaciones de la zona intermedia la T_{eff} se mantuvo relativamente constante mientras que el e -ratio varió en un factor de 3, sugiriendo que la mayor parte del consumo de POC en este área ocurrió por encima de los 150 m.

III.3 Variabilidad de la respiración y la concentración de piridín nucleótidos en el zooplancton oceánico (*Capítulo 4*)

Este trabajo se centró en la variabilidad espacial y temporal del metabolismo respiratorio del zooplancton oceánico. Así, se compararon las tasas específicas de respiración (R_{O_2}) y de respiración potencial (Φ) por proteína, así como la relación entre ambas variables (R_{O_2}/Φ), medidos en organismos de zonas con una productividad primaria muy diversa. Se determinaron además los niveles intracelulares de los piridín nucleótidos NAD y NADP en la comunidad de zooplancton marino y se estudió su variabilidad en esas diferentes condiciones tróficas. Asimismo, se analizó el porcentaje de esa variabilidad que estaba asociado a los factores ambientales, como la temperatura y la clorofila. Los estudios de la variabilidad temporal se llevaron a cabo en el zooplancton de las aguas costeras de las Islas Canarias. Por un lado, se tomaron muestras durante la floración que tiene lugar a finales de invierno, en la que aumentan considerablemente los valores de productividad primaria y, por otro lado, durante el periodo de estratificación que caracteriza estas aguas después del verano.

Todas las muestras que se analizaron en este trabajo fueron tomadas durante 3 campañas oceanográficas que cubrieron áreas de los Océanos Atlántico e Índico, así como del afloramiento de Benguela (Fig. 4.1). Todas ellas tuvieron lugar desde Febrero a Octubre de 2011 (Tabla 4.1). La temperatura superficial más alta (25.1 °C) y la concentración más baja de clorofila (0.079 mg m⁻³) se encontraron en las aguas del Atlántico Norte (NA). Por el contrario, las aguas ricas en nutrientes del afloramiento de Benguela (BU) presentaron los valores más bajos de temperatura (14.6 °C) y una concentración de clorofila 10 veces superior a las medidas en otras regiones (3.177 mg m⁻³). El Océano Índico, a su vez, se caracterizó por una temperatura superficial media de 21.5 °C y una

concentración de clorofila de 0.175 mg m^{-3} durante el verano austral. Por último, la temperatura y concentración de clorofila promediadas en las aguas de Canarias (CI) fueron de $20.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.292 mg m^{-3} , respectivamente, a pesar de que se registró una notable variabilidad estacional en estos parámetros (Tabla 4.1).

(i) Variabilidad espacial del metabolismo respiratorio del zooplancton.

Como cabía esperar, las mayores tasas específicas por proteína de R_{O_2} y de Φ se midieron en los organismos de menor tamaño mientras que los valores más bajos correspondieron al zooplancton de más de $1000 \text{ }\mu\text{m}$ (Tabla 4.2). Así, un análisis más detallado de estas diferencias mediante un ANOVA de dos vías que consideró las fracciones de tamaño y las zonas de muestreo como factores (Tabla 4.3), reveló que las tasas específicas de Φ fueron significativamente superiores en el zooplancton de la talla $100 - 500 \text{ }\mu\text{m}$ en todas las regiones excepto en el BU, donde no se encontraron diferencias significativas entre las tallas. En esta zona, las tasas específicas de Φ fueron bastante constantes, registrándose un valor de $1.12 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el zooplancton más grande y de $1.18 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el zooplancton más pequeño. Las mayores diferencias entre los organismos de diferente tamaño se encontraron en las aguas del NA, donde la Φ varió de un mínimo de $1.75 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en el zooplancton más grande a un máximo de $3.30 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en las tallas más pequeñas. De igual forma, las tasas específicas de R_{O_2} presentaron los mayores valores en el zooplancton pequeño en todas las regiones (Tabla 4.2). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las zonas en las tasas medidas en las tallas $500\text{-}1000 \text{ }\mu\text{m}$ y $> 1000 \text{ }\mu\text{m}$. Cuando se compararon los valores promedios de las tasas específicas por proteína para el total del zooplancton (Fig. 4.3), se observó que los valores de Φ y R_{O_2} en el NA fueron significativamente superiores ($p < 0.001$) a los del resto de zonas (Tabla 4.3). En cambio, los valores determinados en la CI, el BU y el IO no fueron significativamente diferentes entre sí. Únicamente el zooplancton pequeño de la CI presentó una Φ de $1.79 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que fue superior ($p < 0.05$) a los valores medidos en la misma talla en el BU ($1.18 \text{ }\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

La relación R_{O_2}/Φ se emplea habitualmente para inferir las tasas de consumo de O_2 a partir de las medidas enzimáticas. La Fig. 4.4 muestra los valores de este cociente obtenidos en las diferentes zonas de muestreo. Los valores

más altos se encontraron en los organismos del NA, donde la media ($\pm$ SD) fue de $0.73 (\pm 0.05)$. No obstante, estos cocientes solo fueron significativamente superiores a los obtenidos en el BU (0.43 ± 0.05). Las relaciones R_{O_2}/Φ en los organismos del CI y el IO fueron de 0.57 ± 0.04 y 0.61 ± 0.05 , respectivamente.

Las concentraciones de piridín nucleótidos (PN) no describieron el mismo patrón que las tasas de R_{O_2} y Φ (Tabla 4.2). A pesar de que las formas oxidadas y reducidas de ambos nucleótidos se determinaron por separado, un problema durante el análisis no nos permitió cuantificar las formas reducidas. Por lo tanto, en este trabajo se presentó la suma de ambas formas, es decir, las concentraciones totales de NAD y NADP. Los niveles de NAD mostraron diferencias significativas entre las regiones pero no entre las diferentes tallas de zooplancton (Tabla 4.3). Las mayores concentraciones para cada talla se obtuvieron en los organismos del BU. El valor excepcionalmente alto medido en el zooplancton más grande de las aguas del NA pudo deberse al bajo tamaño muestral en ese caso ($n = 1$). El valor promedio para el total de la comunidad zooplanctónica fue superior en las muestras del BU ($p < 0.001$, Tabla 4.3), con un valor de $887.49 \text{ nmol NAD mg prot}^{-1}$ (Fig. 4.3). El valor más bajo, en cambio, se registró en los organismos del IO ($346.77 \text{ nmol NAD mg prot}^{-1}$), a pesar de que no difirió significativamente de la concentración determinada en el NA ($392.52 \text{ nmol NAD mg prot}^{-1}$). Los niveles de NAD medidos en la CI fueron a su vez superiores a los del IO y el NA. Por otro lado, las concentraciones de NADP fueron entre 2 y 4 veces inferiores a las concentraciones de NAD (Tabla 4.2). En este caso, se encontraron únicamente diferencias significativas en el BU, donde el zooplancton mayor de $500 \mu\text{m}$ mostró unas concentraciones superiores a las del zooplancton más pequeño. Además, cuando se compararon los niveles medios de NADP en las diferentes zonas se observaron diferencias significativas principalmente debidas al zooplancton mayor de $500 \mu\text{m}$ (Tabla 4.3). Así, estos organismos en el BU presentaron valores de NADP de $262.67 \text{ nmol mg prot}^{-1}$, siendo superiores a los determinados en el NA ($135.62 \text{ nmol NADP mg prot}^{-1}$), la CI ($175.40 \text{ nmol NADP mg prot}^{-1}$) y el IO ($211.96 \text{ nmol NADP mg prot}^{-1}$).

Se realizaron asimismo análisis de regresión múltiples y simples para estudiar la dependencia de estas tasas y concentraciones de los factores ambientales (Tabla 4.4). En este trabajo, se utilizó la concentración de clorofila *a* como un índice relativo de la productividad de las aguas. Así, se incluyeron el R_{O_2} ,

Φ , NAD y NADP como las variables dependientes y la temperatura y la clorofila *a* como las variables continuas independientes. La temperatura explicó aproximadamente el 26 % de la variabilidad de las tasas de Φ en el zooplankton de 100 a 1000 μm mientras que este porcentaje disminuyó hasta el 7.5 % en el zooplankton más grande. Por el contrario, la clorofila *a* no explicó más del 13 % de la variabilidad medida en estas tasas. Sin embargo, la combinación de ambos parámetros justificó alrededor del 14 % de la variabilidad en el zooplankton más grande y alrededor del 29 % en el zooplankton por debajo de las 1000 μm . El efecto de la temperatura y la clorofila *a* en el R_{O_2} fue similar aunque, en este caso, la mayor dependencia de la temperatura se observó únicamente en el zooplankton más pequeño (100 - 500 μm). Además, no se detectó ninguna correlación entre la clorofila *a* y las tasas R_{O_2} y Φ en el zooplankton grande. La variabilidad del NAD atribuible a la temperatura fue diferente entre las tallas, siendo máxima en los organismos de 500 - 1000 μm (43 %), mientras que la clorofila *a* explicó entre 24 - 31 % de dicha variabilidad. Cuando se consideraron ambos parámetros, el porcentaje aumentó hasta el 42 - 45 %. La concentración de NADP, por su parte, no mostró ninguna dependencia de la temperatura o la clorofila *a*, excepto en la talla 500 - 1000 μm en la que ambos parámetros explicaron un 40 % de su varianza.

Como reflejaron los resultados obtenidos al estudiar la variabilidad espacial, las tasas metabólicas y las actividades enzimáticas más altas se registraron en el zooplankton más pequeño (Tabla 4.2), concordando con lo observado por Ikeda y Mitchell (1982). Los valores de R_{O_2} obtenidos en este trabajo fueron considerablemente superiores a los estimados mediante las ecuaciones de Ikeda (1985), pero se encontraron dentro del rango determinado por Hernández-León and Ikeda (2005) para las mismas latitudes (0.90 - 1.86 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Con el fin de comparar nuestros datos con los de estos autores, se utilizó un factor de conversión de peso seco a proteína de 1/0.192 (Postel et al., 2000). La relativa diferencia entre nuestros valores y los de Ikeda pudo tener dos explicaciones. Por un lado, nuestros valores promedio pudieron estar sesgados hasta cierto punto debido a que el número de muestras que se consideró del tamaño más pequeño ($n = 99$) fue tres veces superior al del zooplankton grande ($n = 31$). Sin embargo, la razón más plausible es que estos autores incluyeron una gran proporción de muestras medidas en las altas latitudes y en hábitats con temperaturas extremadamente bajas para obtener sus ecuaciones. Así, los organismos se caracterizan por presentar unas tasas metabólicas más

bajas en estas condiciones. De hecho, la temperatura ha sido identificada como uno de los factores que más influyen las tasas metabólicas, junto con la biomasa (Ikeda, 1985; Ikeda et al., 2001; Ivleva, 1980). Nuestros resultados reflejaron esta influencia, ya que los valores mínimos de R_{O_2} en todas las tallas se determinaron en las aguas frías del BU (Fig. 4.3), a pesar de que se trató de la zona más productiva en este estudio (Tabla 4.1). Además, la temperatura explicó un mayor porcentaje de la variabilidad de R_{O_2} que la concentración de clorofila *a*, con el máximo en el zooplancton más pequeño (26 %, Tabla 4.4). Si se aplicara un factor Q_{10} de 1.8 (el valor promedio obtenido por Ikeda, 1985) y se estandarizara el R_{O_2} por la temperatura más alta (25.1 °C), el valor que se obtendría en el BU ($1.85 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sería muy parecido al obtenido en el NA. Un efecto parecido de la temperatura del hábitat sobre la actividad enzimática del ETS fue descrito por Packard et al. (1975), y se reflejó también en nuestros resultados (Tabla 4.2, Fig. 4.3). Por otro lado, la influencia de la temperatura en la relación R_{O_2}/Φ en el zooplancton ha sido analizada previamente en la literatura (Hernández-León y Gómez, 1996; King y Packard, 1975). Así, Hernández-León y Gómez (1996) determinaron los valores más altos en las temperaturas más bajas, atribuyéndolos al efecto indirecto de la relación entre la productividad primaria y la mezcla de la columna de agua. King y Packard (1975), en cambio, no encontraron ninguna relación entre el R_{O_2}/Φ y la temperatura, aunque la línea de regresión entre ambas variables mostró un incremento positivo y lineal del cociente con la temperatura, que coincidió con nuestros resultados (Fig. 4.4). Además, estos autores midieron unos R_{O_2}/Φ menores en el zooplancton gelatinoso con respecto al zooplancton no-gelatinoso. De esta forma, las diferencias en la composición específica pudieron explicar los valores más bajos de R_{O_2}/Φ medidos en el BU, a pesar de ser la zona más productiva, ya que estas aguas se caracterizaron por presentar una alta abundancia de zooplancton gelatinoso durante el muestreo (Fernández-Urruzola et al., 2014).

Las concentraciones específicas por proteína de PN medidas en este trabajo constituyeron una de las primeras determinaciones en el zooplancton marino y, por consiguiente, no hay prácticamente información disponible con la que compararlas. Schomer y Epel (1998) midieron la concentración de PN en huevos de invertebrados marinos, aunque su trabajo se centró en las relaciones redox entre las formas reducidas y oxidadas y no presentaron ninguna concentración estandarizada por biomasa. Aún así, los rangos presentados aquí

fueron similares a los obtenidos en un dinoflagelado marino (*Capítulo 5*) y en varias especies de bacterias (Andersen y von Meyenburg, 1977; Karl, 1980; London y Knight, 1966; Wimpenny y Firth, 1972). Por el contrario, fueron ligeramente inferiores a los medidos en otros eucariotas más complejos (por ejemplo, Agius et al., 2001; Umemura y Kimura, 2005, en células vegetales y animales, respectivamente). En este trabajo, esperábamos obtener los valores más altos de NAD y NADP en las zonas más productivas, y viceversa, asumiendo que (i) la concentración de PN era directamente proporcional a la disponibilidad de alimento, y que (ii) la disponibilidad de alimento era proporcional a la productividad del sistema. Nuestros resultados apoyaron esta hipótesis ya que el zooplancton del BU mostró los valores más altos mientras que los valores más bajos fueron medidos en las aguas más oligotróficas de NA (Fig. 4.3, Tabla 4.3). Como ocurre en otros organismos (Pollak et al., 2007), los niveles de NAD fueron superiores a los de NADP en todos los casos. Así, la relación NAD/NADP varió entre 2 y 5, coincidiendo con el rango descrito en varias especies de bacterias (Brody, 1972; Manlapaz-Fernández y Olivera, 1973; Setlow y Setlow, 1977).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue explorar la relación entre el R_{O_2} y la concentración de PN en el zooplancton de diferentes regiones oceánicas. En base a los trabajos realizados por Packard et al. (1996) y Aguiar-González et al. (2012), se esperaba obtener un patrón paralelo en ambos parámetros a lo largo de las zonas muestreadas, donde los máximos de R_{O_2} y los máximos de PN coincidieran. Sin embargo, no fue el caso (Fig. 4.3). Mientras que los valores más altos de R_{O_2} se midieron en las aguas cálidas del NA, los valores más altos de PN se registraron en las aguas altamente productivas del BU. Esta discrepancia se debió a un efecto desigual de la temperatura del hábitat y de la productividad del agua en ambas variables (Tabla 4.4), de manera que la relación entre ellas a nivel intracelular quedó enmascarada. Asimismo, otros factores como la composición específica pudieron afectar de diferente manera al R_{O_2} y a los PN, contribuyendo al desacople entre los patrones de ambas variables. En resumen, se hizo evidente la necesidad de realizar experimentos en cultivos monoespecíficos llevados a cabo a una temperatura constante para aislar la respuesta del metabolismo respiratorio y de las concentraciones intracelulares de NAD y NADP a cambios en las condiciones tróficas (ver *Capítulo 5*).

(ii) Variabilidad temporal en las aguas costeras de las Islas Canarias.

El estudio de la variabilidad temporal mostró diferencias tanto en los parámetros ambientales como en las variables biológicas entre los muestreos llevados a cabo en Abril y Octubre en las aguas costeras de las Islas Canarias (Tabla 4.1, Fig. 4.4). La temperatura media superficial subió de los 19.3 °C medidos durante la floración de finales de invierno (CI-LWB), hasta los 22.1 °C registrados en Octubre, cuando la columna de agua se encontraba estratificada (CI-ST). A su vez, la concentración de clorofila *a* en las aguas superficiales fue significativamente mayor en Abril (*t* de Student, $p < 0.01$).

La Fig. 4.5 mostró un descenso de las variables biológicas en las dos tallas más pequeñas entre CI-LWB y CI-ST. Desafortunadamente, no se obtuvieron valores para el zooplancton más grande ($> 1000 \mu\text{m}$) en Abril. El zooplancton pequeño presentó un significativo descenso (*t* de Student, $p < 0.001$) en las tasas R_{O_2} y Φ del 29 % y 35 %, respectivamente, entre Abril y Octubre. Se registró un descenso similar en el zooplancton de la talla de 500 - 1000 μm , aunque la disminución del R_{O_2} fue mayor en estos organismos (65 %). Asimismo, se observó una reducción significativa (*t* de Student, $p < 0.001$) de los niveles de NAD en la talla de 500 - 1000 μm en el muestreo de CI-ST, en el que los valores fueron la mitad de los obtenidos en el muestreo de CI-LWB. Sin embargo, en el zooplancton más pequeño las concentraciones se mantuvieron prácticamente constantes, al igual que ocurrió con las concentraciones de NADP en todas las tallas. La relación R_{O_2}/Φ describió el mismo descenso que el NAD, con valores significativamente inferiores en CI-ST en los organismos de la talla 500 - 1000 μm , mientras que los de la talla 100 - 500 μm no presentaron ninguna variación. En general, los valores de las variables biológicas medidas en el zooplancton grande ($> 1000 \mu\text{m}$) no difirieron significativamente de los valores obtenidos en el zooplancton más pequeño ($< 1000 \mu\text{m}$).

A grandes rasgos, las tasas más altas se midieron durante la floración de finales de invierno, cuando se produjo la ruptura de la termoclina, permitiendo la entrada de nutrientes en las aguas superficiales y promoviendo un aumento de la productividad primaria (Menzel y Ryther, 1961). Durante este periodo, se ha observado que la biomasa y las actividades metabólicas del zooplancton alcanzan su máximo con un ligero retraso con respecto al máximo de clorofila (Aristegui et al., 2001; Hernández-León et al., 2004; Schmoker et al., 2012). Las tasas medias de Φ específicas por proteína registradas en este trabajo ($2.0 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$) concordaron con el valor de $2.2 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1}$

h^{-1} encontrado previamente en estas aguas en Abril (Hernández-León et al., 2004). A medida que las aguas superficiales se calentaron, se produjo una restauración de la termoclina que impidió el flujo vertical de nutrientes, limitando el crecimiento del fitoplancton. En estas condiciones, se observó un descenso del 32 % y 40 % de las tasas específicas de R_{O_2} y Φ , respectivamente, coincidiendo con el descenso de la biomasa de zooplancton entre estos dos periodos medido en otros trabajos (Aristegui et al., 2001; Schmoker y Hernández-León, 2013). El hecho de que el R_{O_2} disminuyera a una tasa superior que la Φ conllevó un descenso del R_{O_2} / Φ . De igual forma, Hernández-León y Gómez (1996) mostraron un descenso de este cociente desde un máximo de 0.77 medido durante el periodo de mezcla a finales del invierno hasta un mínimo de 0.5 durante las condiciones de estratificación, concordando con los valores encontrados en este trabajo. A la vista de los resultados, se pudo presumir que la disponibilidad de alimento fue un factor principal que afectó tanto a las tasas metabólicas como a las actividades enzimáticas, a pesar de que las últimas presentaron una respuesta más mitigada, de acuerdo a lo descrito por Bamsedt (1980). En este caso, el ligero ascenso de la temperatura en Noviembre (Tabla 4.1) no afectó a las tasas metabólicas y a las actividades enzimáticas más de lo que lo hizo la productividad primaria. Otros estudios en el Atlántico norte han mostrado asimismo cambios estacionales en las tasas metabólicas de copépodos, asociados con los ciclos de productividad del fitoplancton (Conover y Corner, 1968; Marshall y Orr, 1958).

En este trabajo, se utilizó la clorofila *a* como un índice de la biomasa fitoplanctónica y de la productividad del sistema. En las aguas costeras de las Islas Canarias, el 60 % de la productividad primaria es debida al picoplancton ($<2 \mu\text{m}$, Aristegui et al., 2001), el cual está muy por debajo del tamaño de alimento elegido por el zooplancton (Calbet y Landry, 1999). Sin embargo, el picoplancton promueve el crecimiento de otros nano- y microheterótrofos no pigmentados que, a su vez, constituyen el 35 - 80 % de la dieta del zooplancton en estas aguas (Hernández-León et al., 2004). Por lo tanto, a pesar de que la clorofila *a* no es un parámetro comúnmente utilizado para estudiar el efecto de la disponibilidad de alimento en las tasas de respiración del zooplancton, puede poner en contexto de una manera indirecta la situación trófica en la que se encuentran los organismos. Así, coincidiendo con lo explicado anteriormente para la variabilidad espacial, la concentración intracelular de NAD reflejó el patrón de productividad de las aguas mientras que el NADP se man-

tuvo prácticamente constante entre los dos muestreos (Fig. 4.5). Los valores más altos de NAD para cada talla se determinaron durante el periodo de floración de finales de invierno y decrecieron posteriormente durante el periodo de estratificación, sobre todo en la talla de 500 - 1000 μm . De hecho, los patrones temporales descritos por el R_{O_2} y la concentración de NAD fueron muy similares, apoyando la hipótesis de que el R_{O_2} está controlado por la concentración de sustratos (Packard et al., 1996; Aguiar-González et al., 2012). Aún así, como ya se ha indicado anteriormente, es necesario realizar nuevas investigaciones para comprender los cambios a corto plazo de las concentraciones intracelulares de PN y para explorar su papel en el control de la respiración al cambiar las condiciones tróficas (ver *Capítulo 5*). Por otro lado, la falta de datos de concentraciones de PN en el zooplancton marino impidió verificar si los cambios registrados fueron debidos exclusivamente a la cantidad del alimento o si, por el contrario, factores como la composición específica o la calidad del alimento pudieron contribuir a la variabilidad estacional observada. Ambos aspectos fueron tratados en los *Capítulos 5* y *6* de esta tesis, respectivamente.

III.4 Influencia de la inanición en el metabolismo respiratorio y en los niveles de piridín nucleótidos del dinoflagelado marino *Oxyrrhis marina* (*Capítulo 5*)

A lo largo de este trabajo se estudió la respuesta del consumo respiratorio de O_2 (R_{O_2}) y de la actividad enzimática del sistema de transporte de electrones (ETS) respiratorio, como índice de la respiración potencial (Φ), durante un periodo de inanición en el dinoflagelado marino *Oxyrrhis marina*. Además, se determinaron las concentraciones intracelulares de los sustratos del ETS, es decir, el NAD y el NADP tanto en sus formas oxidadas como reducidas. Por último se analizó la relación existente entre dichos sustratos y las tasas de R_{O_2} y Φ . El experimento se llevó a cabo por triplicado y comenzó alimentando los cultivos de *O. marina* con un pulso del alga *Rhodomonas salina* a unas concentraciones de saturación. Una vez el dinoflagelado hubo consumido todo el alga no se añadió más alimento y se comenzó a tomar muestras a días alternos durante un periodo total de 17 días.

(i) Efecto de la inanición en el metabolismo respiratorio. Durante este tiempo, se observó un descenso significativo del número de células y del contenido protéico, así como del R_{O_2} y la Φ (Fig. 5.1). Tanto el R_{O_2} como el

número de células, estandarizados por unidad de volumen de cultivo, mostraron un descenso exponencial durante la inanición mientras que las proteínas y la Φ disminuyeron de una manera lineal. La tasa de mortalidad celular fue alta durante los primeros nueve días (5 % de descenso diario de la abundancia) y, posteriormente, disminuyó 5 veces hasta el final del experimento. Asimismo, el R_{O_2} bajó de un máximo de $166 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a un mínimo de $36 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en los primeros nueve días, y continuó descendiendo de una manera más lenta durante los siguientes ocho días. Por otro lado, el contenido protéico en el cultivo disminuyó a una tasa constante de $0.13 \text{ mg d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ mientras que la Φ hizo lo propio a una tasa comparativamente superior de $3.77 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Cuando se consideraron las tasas específicas de R_{O_2} por célula y proteínas (Tabla 5.1), se observó un descenso exponencial significativo en ambos casos (regresión no lineal, $r^2 = 0.99$, $p < 0.0001$), si bien fue un 10 % mayor en el caso de las tasas específicas de R_{O_2} por proteínas. En cambio, las tasas específicas de Φ por célula y proteínas se mantuvieron prácticamente constantes durante el mismo periodo (Tabla 5.1), con unos valores promedios ($\pm$ SD) de $7.52 (\pm 0.97) \mu\text{mol O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $13.03 (\pm 1.86) \text{ pmol O}_2 \text{ célula}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

De esta forma, se observó que el efecto de un periodo prolongado de inanición fue diferente en el R_{O_2} y en la actividad enzimática del ETS. Una rápida reducción de la tasa metabólica, como la que se observó en nuestros resultados (Fig. 5.1), constituye una estrategia de supervivencia en momentos de escasez de alimento en los microorganismos. De hecho, los protozoos en inanición pueden bajar sus tasa metabólicas hasta un 2 - 10 % de aquella característica durante las condiciones de crecimiento normal (Fig. 5.4 en este estudio; Fenchel, 1990). Esta cualidad les permite hacer frente a la inanición, en algunos casos, durante más de un mes (Menden-Deuer et al., 2005; Strom, 1991). Al mismo tiempo, estos organismos conservan determinados recursos celulares, tales como la capacidad respiratoria, proteínas estructurales, enzimas, etc., como quedó reflejado en las tasas específicas constantes determinadas en este trabajo (Tabla 5.1), siendo una ventaja para los organismos que viven en ambientes muy variables. Una vez que aparece una nueva fuente de energía podrían comenzar inmediatamente a utilizarla, sin tener que esperar a sintetizar *de novo* la maquinaria enzimática (Finlay et al., 1983; Packard et al., 1996). Por otro lado, se ha descrito una respuesta similar frente a la limitación de alimento en otros organismos marinos (Herrera et al., 2011; Packard et al.,

1996), así como en otros procesos fisiológicos como la excreción de amonio (Fernández-Urruzola et al., 2011; Mayzaud, 1976).

Las tasas específicas de R_{O_2} medidas para los organismos recién alimentados y en inanición en este trabajo (Tabla 5.1) se encuentran dentro de los rangos determinados en otros protozoos (Fenchel and Finlay, 1983). Asimismo, concordaron plenamente con las tasas de respiración obtenidas en *O. marina* durante un periodo similar de inanición (Hantzsche and Boersma, 2010; Meunier et al., 2012), y más específicamente con los valores más recientemente encontrados en la misma cepa de este dinoflagelado (Calbet et al., 2013). De este modo, Meunier et al. (2012) sugirieron que el metabolismo de un cultivo de *O. marina* rico en nitrógeno dependía en gran medida de las reservas protéicas durante la inanición. Por el contrario, Calbet et al. (2013) observaron que los organismos de un cultivo equiparable de *O. marina* presentaron un descenso en la concentración de ácidos grasos con la inanición, indicando que estas moléculas estaban siendo metabolizadas y utilizadas como fuente de energía durante este periodo. Las concentraciones de proteínas relativamente constantes en nuestro cultivo (Fig. 5.1) apoyan las observaciones de (Calbet et al., 2013).

Tradicionalmente, la relación R_{O_2}/Φ ha sido utilizada en la oceanografía biológica para estimar la respiración a partir de medidas de la actividad del ETS. Además, constituye un índice del estado fisiológico de los organismos (Christensen et al., 1980). La Fig. 5.2 muestra la variabilidad de este cociente durante la inanición en triplicados del cultivo de *O. marina*. Así, se observó un descenso medio del 60 % del valor inicial de 1.4 en la primera semana, y del 85 % al final del experimento, donde el valor promedio fue de 0.25.

A menudo en la bibliografía se encuentran cocientes R_{O_2}/Φ superiores a 1 (Hernández-León and Gómez, 1996; Herrera et al., 2011; King and Packard, 1975; Martínez et al., 2010). Debido a que el valor máximo teórico de 1 indica que los organismos están respirando a su capacidad máxima, los valores superiores a 1 son sorprendentes. En este trabajo, los valores más altos se encontraron en los organismos bien alimentados (Fig. 5.2), coincidiendo con lo descrito anteriormente para otras especies (Herrera et al., 2011; Martínez et al., 2010). La explicación a esta discrepancia se puede abordar desde dos perspectivas diferentes. La primera es que puede que existan otras vías que consuman O_2 a parte del ETS, y que no se consideran en el análisis. Sin embargo, a pesar de que existen oxigenasas, hidroxilasas y otro tipo de oxidasas en las células,

las enzimas del ETS son las responsables del 90 % del consumo biológico de O_2 (Nelson et al., 2008), y el otro 10 % no es suficiente como para explicar la diferencia en el R_{O_2} en los valores de R_{O_2}/Φ de 1.5-2. La segunda perspectiva es la posible contribución de otros mecanismos al control de la actividad *in vivo* del ETS, a parte de la concentración de sustratos. En este contexto, los trabajos realizados en organismos superiores (e.g., Chance y Williams, 1955; Kasimova et al., 2006) han mostrado que la respiración comenzaba a aumentar tras añadir los sustratos en una preparación de mitocondrias aisladas. Sin embargo, dicha R_{O_2} aumentaba considerablemente cuando se añadía una concentración determinada de adenosín-5'-difosfato (ADP) (i.e., estado respiratorio 3, *sensu* Chance y Williams, 1955). Ésto evidenció que el transporte de electrones y la síntesis de adenosín-5'-trifosfato (ATP) estaban estrechamente acoplados en la membrana interna mitocondrial en las condiciones *in vivo*. Para poder determinar si este control adicional de la respiración se repite en los organismos marinos, es necesario determinar las concentraciones intracelulares de ADP y estudiar su comportamiento en diferentes situaciones metabólicas.

(ii) Concentración de piridín nucleótidos y su respuesta a la inanición. La Fig. 5.3 muestra la concentración específica por proteína de NAD y NADP, tanto en sus formas reducidas (NADH, NADPH) como oxidadas (NAD^+ , $NADP^+$), así como la suma de ambas (NADt, NADPt) durante el experimento de inanición. Los niveles intracelulares de NADt fueron 3 veces superiores a los valores de NADPt en los organismos recién alimentados, y 7 veces superiores después de 17 días de inanición. La concentración total de nucleótidos describió un descenso logarítmico durante este tiempo, representado por las ecuaciones $NADt = 620.43 - 66.42 \ln(\text{día})$ ($r^2 = 0.71$, $p < 0.005$), and $NADPt = 177.67 - 46.82 \ln(\text{día})$ ($r^2 = 0.97$, $p < 0.0001$), ambos en unidades de pmol mg prot^{-1} . Este descenso fue debido a una disminución de las formas oxidadas, ya que las reducidas se mantuvieron prácticamente constantes, sin un patrón claro de ascenso o de descenso ($p > 0.05$). En término medio, la concentración de NAD^+ varió desde $353.34 \text{ pmol mg prot}^{-1}$ hasta $87.57 \text{ pmol mg prot}^{-1}$, mientras que el $NADP^+$ varió desde $117.98 \text{ pmol mg prot}^{-1}$ hasta $7.82 \text{ pmol mg prot}^{-1}$ durante el mismo periodo. Por el contrario, los valores promedio ($\pm$ SD) para el total del experimento fueron de $295.51 (\pm 41.38) \text{ pmol mg prot}^{-1}$ para el NADH y de $49.89 (\pm 6.65) \text{ pmol mg prot}^{-1}$ para el NADPH.

Por otro lado, la Tabla 5.2 resumió las concentraciones de ambos piridín nucleótidos (PNs) en sus diferentes formas durante la inanición, estandarizadas por el número de células presentes en el cultivo. El NADt específico por célula se mantuvo en unos niveles constantes durante todo el experimento, con un valor medio de 8.16×10^{-4} pmol célula⁻¹. Sin embargo, se observó un descenso lineal significativo de la concentración de NAD⁺ (pendiente = -0.14×10^{-4} pmol d⁻¹ célula⁻¹, $r^2 = 0.71$, $p < 0.005$) que, a su vez, se vio compensado por un ascenso paralelo de la concentración de NADH (pendiente = 0.24×10^{-4} pmol d⁻¹ célula⁻¹, $r^2 = 0.81$, $p < 0.001$). Por el contrario, los niveles de NADPt específicos por célula mostraron un descenso de 0.07×10^{-4} pmol d⁻¹ célula⁻¹ ($r^2 = 0.85$, $p < 0.0005$), que fue debido a una disminución en la concentración de NADP⁺ (pendiente = -0.08×10^{-4} pmol d⁻¹ célula⁻¹, $r^2 = 0.85$, $p < 0.0005$). Por su parte, los niveles de NADPH presentaron un ligero incremento con la inanición, aunque no fue significativo ($p = 0.25$).

Las relaciones NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH son índices del estado redox de las células que, siendo éste a su vez un factor determinante del funcionamiento celular y del metabolismo. Después de 17 días de inanición, los cocientes NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH disminuyeron un 10 % y 17 % con respecto a sus valores iniciales, respectivamente (Tabla 5.2). Así, se registró un aumento en la proporción de las formas reducidas frente a las oxidadas con el tiempo de inanición. De la misma forma, la relación NADt/NADPt aumentó de un valor de 3 al comienzo del experimento hasta un valor de 10 al final del periodo de inanición.

A pesar de la importancia de los piridín nucleótidos en el metabolismo energético y en las reacciones de oxidorreducción en las células, apenas se conoce nada sobre su concentración, distribución intracelular y comportamiento en los microorganismos marinos. En este trabajo, se han cuantificado las concentraciones de NAD y NADP en el dinoflagelado heterótrofo *O. marina* y se han monitorizado sus niveles durante un periodo de inanición. Cuando estos organismos se encontraban bien alimentados, las concentraciones específicas por proteína medias de NAD y NADP fueron de 0.589 nmol mg prot⁻¹ y 0.171 nmol mg prot⁻¹, respectivamente (Fig. 5.3). Estas concentraciones fueron ligeramente inferiores en comparación con las de otros organismos eucariotas, como los 4 nmol NAD mg prot⁻¹ determinados en monocapas de células de ratón (Umemura y Kimura, 2005), o el rango de $0.93 - 3.70$ nmol NAD mg prot⁻¹ determinado en mitocondrias aisladas de varias especies de plantas

(Agius et al., 2001). Sin embargo, la similitud entre los resultados obtenidos en este trabajo y los registrados en ciertas especies de bacterias aerobias fue mayor. En esos organismos, los valores promedio de coenzima total fueron de 0.728 nmol mg prot⁻¹ para el NAD y de 0.481 nmol mg prot⁻¹ para el NADP (London y Knight, 1966; Wimpenny y Firth, 1972), utilizando una relación proteína: peso seco de 0.63 (Simon y Azam, 1989). Independientemente del tipo celular, los niveles intracelulares de NAD son habitualmente más altos que los de NADP (Pollak et al., 2007), coincidiendo con nuestros resultados (Tabla 5.2). Además, algunos autores han propuesto que la relación NAD/NADP en bacterias está estrictamente controlada mediante diversos mecanismos celulares en un valor constante de 3/1 (Brody, 1972; Manlapaz-Fernández y Olivera, 1973). En este trabajo, este cociente coincidió con los valores medidos en *O. marina* recién alimentado pero, posteriormente, este valor subió hasta 10/1. Se determinó un aumento similar en esta relación en un cultivo de *Pseudomonas* sp. al aumentar la tasa de dilución (Mattin y Gottschal, 1976).

Una de las observaciones más interesantes de este trabajo fue la relativa constancia de las formas reducidas durante la inanición (Fig. 5.3). El NADH se regenera mayoritariamente en las reacciones catabólicas como la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA/Krebs) (Mathews et al., 2000), mientras que el NADPH se regenera en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (Kruger and von Schaewen, 2003). Si los niveles de NADH y NADPH fueran estrictamente proporcionales al alimento ingerido, se esperaría detectar un descenso en sus concentraciones a medida que la disponibilidad de sustrato se vuelve limitante. Sin embargo, el descenso durante este experimento fue registrado en el NAD⁺ y NADP⁺ en vez de en sus formas reducidas (Fig. 5.3). Además, se observó una disminución en los cocientes NAD(P)⁺/NAD(P)H con la inanición (Tabla 5.2). A partir de estos resultados, cabe suponer que (i) las reacciones de oxido-reducción en la célula pueden estar orientadas a mantener unos niveles constantes de NAD(P)H en vez de una relación constante de NAD(P)⁺/NAD(P)H y que, por lo tanto, (ii) El NAD(P)⁺ sería el responsable de las fluctuaciones de los cocientes NAD(P)⁺/NAD(P)H. La primera suposición está respaldada por varios trabajos previos llevados a cabo en cultivos de bacterias, donde se registraron unos niveles de NADH constantes bajo diferentes condiciones de crecimiento (Mattin y Gottschal, 1976; Wimpenny y Firth, 1972). Más recientemente, se ha registrado que la concentración libre de NADH (es decir, la fracción del total de NADH que no está unida a proteínas)

se mantuvo constante bajo diferentes condiciones metabólicas en las mitocondrias de células vegetales (Kasimova et al., 2006). Por otro lado, cabe mencionar que las relaciones $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ desempeñan una función clave en la regulación del estado redox de las células y en el control de numerosas enzimas metabólicas (Mathews et al., 2000). Además, se ha documentado extensamente que éstos fluctúan en respuesta a cambios en el metabolismo. Por lo tanto, si la segunda suposición fuera correcta y el NAD(P)^+ fuera un regulador metabólico, los valores de $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ deberían estar en torno a 1. De acuerdo a lo propuesto por Lin and Guarente (2003) para el NAD, si el valor fuera superior (por ejemplo, 500), el cociente sería muy sensible a los cambios en la concentración de NADH y no de NAD^+ . Nuestros resultados concordaron con esta afirmación ya que los valores variaron entre 1.49 - 0.25 (Tabla 5.2). Este razonamiento puede aplicarse igualmente para el NADP, dado que las concentraciones intracelulares de NAD y NADP están estrechamente relacionadas (Noctor et al., 2006).

(iii) Relación entre los piridín nucleótidos y el metabolismo respiratorio. La comparación de los perfiles de tiempo de la respiración, la respiración potencial y las concentraciones de NADt y NADPt se muestra en la Fig. 5.4. Estos perfiles se obtuvieron estandarizando los datos con respecto al valor inicial y expresándolos en porcentajes. A diferencia del descenso relativo observado para la Φ y el NADt, el R_{O_2} y el NADPt mostraron un descenso paralelo pronunciado. De hecho, éstas variables descendieron por debajo del 60 % del valor inicial en la primera semana, mientras que la disminución en la Φ y el NADt apenas llegó al 10 % en el mismo periodo. La Tabla 5.3 incluye los coeficientes de correlación de Pearson (r) de las tasas de R_{O_2} y Φ con las formas reducidas y oxidadas de ambos nucleótidos, así como con la cantidad total. Tanto el R_{O_2} como la Φ presentaron una mayor correlación con las formas oxidadas que con las reducidas. Así, el valor máximo de r correspondió a la correlación de R_{O_2} con el NADP^+ ($r = 0.981$, $p < 0.0001$). Excepto con las formas reducidas, la Φ se correlacionó de la misma manera con el resto de formas de ambos nucleótidos, sin ninguna diferencia significativa entre los valores de r , tal y como se determinó mediante la transformación r -a- z de Fisher.

A la vista de estos resultados, se esperarí registrar las concentraciones más altas de NAD(P)^+ coincidiendo con las tasas de R_{O_2} más altas en los organismos bien alimentados, mientras que cuando el R_{O_2} disminuye debido a

la inanición se encontrarían los valores más bajos de NAD(P)^+ . Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en varios trabajos realizados en mitocondrias de células vegetales (Agius et al., 2001; Kasimova et al., 2006), teniendo en cuenta que nuestro estudio se llevó a cabo a una escala temporal superior (es decir, minutos *vs* días). Por ejemplo, Kasimova et al. (2006) registró las mayores concentraciones de NAD^+ y los menores niveles de reducción de NAD ($\% \text{NADH}$) cuando el R_{O_2} fue máximo. Por el contrario, cuando el R_{O_2} se atenuó, los valores de NAD^+ disminuyeron y el $\% \text{NADH}$ aumentó, coincidiendo con lo determinado en el presente trabajo. A partir de los coeficientes de correlación más altos entre el R_{O_2} y el NADP (Tabla 5.3), se podría sugerir que la respiración en *O. marina* está principalmente controlada por este nucleótido. Para poder afirmarlo, sería necesario conocer las K_m (constantes de semi-saturación de Michaelis) del complejo I del ETS para el NADH y el NADPH. Si la K_m fuera menor para el NADH que para el NADPH, como ocurre en las mitocondrias de las células vegetales (Moller y Rasmusson, 1998), esta enzima oxidaría preferentemente el NADH. Sin embargo, por el momento, se trata únicamente de suposiciones ya que no existe información sobre las constantes cinéticas para los enzimas del ETS en los dinoflagelados marinos.

III.5 Predicción de las tasas de consumo de oxígeno a partir de la actividad del ETS y la cinética enzimática bisustrato en cultivos de zooplancton marino (Capítulo 6)

En este último trabajo se ha estudiado la capacidad de predecir el consumo respiratorio de O_2 (R_{O_2}) de un modelo cinético bisustrato durante un periodo de inanición. Este modelo se basa en el control *in vivo* de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) mediante la concentración de sustratos y las constantes cinéticas, de acuerdo a la Eq III.4.

$$V_{\text{O}_2} = \frac{A_{\text{ETS}} [\text{NADH}] [\text{NADPH}]}{K_{\beta} + [\text{NADH}] [\text{NADPH}]} \quad (\text{III.4})$$

$$K_{\beta} = K_{\text{ia}} K_{\text{NADPH}} + K_{\text{NADPH}} [\text{NADH}] + K_{\text{NADH}} [\text{NADPH}]$$

El estudio se llevó a cabo en dos especies de zooplancton marino, el rotífero *Brachionus plicatilis* y el misidáceo *Leptomysis lingvura*, para comprobar la influencia de la complejidad estructural de los organismos en la capacidad predictiva del modelo. Para ello, se monitorizó el R_{O_2} y la respiración poten-

cial (Φ), así como las concentraciones intracelulares de los sustratos del ETS (NADH y NADPH) y de los moduladores (ADP y ATP) durante la inanición. Además, se determinaron las constantes de Michaelis (K_{NADH} and K_{NADPH}) y de disociación (K_{ia}) para cada uno de los sustratos. Por último se les suministraron dos tipos de alimento a los organismos con el fin de comprobar el efecto de la calidad del alimento tanto en las tasas metabólicas como en las concentraciones intracelulares de metabolitos.

(i) Respuesta del metabolismo respiratorio frente a la calidad del alimento. La influencia de la calidad del alimento en el metabolismo respiratorio de *B. plicatilis* and *L. lingvura* está resumida en la Tabla 6.2. En general, los valores de todas las variables fueron superiores en los organismos alimentados con el tratamiento rico en lípidos (dieta A) en comparación con los del tratamiento pobre en lípidos (dieta B), aunque estas diferencias fueron únicamente significativas en algunas variables. Una de ellas fue el R_{O_2} , que registró los mayores valores tanto en rotíferos como en misidáceos alimentados con la dieta A. La Φ , en cambio, mostró diferencias significativas entre los tratamientos en *L. lingvura* pero no en *B. plicatilis*. La relación R_{O_2}/Φ en los rotíferos alimentados con el alga rica en lípidos *Nannochloropsis* sp. (1.14) fue superior al valor medido en los organismos alimentados con levadura seca (1.03), mientras que no se determinaron diferencias en los misidáceos alimentados con ambas dietas. Por otro lado, el R_{O_2} , la Φ y la relación R_{O_2}/Φ fueron siempre mayores en rotíferos que en misidáceos (Tabla 6.2). En cuanto a los sustratos del ETS, el NAD y el NADP, no se observó una influencia de la calidad del alimento en sus concentraciones intracelulares, excepto en el NADP de rotíferos, donde los valores obtenidos en la dieta rica en lípidos duplicaron a los medidos en la dieta más pobre en lípidos. Cabe destacar también que la concentración de las formas reducidas de NAD y NADP fueron superiores a la de las formas oxidadas, independientemente del organismo y la dieta. Así, el NADH y el NADPH fueron de 3 a 8 veces superiores al NAD^+ y al NADP^+ . El valor promedio de NADH en misidáceos fue de 24.5 μM , siendo significativamente superior al valor medio registrado en rotíferos (10.7 μM). La diferencia entre los niveles de NADPH entre ambos organismos no fue muy notable, con un rango de 4.1 - 7.4 μM en rotíferos y una media de 7.1 μM en misidáceos. Por otro lado, las concentraciones de ADP y ATP determinadas en estos organismos mostraron diferencias significativas entre ambas especies pero no entre los distintos

tratamientos. La concentración media en rotíferos fue de 91.4 μM , mientras que en misidáceos fue de 17.3 μM . De igual forma, la concentración de ATP varió desde los 10.3 μM medidos en rotíferos hasta los 4.0 μM registrados en misidáceos. Durante estas condiciones de recién alimentados, la relación ADP/ATP fue de 8-9 en rotíferos y de aproximadamente la mitad en (~ 4) misidáceos.

Se esperaban obtener diferencias en las tasas metabólicas entre los dos tratamientos, ya que, de acuerdo con Conover (1966), la composición del alimento determina la asimilación por el zooplancton, lo que a su vez afecta sus tasas metabólicas. Así, el R_{O_2} más alto determinado en el cultivo de *B. plicatilis* alimentados con la dieta rica en lípidos en comparación a los de la dieta pobre en lípidos puede ser debido a las diferentes rutas metabólicas que predominaban en cada caso (Nelson et al., 2008). En los organismos con la dieta más lipídica la β oxidación de los ácidos grasos dominarían el catabolismo mientras que en los alimentados con una dieta más protéica las oxidación de aminoácidos jugaría un papel principal. De esta forma, la degradación completa de un ácido graso C16 (e.g., ácido palmítico) requiere consumir 23 moles de O_2 y produce 131 moles de ATP. Por el contrario, la oxidación completa de la misma cantidad (en escala molar) de un compuesto nitrogenado (e.g., ácido glutámico) consume 1.5 moles de O_2 y produce 11 moles de ATP. Por lo tanto, para la producción de la misma cantidad de ATP (1 mol) se consume más O_2 cuando se oxida un compuesto lipídico (0.2 moles) que cuando es protéico (0.14 moles). Si se asumen unos requerimientos energéticos similares en los organismos de los dos tratamientos, ésto podría explicar razonablemente las diferencias entre los valores de R_{O_2} . En la misma línea, Ikeda (1977) también determinó un mayor consumo de O_2 en el zooplancton durante la oxidación de lípidos. Este mismo razonamiento se puede aplicar a los valores de R_{O_2} en *L. lingvura*. Los valores de Φ , en cambio, no mostraron tales diferencias entre los tratamientos, a pesar de que las Φ específicas por proteína en los misidáceos alimentados con *Artemia* sp. enriquecida fueron ligeramente superiores.

Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones intracelulares de metabolitos no mostraron diferencias entre los tratamientos, excepto los niveles de NADP en rotíferos. Esta diferencia pudo estar relacionada con el papel que desempeña el NADP en los procesos de biosíntesis y crecimiento. Así, se ha observado que los rotíferos cultivados con levadura crecen a una tasa bastante inferior a los que se alimentan de microalgas vivas, por lo que cabría esperar

registrar menores de NADP en los organismos de la dieta *B* en comparación con los de la dieta *A*.

A la vista de los resultados, la calidad del alimento parece ser un factor adicional que contribuye a la variabilidad registrada en la relación R_{O_2}/Φ en los organismos del medio marino (e.g., *Capítulo 4*, esta tesis; Hernández-León y Gómez, 1996). Teniendo en cuenta que las Φ son relativamente constantes a corto plazo, la relación R_{O_2}/Φ fluctuará en la medida en la que lo haga el R_{O_2} y, como hemos visto, ésta depende en gran medida de la composición bioquímica de las moléculas que se metabolizan. Sin embargo, los mayores responsables de dicha variabilidad parecen ser las diferencias entre especies y el estado nutricional de los organismos (ver discusión a continuación).

(ii) Efecto de la inanición en el metabolismo respiratorio. Además de analizar el efecto de la calidad del alimento en el metabolismo respiratorio de rotíferos y misidáceos, se estudió la evolución de esas mismas variables durante un periodo de inanición (Fig. 6.3). En general, los organismos aclimatados a ambas dietas mostraron un patrón similar en todas las variables durante la inanición, a pesar de que los valores fueron normalmente inferiores en el tratamiento pobre en lípidos. El perfil de R_{O_2} evidenció un descenso brusco en las primeras 2 h, y posteriormente continuó disminuyendo a una tasa menor hasta el final del experimento, donde alcanzó el 50 % del valor inicial. La Φ presentó un descenso inicial parecido, pero se mantuvo estable hasta el final del periodo de inanición. Por consiguiente, la relación R_{O_2}/Φ bajó durante este tiempo de valores de 1.30 a 0.75 en rotíferos y de 0.88 a 0.70 en misidáceos (Tabla 6.3). Los perfiles de tiempo de las concentraciones intracelulares de NAD, NADP, ADP y ATP fueron parecidos a los del R_{O_2} (Fig. 6.3). La concentración de las formas reducidas de NAD y NADP fueron superiores a las de las formas oxidadas durante todo el experimento. Por término medio, los niveles de NADH disminuyeron hasta el 70 % del valor inicial tanto en rotíferos como en misidáceos, mientras que el descenso de NADPH fue más pronunciado en rotíferos (hasta el 30 %) que en misidáceos (hasta el 50 %). Además, las relaciones $NAD^+/NADH$ y $NADP^+/NADPH$, que indican el estado redox de las células, descendieron en las dos especies durante este periodo, indicando un aumento en la proporción de las formas reducidas con la inanición. Paralelamente, la relación ATP/ADP fue superior durante las condiciones de recién alimentados que durante la ausencia de alimento.

Cuando se les restableció nuevamente la comida (línea vertical de puntos, Fig. 6.3), todas las variables aumentaron rápidamente en las primeras horas hasta valores próximos o incluso mayores a los iniciales, excepto la Φ que presentó un aumento más paulatino. Este aumento se reflejó asimismo en la relación R_{O_2}/Φ (Tabla 6.3).

Es bien sabido que la disponibilidad de alimento influye en las tasas metabólicas del zooplankton. El aumento en la respiración asociado con la alimentación se conoce como “acción dinámica específica” y representa el coste de los procesos de biosíntesis (Kiørboe et al., 1985). Por el contrario, las tasas de respiración de los organismos en inanición se relacionan normalmente con el metabolismo basal. En este trabajo se midieron unas tasas de respiración tanto en rotíferos como misidáceos alimentados a saturación dos veces superiores a las determinadas durante la inanición, concordando con otros resultados previos en el zooplankton (Almeda et al., 2011; Ikeda, 1977; Kiørboe et al., 1985; Mayzaud, 1976). Este descenso hasta unas tasas metabólicas basales se cree que aumenta la capacidad de supervivencia al disminuir el gasto energético (Tsuda, 1994). Además, la respuesta del R_{O_2} a los cambios en las condiciones tróficas fue prácticamente inmediata, tal y como demuestran el rápido descenso durante las primeras 2-6 h de inanición y la rápida recuperación cuando se les suministró de nuevo alimento. En esta línea, Thor (2003) observó que las tasas de respiración del copépodo *Acartia tonsa* en inanición aumentaba hasta valores incluso superiores a los medidos en copépodos bien alimentados cuando se les restablecía el alimento, coincidiendo con nuestros resultados. La respuesta de la ϕ específica por proteína fue más atenuada (Fig. 6.3). Mantener los enzimas durante una inanición a corto plazo constituye una adaptación ventajosa para los organismos que viven en hábitats con una disponibilidad de alimento altamente variable. De esta forma, se ha observado que las actividades enzimáticas disminuyen en menor medida que las tasas metabólicas durante los periodos de privación de alimento (Bamstedt, 1980; Finlay et al., 1983; Ikeda y Skjoldal, 1980; Packard et al., 1996). Otros estudios similares en *L. lingvura* durante la inanición mostraron un comportamiento parecido de las tasas fisiológicas y de las actividades enzimáticas en el metabolismo respiratorio (Herrera et al., 2011) así como en el metabolismo de excreción de amonio (Fernández-Urruzola et al., 2011). Además, Herrera et al. (2011) observó un descenso exponencial de la relación R_{O_2}/Φ con la inanición, que también fue registrado en nuestro experimento (Tabla 6.3). Los factores que contribuyen a

la variabilidad de este cociente en el plancton marino se han estudiado y discutido con anterioridad (e.g., *Capítulos 4 y 5* en esta tesis; Hernández-León y Gómez, 1996). Aquí, se han mostrado diferencias entre las especies y en respuesta a la escasez de alimento. Sin embargo, ambos organismos presentaron un rápido aumento similar en la relación R_{O_2}/Φ cuando se restableció el alimento.

Las concentraciones intracelulares de metabolitos siguieron el patrón descrito por el R_{O_2} . Los valores por biomasa de la concentración total de NAD (280 pmol mg prot⁻¹) y NADP (72 pmol mg prot⁻¹) en rotíferos fueron la mitad a los determinados en el dinoflagelado marino *Oxyrrhis marina* en un trabajo anterior (*Capítulo 5*). Por el contrario, los valores medios en los misidáceos bien alimentados (904 pmol NAD mg prot⁻¹ y 312 pmol NADP mg prot⁻¹) fueron ligeramente superiores a los de *O. marina*, y similares a los niveles registrados en otros organismos eucariotas (e.g., Agius et al., 2001; Umemura y Kimura, 2005). A pesar de que en este trabajo las formas reducidas fueron siempre superiores a las oxidadas, la relación NAD(P)⁺/NAD(P)H disminuyó desde condiciones de buena alimentación hasta la inanición, coincidiendo con lo descrito previamente en *O. marina* (*Capítulo 5*). De la misma forma, el contenido intracelular de nucleótidos de adenina (ADP y ATP) disminuyó con ausencia de alimento, concordando con los resultados presentados por Ikeda y Skjoldal, 1980.

(iii) Predicción del R_{O_2} a partir de un modelo cinético bisustrato. Con el fin de predecir el R_{O_2} , se aplicó el modelo de cinética bisustrato propuesto por Packard et al. (1996) y descrito en la Eq. III.4. Para ello, se determinaron las constantes de Michaelis (K_m) y de disociación (K_{ia}) para el NADH y el NADPH en *B. plicatilis* y *L. lingvura*. Para tratar de detectar una posible influencia de la disponibilidad de alimento en esas constantes, se realizaron varias réplicas en organismos bien alimentados y organismos en inanición. En mayor o en menor medida, todas las constantes cinéticas aumentaron durante la inanición. En rotíferos, estas diferencias fueron únicamente significativas para la K_{NADPH} (t de Student, $p < 0.05$), mientras que en misidáceos lo fue tanto para la K_{NADH} (t de Student, $p < 0.05$) como para las K_{ia} de NADH y NADPH (t de Student, $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente). En general, las K_m medidas en rotíferos y misidáceos fueron muy similares (Tabla 6.4), indicando una afinidad equiparable de los enzimas del ETS con el NADH y NADPH en

ambos organismos. Por el contrario, los valores de K_{ia} en misidáceos fueron generalmente superiores, revelando una unión entre la enzima y el sustrato más débil en estos organismos que en rotíferos.

Posteriormente, utilizando estas constantes cinéticas y las concentraciones de NADH y NADPH de la Fig. 6.3, se determinó el R_{O_2} modelado (V_{O_2}) aplicando la Eq. III.4. Las Figs. 6.4A y C muestran los perfiles de tiempo de R_{O_2} y V_{O_2} en rotíferos y misidáceos, respectivamente, expresados como porcentajes del valor inicial. Esta comparación evidenció que el V_{O_2} predecía con precisión el patrón del R_{O_2} en ambos tratamientos y organismos durante todo el experimento, aunque los valores modelados fueron inferiores, especialmente en rotíferos. De hecho, el R_{O_2} *in vivo* en ambos organismos mostró una correlación mucho mayor con los valores modelados de V_{O_2} ($r^2 = 0.83$ y 0.82 , para rotíferos y misidáceos, respectivamente) que con el R_{O_2} estimado a partir de los datos de Φ en la Fig. 6.3 y el valor fijo de R_{O_2}/Φ mostrado en la Tabla 6.2 (Figs. 6.4B y D). Además, la relación general entre el R_{O_2} y la relación intracelular del ADP reflejó una correlación significativa entre ambos ($r^2 = 0.77$, $p < 0.0001$, Fig. 6.5). Para evitar la variabilidad asociada a una biomasa diferente, las concentraciones de ADP se estandarizaron previamente con los valores de Φ .

En las aplicaciones anteriores de este modelo, se calculó el consumo fisiológico de O_2 a partir de medidas de la actividad del ETS, de constantes cinéticas tomadas de la literatura y de perfiles temporales modelados de los principales donadores de electrones del ETS (Packard et al., 1996; Aguiar-González et al., 2012). Sin embargo, la respiración determinada mediante el modelo cinético bisustrato concordó en gran medida con las tasas medidas *in vivo* en ambos estudios. En este trabajo, se obtuvo un éxito similar utilizando las concentraciones medidas de NADH y NADPH, y las constantes cinéticas determinadas empíricamente. Así, el V_{O_2} describió el mismo patrón que el R_{O_2} durante el experimento de inanición y posterior restitución del alimento, tanto en los rotíferos ($r^2 = 0.83$) como en los misidáceos ($r^2 = 0.82$) de ambos tratamientos (Fig. 6.4). Esta es la primera vez que se verificó la capacidad del modelo para predecir el R_{O_2} . De igual forma, se consiguió un resultado parecido al aplicar un modelo análogo para predecir el CO_2 producido durante la respiración a partir de medidas de la isocitrato deshidrogenasa, la enzima implicada en este proceso (Roy y Packard, 2001).

El modelo propuesto por Packard et al. (1996) se basó en la hipótesis de

que la limitación de sustratos en el V_{O_2} explicaba el descenso del R_{O_2} durante la inanición. Sus resultados apoyaron dicha hipótesis ya que la actividad *in vitro* del ETS se mantuvo constante durante este periodo y, además, las constantes cinéticas predijeron eficazmente el R_{O_2} a partir de la actividad del ETS. Nuestros resultados coincidieron asimismo con sus observaciones (Figs. 6.3 y 6.4). Por otro lado, Packard et al. (1996) expusieron dos premisas que podrían desafiar la aplicación del modelo en el caso de no ser ciertas. La primera fue que las concentraciones intracelulares de NADH y NADPH son dependientes de la disponibilidad de alimento y que, por lo tanto, sus niveles descenderán a medida que los organismos entran en inanición. En apoyo a ésto, nuestros resultados mostraron que las concentraciones de ambos nucleótidos disminuyeron durante la inanición y aumentaron rápidamente al restablecer el alimento (Figs. 6.3). Estas observaciones sugirieron, además, que tanto el NADH como el NADPH contribuyen al R_{O_2} , concordando con lo observado previamente por Owens y King (1975a) en el zooplancton. Asimismo, el hecho de que la $K_m < K_{ia}$ en todos los tratamientos (Tabla 6.4) indica que la unión de uno de los sustratos con la enzima favorece la unión con el otro sustrato (Bisswanger, 2008). Por consiguiente, la Eq. III.4 no podría ser reducida a una ecuación monosustrato de Michaelis-Menten más simple. La segunda premisa que Packard et al. (1996) asumieron para aplicar el modelo fue que las constantes cinéticas permanecían constantes en las diferentes etapas de crecimiento o en diferentes condiciones tróficas. Sin embargo, aquí hemos mostrado que ambas constantes muestran cierta variabilidad dependiendo de la especie y la disponibilidad de alimento (Tabla 6.4). Así, la K_{NADH} y la K_{NADPH} fueron similares en rotíferos y misidáceos, aunque ambas mostraron una influencia de la disponibilidad de alimento. La K_{ia} para el NADH y el NADPH, en cambio, fue más variable. Una posible explicación de esa variabilidad podría ser el efecto que los moduladores alostéricos (e.g. ADP, Ca^{2+}) podrían tener en los enzimas del ETS, modificando su afinidad por los sustratos (Brown, 1992). A pesar de todo, estas observaciones no impiden la aplicación del modelo propuesto por Packard et al. (1996) sino que evidencian que es necesario investigar más en esta línea. De hecho, por lo que sabemos, esta es la primera vez que se determinan las constantes cinéticas bisustrato del ETS en el plancton marino y, por lo tanto, no se sabe nada acerca de sus valores en diferentes grupos taxonómicos o cómo varían durante el ciclo de vida de los organismos, si es que lo hacen.

A pesar de la buena correlación entre el R_{O_2} y el V_{O_2} , los valores modela-

dos fueron inferiores a los medidos, como se desprende de las pendientes de las líneas de regresión en las Figs. 6.4B y D. Además, esta discrepancia fue mayor en los rotíferos que en los misidáceos. Una razón que explicaría esta subestima es la posible contribución del succinato en la actividad del ETS, que no se considera en el modelo. Así, el succinato dona electrones a la enzima succinato deshidrogenasa (complejo II) que, junto con la enzima NADH deshidrogenasa, dona equivalentes reducidos al aceptor común de electrones en el ETS, una quinona (Cowley y Palmer, 1980). Sin embargo, se ha demostrado que este sustrato presenta una escasa importancia en la reacción general (Finlay et al., 1983; Kenner y Ahmed 1975b; Savenkoff et al., 1995), y que incluso podría disminuir la V_{max} de la reacción al competir con el NADH (Owens y King, 1975a). Por lo tanto, es improbable que el succinato pueda explicar la diferencia entre el R_{O_2} y el V_{O_2} . La explicación más verosímil es que el R_{O_2} *in vivo* está controlado por otros factores además del aporte de sustratos. En efecto, desde que fue propuesto en el trabajo de Chance y Williams (1955), se ha demostrado ampliamente que el aumento en la concentración de ADP puede fomentar la síntesis de ATP y un aumento de la respiración y la utilización de sustratos. Durante la fosforilación oxidativa en las células eucariotas, los complejos enzimáticos que conforman el ETS en la membrana interna mitocondrial no solo transfieren electrones a otros transportadores sino que además, algunos de ellos (los complejos I, III y IV), translocan protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana. Ésto genera un gradiente de protones que es utilizado por la ATPasa para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Cuando la concentración relativa de ADP aumenta, la síntesis de ATP disminuye el gradiente de protones, lo que a su vez estimula la actividad de los complejos del ETS. Esto da lugar a la oxidación del NADH y NADPH mitocondrial y al consumo de O_2 . Por lo tanto, existe una relación directa entre la concentración de ADP y el R_{O_2} (ver revisión de Brown, 1992), que está asimismo reflejada en nuestros resultados (Fig. 6.5). No obstante, el ensayo enzimático *in vitro* del ETS conlleva una homogenización de las muestras, rompiendo las membranas y, por lo tanto, eliminando el gradiente de protones. De esta forma, este ensayo no considera el efecto adicional que ejerce el ADP sobre el consumo total de O_2 en las células intactas, siendo ésta probablemente la causa de las diferencias entre el R_{O_2} y el V_{O_2} . Nosotros sugerimos que si se introdujera un término adicional para el ADP en la Eq. III.4, el R_{O_2} y el V_{O_2} serían más parecidos. De igual forma, la influencia del ADP sobre el R_{O_2} *in vivo* podría explicar los

valores del cociente R_{O_2}/Φ superiores a 1 medidos tanto en este trabajo (Tabla 6.3) como en estudios previos (*Capítulo 5* de esta tesis; Hernández-León y Gómez, 1996; Herrera et al., 2011; King y Packard, 1975). Sin embargo, para determinar la contribución del ADP y cuantificar sus constantes cinéticas es necesario trabajar en células intactas o en mitocondrias aisladas.

La relación R_{O_2}/Φ ha sido comúnmente utilizada para interpretar las medidas de ETS en el océano. Sin embargo, la aplicación de un valor fijo universal requiere de un conocimiento previo del estado nutricional de los organismos, ya que se ha demostrado ampliamente que este cociente presenta una variabilidad con los cambios en las condiciones fisiológicas (*Capítulo 5* de esta tesis; Hernández-León y Gómez, 1996; Herrera et al., 2011; King y Packard, 1975). De lo contrario, se podrían estimar valores erróneos de R_{O_2} . Así, nuestros resultados mostraron una baja correlación entre el R_{O_2} *in vivo* y el R_{O_2} estimado a partir de medidas de ETS y unos cocientes fijos de R_{O_2}/Φ (Figs. 6.4B y D). En cambio, el V_{O_2} predijo mejor el patrón descrito por el R_{O_2} , a pesar de la subestima mencionada anteriormente. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la respiración del plánton en el medio marino se puede estimar con mayor precisión midiendo la actividad del ETS y la concentración de sus sustratos. Hasta que la contribución del ADP sea cuantificada e incluida en el modelo, el V_{O_2} deberá ser calibrado con el R_{O_2} .

IV Conclusiones generales

A partir de los resultados expuestos a lo largo de esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de un modelo conceptual basado en los perfiles de respiración de los microorganismos en la columna de agua (F_C) ha demostrado ser una herramienta útil para construir secciones sinópticas de flujo vertical de carbono en el afloramiento de Perú, que serían imposibles de realizar mediante otros métodos más tradicionales, como las trampas de sedimento. Además, se ha desarrollado el concepto “Eficiencia en la retención de nutrientes (NRE)”, que determina la capacidad de una comunidad planctónica de remineralizar el POC que se hunde, y se demostró que está inversamente relacionada con el F_C . Asimismo, se ha mostrado la utilidad de las medidas de la actividad del sistema de transporte de electrones respiratorio (ETS) para calcular las tasas potenciales de pro-

ducción heterotrófica de energía (HEP) en el océano asociadas con el metabolismo planctónico.

2. En el sistema de Benguela, la variabilidad temporal fue más importante en el patrón de sedimentación de partículas que la distancia con respecto al centro del afloramiento, debido principalmente a la inestabilidad que provocaron en esta región estructuras mesoescalares tales como remolinos y filamentos. La comparación de los valores de flujos de carbono obtenidos mediante el método del F_C y el flujo gravitacional de POC medido con las trampas de sedimento, demostró un desacople entre la demanda respiratoria de carbono de los organismos en la columna de agua y los valores de flujo vertical de POC. La magnitud de este desacople dependió de los niveles de productividad primaria, de la naturaleza de las partículas que se hundían y de su velocidad de sedimentación.
3. La temperatura del hábitat y el tamaño de los organismos fueron los factores principales a la hora de explicar la variabilidad de las tasas de consumo de O_2 (R_{O_2}) y de las actividades del ETS en el zooplancton de distintas regiones oceánicas. En cambio, la distinta productividad de las aguas fue el principal factor responsable de la variabilidad de las concentraciones intracelulares de piridín nucleótidos (NAD y NADP) en los mismos organismos. Debido al efecto desigual de estos factores, no se encontró la relación esperada entre los patrones del R_{O_2} y de los piridín nucleótidos.
4. La inanición mostró un mayor efecto sobre el R_{O_2} y la concentración intracelular de NAD y NADP que sobre la respiración potencial (Φ), tanto en el dinoflagelado heterótrofo *Oxyrrhis marina* como en el rotífero *Brachionus plicatilis* y el misidáceo *Leptomysis lingvura*. Como consecuencia, se encontró un descenso de la relación R_{O_2}/Φ al aumentar el tiempo de inanición en todos los organismos.
 - (a) La cuantificación del NAD y NADP, realizada por vez primera en estos organismos, reveló unos niveles específicos por proteína en *O. marina* y *B. plicatilis* similares a los registrados en bacterias, mientras que los valores en *L. lingvura* se encontraron dentro de los rangos descritos en otros eucariotas más complejos.

- (b) Inicialmente, la fuerte correlación encontrada entre el R_{O_2} y las concentraciones intracelulares de NAD y NADP durante la inanición en los dinoflagelados marinos sugirió una regulación de la respiración por los sustratos. Posteriormente, se demostró en rotíferos y misidáceos que esta regulación obedece las reglas de la cinética enzimática bisustrato.
 - (c) La respuesta de las Φ específicas de las tres especies de zooplankton frente a cambios en la disponibilidad de alimento fue más atenuada, lo que constituye una adaptación ventajosa para estos organismos que viven en ambientes donde los recursos son muy variables.
5. En general, la calidad del alimento no afectó a las concentraciones intracelulares de piridín y adenín nucleótidos en *B. plicatilis* y *L. lingvura* pero sí a su metabolismo respiratorio, principalmente al R_{O_2} . El efecto desigual en la Φ y el R_{O_2} sugiere que la calidad del alimento es un factor adicional que contribuye a la variabilidad observada de la relación R_{O_2}/Φ .
6. El modelo cinético bisustrato basado en la actividad del ETS, las constantes cinéticas y las concentraciones de sustrato, predice eficazmente el R_{O_2} , tanto en organismos bien alimentados como en inanición.
- (a) Durante la inanición, se encontró una mayor correlación del R_{O_2} *in vivo* con los valores de consumo de O_2 obtenidos a partir del modelo (V_{O_2}) que con los valores de R_{O_2} estimados a partir de la actividad de ETS y un cociente único de R_{O_2}/Φ . Estos resultados sugieren que, cuando se desconoce el estado nutricional de los organismos en el medio marino, la respiración puede ser determinada con mayor exactitud midiendo la actividad del ETS y la concentración de sustratos.
 - (b) La subestima de los valores modelados con respecto a los reales, junto con la fuerte correlación encontrada entre el R_{O_2} y la concentración de ADP en las células, sugieren un control adicional de la actividad del ETS *in vivo* por parte de este nucleótido, por lo que su contribución deberá ser tomada en cuenta en futuras aplicaciones de este modelo.

V Líneas futuras de investigación

A partir de las principales conclusiones obtenidas en esta tesis se evidencia la necesidad de abordar en el futuro ciertas cuestiones en cada uno de los siguientes aspectos:

(i) Desde el punto de vista biogeoquímico. La aplicación de un modelo basado en los perfiles de respiración ha demostrado ser una buena herramienta para determinar los flujos de C en los océanos, tanto espacial como temporalmente. Sin embargo, la comparación entre los valores obtenidos de esta manera y los registrados mediante una metodología más tradicional, como son las trampas de sedimento, se vió influida en gran medida por la naturaleza de las partículas que sedimentaban. Por lo tanto, sería conveniente comprobar si los patrones descritos en el *Capítulo 3* para el afloramiento de Benguela se repiten en otras zonas altamente productivas con una estructura de las comunidades diferente, tales como las aguas costeras o los afloramientos ecuatoriales. Asimismo, sería interesante aplicar esta metodología en aguas oligotróficas, donde la acumulación de materia orgánica en los sedimentos y la respiración bentónica son insignificantes. En estas zonas, las trampas de sedimento podrían subestimar los flujos verticales de carbono debido a la contribución del POC suspendido y al transporte lateral del mismo. El método basado en la respiración, en cambio, daría una estima más ajustada de la magnitud de los procesos de remineralización que tienen lugar en estas zonas.

(ii) Desde el punto de vista fisiológico. La variabilidad de las tasas fisiológicas de consumo de O_2 y de las actividades enzimáticas en diferentes grupos de zooplancton marino ha sido demostrada ampliamente, tanto en estudios previos de la literatura como a lo largo de esta tesis. De igual forma, la influencia de la calidad y la cantidad del alimento sobre el metabolismo respiratorio, así como la variabilidad asociada a la temperatura del hábitat ha sido estudiada en profundidad. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el efecto que tendría en el metabolismo del zooplancton uno de los factores físico-químicos de mayor relevancia en un escenario de cambio global: la acidificación oceánica. La mayoría de trabajos que han estudiado el efecto de esta acidificación en la biota marina se han centrado en los productores primarios. Cuando se considera el zooplancton, el número de estudios disminuye drásticamente, y no existe prácticamente información a cerca de su impacto en los procesos fisiológicos.

Debido al papel que juegan estos organismos en la remineralización de la materia orgánica en el océano, es fundamental conocer el impacto que tendría en el metabolismo respiratorio un aumento de los niveles de CO_2 y una disminución del pH en el agua de mar. Su estudio es, por tanto, imprescindible si se quieren realizar modelos de predicción de flujos de carbono fidedignos.

(iii) Desde el punto de vista bioquímico. La aplicación de un modelo cinético bisustrato ha arrojado luz sobre los mecanismos bioquímicos que controlan el consumo de O_2 en las células. En esta tesis se ha comprobado en dos especies de zooplankton marino que la actividad de los enzimas del ETS *in vivo* esta regulada por la concentración de sustratos de acuerdo a una cinética bisustrato. No obstante, los resultados obtenidos revelaron una serie de aspectos que deberían ser cuantificados y considerados en futuras aplicaciones de este modelo. En primer lugar, el estudio de las constantes cinéticas mostró una influencia de la disponibilidad de alimento, pero no detectó diferencias entre organismos. Sin embargo, estas observaciones están basadas únicamente en dos especies de zooplankton marino y en unas condiciones de alimentación muy concretas. Por lo tanto, con el fin de aplicar el modelo en una comunidad heterogénea de organismos en el medio marino, es necesario determinar estos parámetros cinéticos en un mayor número de especies de diversos grupos taxonómicos y comprobar su variabilidad bajo diferentes condiciones tróficas. En segundo lugar, el estudio sugirió que la contribución del ADP en la regulación de la respiración podría explicar las diferencias encontradas entre los valores modelados y los medidos *in vivo*. Sin embargo, para poder determinar esta contribución es necesario trabajar con mitocondrias aisladas ya que, de lo contrario, se produce el desacople entre la actividad del ETS y la producción de ATP. De esta forma, se podrían medir las constantes cinéticas del ADP y se incluiría un nuevo término para la activación en el modelo. Por otro lado, permitiría cuantificar con mayor precisión las concentraciones intramitocondriales de los metabolitos involucrados en el proceso de la respiración (e.g., NADH, NADPH, ADP, ATP), optimizándose así la aplicación del modelo.

References

- Agatova, A.I., Lapina, N.M., Torgunova, N.I., 2011. The rates of organic matter destruction in the central part of the Arctic Basin. *Oceanology* 51 (5), 775–784.
- Agius, S.C., Rasmusson, A.G., Moller, I.M., 2001. NAD(P) turnover in plant mitochondria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 461–470.
- Aguiar-González, B., Packard, T.T., Berdalet, E., Roy, S., Gómez, M., 2012. Respiration predicted from an Enzyme Kinetic Model and the Metabolic Theory of Ecology in two species of marine bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 412, 1–12.
- Alberty, R., Goldberg, R., 1992. Standard thermodynamic formation properties of adenosine 5'-triphosphate series. *Biochemistry* 31, 10610–10615.
- Alcaraz, M., Saiz, E., Calbet, A., Trepát, I., Broglio, E., 2003. Estimating zooplankton biomass through image analysis. *Mar. Biol.* 143 (2), 307–315.
- Almeda, R., Alcaraz, M., Calbet, A., Saiz, E., 2011. Metabolic rates and carbon budget of early developmental stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Limnol. Oceanogr.* 56 (1), 403–414.
- Alonso-González, I.J., Arístegui, J., Lee, C., Sanchez-Vidal, A., Calafat, A., Fabrès, J., Sangrá, P., Masqué, P., Hernández-Guerra, A., Benítez-Barrios, V., 2010. Role of slowly settling particles in the ocean carbon cycle. *Geophys. Res. Lett.* 37 (13), L13608.
- Alonso-González, I.J., Arístegui, J., Vilas, J.C., Hernández-Guerra, A., 2009. Lateral POC transport and consumption in surface and deep waters of the Canary Current region: A box model study. *Global Biogeochem. Cy.* 23 (2), n/a–n/a.
- Altabet, M.A., Deuser, W.G., Honjo, S., Stienen, C., 1991. Seasonal and depth-related changes in the source of sinking particles in the North Atlantic. *Nature* 354, 1–4.
- Andersen, K.B., von Meyenburg, K., 1977. Charges of nicotinamide adenine nucleotides and adenylate energy charge as regulatory parameters of the metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252 (12), 4151–4156.

- Anderson, R.F., Rowe, G.T., Kemp, P.F., Trumbore, S., Biscaye, P.E., 1994. Carbon budget for the mid-slope depocenter of the Middle Atlantic Bight. *Deep-Sea Res. II* 41 (2), 669–703.
- Arístegui, J., Duarte, C.M., Agustí, S., Doval, M., Álvarez-Salgado, X.A., Hansell, D.A., 2002. Dissolved Organic Carbon Support of Respiration in the Dark Ocean. *Science* 298 (5600), 1967.
- Arístegui, J., Gasol, J.M., Duarte, C.M., Herndl, G.J., 2009. Microbial Oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnol. Oceanogr.* 54 (5), 1501–1529.
- Arístegui, J., Hernández-León, S., Montero, M.F., Gómez, M., 2001. The seasonal planktonic cycle in coastal waters of the Canary Islands. *Sci. Mar.* 65 (1), 51–58.
- Arístegui, J., Montero, M.F., 1995. The relationship between community respiration and ETS activity in the ocean. *J. Plankton Res.* 17 (7), 1563–1571.
- Armstrong, R.A., Lee, C., Hedges, J.I., Honjo, S., Wakeham, S.G., 2001. A new, mechanistic model for organic carbon fluxes in the ocean based on the quantitative association of POC with ballast minerals. *Deep-Sea Res. II* 49 (1–3), 219–236.
- Arrieta, J.M., Mayol, E., Hansman, L., Herndl, G.J., Dittmar, T., Duarte, C.M., 2015. Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science* 348, 331–333.
- Bakun, A., Nelson, C.S., 1991. The seasonal cycle of wind-stress curl in subtropical Eastern Boundary Current regions. *J. Phys. Oceanogr.* 21 (12), 1815–1834.
- Baltar, F., Arístegui, J., Gasol, J.M., Sintes, E., Herndl, G.J., 2009. Evidence of prokaryotic metabolism on suspended particulate organic matter in the dark waters of the subtropical North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 54 (1), 182–193.
- Bamstedt, U., 1979. Seasonal variation in the respiration rate and ETS activity of deep-water zooplankton from the Swedish west coast. In: *Cyclic phenomena in marine plants and animals*. Pergamon Press, Oxford, pp. 267–274.
- Bamstedt, U., 1980. ETS activity as an estimator of respiratory rate of zooplankton populations. The significance of variations in environmental factors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 42 (3), 267–283.
- Barber, R.T., Dugdale, R.C., MacIsaac, J.J., Smith, R.L., 1971. Variations in phytoplankton growth associated with the source and conditioning of upwelling water. *Invest. Pesqu.* 35 (1), 171–193.

- Barber, R.T., Huntsman, S., Kogelshatz, J., Smith, W., Jones, B.H., 1978. Coastal Upwelling Ecosystems Analysis. Carbon, chlorophyll and light extinction from JOINT II. Tech. rep.
- Berelson, W.M., 2001. The flux of particulate organic carbon into the ocean interior: A comparison of four U.S. JGOFS Regional Studies. *Oceanol. Acta* 14 (4), 59–67.
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M.H., Ziegler, M., 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 29 (3), 111–118.
- Berger, W.H., Smetacek, V.S., Wefer, G., 1989. Ocean productivity and paleoproductivity - An overview. In: W.H. Berger, V.S. Smetacek, G. Wefer (Eds.), *Productivity of the Ocean Present and Past*. John Wiley & Sons Limited, pp. 1–34.
- Berger, W.H., Wefer, G., 1990. Export production: seasonality and intermittency, and paleoceanographic implications. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.* 89 (3), 245–254.
- Betzer, P.R., Showers, W.J., Laws, E.A., Winn, C.D., DiTullio, G.R., Kroopnick, P.M., 1984. Primary productivity and particle fluxes on a transect of the equator at 153°W in the Pacific Ocean. *Deep-Sea Res.* 31 (1), 1–11.
- Bidigare, R.R., 1983. Nitrogen excretion by marine zooplankton. In: E.J. Carpenter, D.G. Capone (Eds.), *Nitrogen in the marine environment*. Academic Press, Inc., New York, pp. 385–409.
- Bisswanger, H., 2008. *Enzyme kinetics: Principles and methods*. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 301 pp.
- Bode, M., Schukat, A., Hagen, W., Auel, H., 2013. Predicting metabolic rates of calanoid copepods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 444, 1–7.
- Boraas, M.E., Bennett, W.N., 1988. Steady-state rotifer growth in a two-stage, computer-controlled turbidostat. *J. Plankton Res.* 10 (5), 1023–1038.
- Boyd, P., Newton, P., 1995. Evidence of the potential influence of planktonic community structure on the interannual variability of particulate organic carbon flux. *Deep-Sea Res. I* 42 (5), 619–639.
- Boyer, D., Cole, J., Bartholomae, C., 2000. Southwestern Africa: Northern Benguela current region. *Mar. Pollut. Bull.* 41 (1-6), 123–140.
- Brink, K.H., Jones, B.H., Van Leer, J.C., Mooers, C.N.K., Stuart, D.W., Stevenson, M.R., Dugdale, R.C., Heburn, G.W., 1981. Physical and biological structure and variability in an upwelling center off Peru near 15°S during March, 1977. In: F.A. Richards (Ed.), *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union, Washington, D C, pp. 473–495.

- Brody, S., 1972. Regulation of pyridine nucleotide levels and ratios in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 247 (19), 1–6.
- Brown, A.M., 2001. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. Comp. Meth. Prog. Bio. 65 (3), 191–200.
- Brown, G.C., 1992. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. Biochem. J. 284, 1–13.
- Brown, P.C., Painting, S.J., Cochrane, K.L., 1991. Estimates of phytoplankton and bacterial biomass and production in the northern and southern Benguela ecosystems. S. Afr. J. Marine Sci. 11 (1), 537–564.
- Buesseler, K.O., 1991. Do upper-ocean sediment traps provide an accurate record of particle flux? Nature 353, 420–423.
- Buesseler, K.O., 1998. The decoupling of production and particulate export in the surface ocean. Global Biogeochem. Cy. 12 (2), 297–310.
- Buesseler, K.O., Antia, A.N., Chen, M., Fowler, S.W., Gardner, W.D., Gustafsson, O., Harada, K., Michaels, A.F., Loeff, M.R.V.D., Sarin, M., Steinberg, D.K., Trull, T., 2007a. An assessment of the use of sediment traps for estimating upper ocean particle fluxes. J. Mar. Res. 65, 345–416.
- Buesseler, K.O., Boyd, P.W., 2009. Shedding light on processes that control particle export and flux attenuation in the twilight zone of the open ocean. Limnol. Oceanogr. 54 (4), 1210–1232.
- Buesseler, K.O., Lamborg, C.H., Boyd, P.W., Lam, P.J., Trull, T.W., Bidigare, R.R., Bishop, J.K.B., Casciotti, K.L., Dehairs, F., Elskens, M., Honda, M., Karl, D.M., Siegel, D.A., Silver, M.W., Steinberg, D.K., Valdes, J., Mooy, B.V., Wilson, S., 2007b. Revisiting carbon flux through the ocean's twilight zone. Science 316 (April), 567–570.
- Burd, A.B., Hansell, D.A., Steinberg, D.K., Anderson, T.R., Arístegui, J., Baltar, F., Beupré, S.R., Buesseler, K.O., Dehairs, F., Jackson, G.A., Kadko, D.C., Koppelman, R., Lampitt, R.S., Nagata, T., Reinthaler, T., Robinson, C., Robison, B.H., Tamburini, C., Tanaka, T., 2010. Assessing the apparent imbalance between geochemical and biochemical indicators of meso- and bathypelagic biological activity What the @\$#! is wrong with present calculations of carbon budgets? Deep-Sea Res. II 57 (16), 1557–1571.
- Calbet, A., Isari, S., Martínez, R.A., Saiz, E., Garrido, S., Peters, J., Borrat, R.M., Alcaraz, M., 2013. Adaptations to feast and famine in different strains of the marine

- heterotrophic dinoflagellates *Gyrodinium dominans* and *Oxyrrhis marina*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 483, 67–84.
- Calbet, A., Landry, M.R., 1999. Mesozooplankton influences on the microbial food web: Direct and indirect trophic interactions in the oligotrophic open ocean. Limnol. Oceanogr. 44 (6), 1370–1380.
- Calbet, A., Landry, M.R., 2004. Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems. Limnol. Oceanogr. 49 (1), 51–57.
- Cammen, L.M., Corwin, S., Christensen, J.P., 1990. Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. Mar. Ecol. Prog. Ser. 65 (1), 171–182.
- Carlson, C.A., Hansell, D.A., Nelson, N.B., Siegel, D.A., Smethie, W.M., Khatiwala, S., Meyers, M.M., Halewood, E., 2010. Dissolved organic carbon export and subsequent remineralization in the mesopelagic and bathypelagic realms of the North Atlantic basin. Deep-Sea Res. II 57 (16), 1433–1445.
- Carr, M.E., 2001. Estimation of potential productivity in Eastern Boundary Currents using remote sensing. Deep-Sea Res. II 49 (1–3), 59–80.
- Chance, B., Williams, G.R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 217, 383–394.
- Chapman, P., Mitchell-Innes, B.A., Walker, D.R., 1994. Microplankton ETS measurements as a means of assessing respiration in the Benguela ecosystem. S. Afr. J. Marine Sci. 14, 297–312.
- Charland, M., 2002. SigmaPlot 2000/2001 for scientists. Riparian House, Ontario, p. 442.
- Chen, J., Strous, M., 2013. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. Biochim. Biophys. Acta 1827, 136–144.
- Christensen, J.P., Owens, T.G., Devol, A.H., Packard, T.T., 1980. Respiration and physiological state in marine bacteria. Mar. Biol. 55, 267–276.
- Christensen, J.P., Packard, T.T., 1977. Sediment metabolism from the northwest African upwelling system. Deep-Sea Res. 24, 331–343.
- Christensen, J.P., Packard, T.T., 1979. Respiratory electron transport activities in phytoplankton and bacteria: comparison of methods. Limnol. Oceanogr. 24 (3), 576–583.

- Christensen, J.P., Packard, T.T., Dortch, F.Q., I, M.H., Gascard, I.C., Richez, C., Garfield, P.C., 1989. Carbon oxidation in the deep Mediterranean sea: evidence for dissolved organic carbon source. *Global Biogeochem. Cy.* 3 (4), 315–335.
- Cleland, W.W., 1967. Enzyme kinetics. *Annu. Rev. Biochem.* 36 (1), 77–112.
- Codispoti, L.A., Brandes, J.A., Christensen, J.P., Devol, A., Naqvi, S., Paerl, H., Yoshinari, T., 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Sci. Mar.* 2, 85–105.
- Codispoti, L.A., Dugdale, R.C., Minas, A., 1982. A comparison of the nutrient regimes off northwest Africa, Peru and Baja California. *Rapp. P. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 180, 184–201.
- Codispoti, L.A., Packard, T.T., 1980. Denitrification rates in the Eastern tropical South Pacific. *J. Mar. Res.* 38, 453–477.
- Conover, R.J., 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 11, 338–345.
- Conover, R.J., Corner, E.D.S., 1968. Respiration and ammonium excretion by some marine zooplankton in relations to their life cycles. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 48, 49–75.
- Cowley, R.C., Palmer, J.M., 1980. The interaction between exogenous NADH oxidase and succinate oxidase in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria. *J. Exp. Bot.* 31, 199–207.
- Craig, H., 1971. The deep metabolism: oxygen consumption in abyssal ocean water. *J. Geophys. Res.* 76 (21), 5078–5086.
- Dale, A.W., Sommer, S., Lomnitz, U., Montes, I., Treude, T., Liebetrau, V., Gier, J., Hensen, C., Dengler, M., Stolpovsky, K., Bryant, L.D., Wallmann, K., 2015. Organic carbon production, mineralisation and preservation on the Peruvian margin. *Biogeosciences* 12 (5), 1537–1559.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Farías, L., Revsbech, N., 2012. Anamox and denitrification in the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 57, 1331–1346.
- Davison, A.C., Hinkley, D.V., 1997. Bootstrap methods and their application. Cambridge series in statistical and probabilistic mathematics, Cambridge University Press, Cambridge.
- De La Rocha, C.L., Passow, U., 2007. Factors influencing the sinking of POC and the efficiency of the biological carbon pump. *Deep-Sea Res. II* 54 (5-7), 639–658.

- De León, A.R., Braun, J.C., 1973. Annual cycle of primary production and its relation to nutrients in the Canary Islands waters. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 167, 1–24.
- del Giorgio, P.A., 1992. The relationship between ETS (electron transport system) activity and oxygen consumption in lake plankton: A cross-system calibration. *J. Plankton Res.* 14 (12), 1723–1741.
- del Giorgio, P.A., Duarte, C.M., 2002. Respiration in the open ocean. *Nature* 420, 379–384.
- Domingues, P.M., Turk, P.E., Andrade, J.P., Lee, P.G., 2001. Effects of different food items on the culture of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* (Crustacea: Pericadea) in a static water system. *Aquacult. Int.* 9, 393–400.
- Ducklow, H.W., 2000. Bacterial production and biomass in the oceans. In: D.L. Kirchman (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, New York, pp. 85–120.
- Ducklow, H.W., Doney, S.C., 2013. What Is the Metabolic State of the Oligotrophic Ocean? A Debate. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 5 (1), 525–533.
- Dugdale, R.C., Goering, J.J., 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12, 196–206.
- Eppley, R.W., Peterson, B.J., 1979. Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* 282, 677–680.
- Estrada, M., Marrasé, C., 1987. Phytoplankton biomass and productivity off the Namibian Coast. *S. Afr. J. Marine Sci.* 5 (1), 347–356.
- Faul, K.L., Paytan, A., Delaney, M.L., 2005. Phosphorus distribution in sinking oceanic particulate matter. *Mar. Chem.* 97 (3–4), 307–333.
- Fenchel, T., 1990. Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136 (3), 159–177.
- Fenchel, T., Finlay, B.J., 1983. Respiration rates in heterotrophic, free-living protozoa. *Microbial Ecol.* 9 (2), 99–122.
- Ferguson, S.J., 2010. ATP synthase: From sequence to ring size to the P/O ratio. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (39), 16755–16756.
- Fernández, C., Farías, L., Alcaman, M.E., 2009. Primary production and nitrogen regeneration processes in surface waters of the Peruvian upwelling system. *Prog. Oceanogr.* 83, 159–168.

- Fernández-Urruzola, I., Osma, N., Packard, T.T., Gómez, M., Postel, L., 2014. Distribution of zooplankton biomass and potential metabolic activities across the northern Benguela upwelling system. *J. Mar. Syst.* 140 (B), 138–149.
- Fernández-Urruzola, I., Packard, T.T., Gómez, M., 2011. GDH activity and ammonium excretion in the marine mysid, *Leptomysis lingvura*: Effects of age and starvation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409 (1-2), 21–29.
- Finlay, B.J., Span, A., Ochsenbein-Gattlen, C., 1983. Influence of physiological state on indices of respiration rate in protozoa. *Comp. Biochem. Physiol.* 74 (2), 211–219.
- Fisher, G., Wefer, G., 1996. Long-term observations of particle fluxes in the eastern Atlantic: seasonality, changes of flux with depth and comparison with the sediment record. In: G. Wefer, W.H. Berger, G. Siedler, D. Webb (Eds.), *The South Atlantic Ocean, Present and Past Circulation*. Springer, Berlin, pp. 325–344.
- Flynn, K.J., Davidson, K., Cunningham, A., 1996. Prey selection and rejection by a microflagellate: implications for the study and operations of microbial food webs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 196, 357–372.
- Gardner, W.D., 2000. Sediment trap sampling in surface waters. In: R.B. Hanson, H.W. Ducklow, J.G. Field (Eds.), *The Changing Ocean Carbon Cycle: A Midterm Synthesis of the Joint Global Ocean Flux Study*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp. 240–281.
- Garfield, P.C., Packard, T.T., Codispoti, L.A., 1979. Particulate protein in the Peru upwelling system. *Deep-Sea Res.* 26 (6A), 623–639.
- Giering, S.L.C., Sanders, R., Lampitt, R.S., Anderson, T.R., Tamburini, C., Boutrif, M., Zubkov, M.V., Marsay, C.M., Henson, S.A., Saw, K., Cook, K., Mayor, D.J., 2014. Reconciliation of the carbon budget in the ocean's twilight zone. *Nature*, 1–17.
- Giraudeau, J., Bailey, G.W., Pujol, C., 2000. A high-resolution time-series analyses of particle fluxes in the Northern Benguela coastal upwelling system: carbonate record of changes in biogenic production and particle transfer processes. *Deep-Sea Res.* II 47 (9-11), 1999–2028.
- Gismervik, I., 2006. Top-down impact by copepods on ciliate numbers and persistence depends on copepod and ciliate species composition. *J. Plankton Res.* 28 (5), 499–507.

- González, H.E., Daneri, G., Iriarte, J.L., Yannicelli, B., Menschel, E., Barría, C., Pantoja, S., Lizárraga, L., 2009. Carbon fluxes within the epipelagic zone of the Humboldt Current System off Chile: The significance of euphausiids and diatoms as key functional groups for the biological pump. *Prog. Oceanogr.* 83 (1-4), 217–227.
- Grasshoff, K., 1976. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 317 pp.
- Gruber, N., Sarmiento, J.L., 1997. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochem. Cy.* 11, 235–266.
- Guidi, L., Stemmann, L., Jackson, G.A., Ibanez, F., Claustre, H., Legendre, L., Picheral, M., Gorsky, G., 2009. Effects of phytoplankton community on production, size and export of large aggregates: A world-ocean analysis. *Limnol. Oceanogr.* 54 (6), 1951.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith, M.H. Chanley (Eds.), *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 108–132.
- Gust, G., Kozerski, H.P., 2000. In situ sinking-particle flux from collection rates of cylindrical traps. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208 (8), 93–106.
- Hafferty, A., Codispoti, L.A., Huyer, A., 1978. JOINT II R/V Melville, legs I, II and IV. Leg II bottle data, March 1977- May 1977. Tech. rep.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Schlitzer, R., 2012. Net removal of major marine dissolved organic carbon fractions in the subsurface ocean. *Global Biogeochem. Cy.* 26 (1), GB1016.
- Hansen, A., Wasmund, N., Ohde, T., 2014. Phytoplankton succession in aging upwelled waters off Namibia. *J. Mar. Syst.* 140 (B), 130–137.
- Hantzsche, F.M., Boersma, M., 2010. Dietary-induced responses in the phagotrophic flagellate *Oxyrrhis marina*. *Mar. Biol.* 157 (7), 1641–1651.
- Harris, R.P., Wiebe, P.H., Lenz, J., Skjoldal, H.R., Huntley, M., 2000. *ICES Zooplankton methodology manual*. Academic Press, San Diego, 684 pp.
- Harvey, H., 1955. *The Chemistry and Fertility of Sea Waters*. Cambridge University Press, Cambridge, 224 pp.
- Hatefi, Y., 1973. Oxidation of reduced triphosphopyridine nucleotide by submitochondrial particles from beef heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 978–984.

- Hernández-León, S., Almeida, C., Bécognée, P., Yebra, L., Arístegui, J., 2004. Zooplankton biomass and indices of grazing and metabolism during a late winter bloom in subtropical waters. *Mar. Biol.* 145 (6), 1191–1200.
- Hernández-León, S., Almeida, C., Portillo-Hahnefeld, A., Gómez, M., Rodríguez, J.M., Arístegui, J., 2002. Zooplankton biomass and indices of feeding and metabolism in relation to an upwelling filament off northwest Africa. *J. Mar. Res.* 60, 327–346.
- Hernández-León, S., Gómez, M., 1996. Factors affecting the respiration/ETS ratio in marine zooplankton. *J. Plankton Res.* 18 (2), 239–255.
- Hernández-León, S., Ikeda, T., 2005. A global assessment of mesozooplankton respiration in the ocean. *J. Plankton Res.* 27 (2), 153–158.
- Herrera, A., Gómez, M., Packard, T.T., de Puelles, M.L.F., 2014a. Zooplankton biomass and electron transport system activity around the Balearic Islands (western Mediterranean). *J. Mar. Sys.* 131 (C), 54–62.
- Herrera, A., Gómez, M., Packard, T.T., Reglero, P., Blanco, E., Barberá-Cebrián, C., 2014b. Potential respiration estimated by electron transport system activity in deep-sea suprabenthic crustaceans off Balearic Islands (Western Mediterranean). *J. Mar. Sys.* , 1–8.
- Herrera, A., Packard, T., Santana, A., Gómez, M., 2011. Effect of starvation and feeding on respiratory metabolism in *Leptomysis lingvura* (G.O. Sars, 1866). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409, 154–159.
- Honjo, S., Manganini, S.J., Krishfield, R.A., Francois, R., 2008. Particulate organic carbon fluxes to the ocean interior and factors controlling the biological pump: A synthesis of global sediment trap programs since 1983. *Prog. Oceanogr.* 76 (3), 217–285.
- Huenerlage, K., Buchholz, F., 2013. Krill of the northern Benguela Current and the Angola-Benguela frontal zone compared: physiological performance and short-term starvation in *Euphausia hanseni*. *J. Plankton Res.* 35 (2), 337–351.
- Ikeda, T., 1977. The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton. IV. Changes in respiration and excretion rates of boreal zooplankton species maintained under fed and starved conditions. *Mar. Biol.* 41 (3), 241–252.
- Ikeda, T., 1985. Metabolic rates of epipelagic marine zooplankton as a function of body mass and temperature. *Mar. Biol.* 85, 1–11.

- Ikeda, T., 2011. Metabolic activity of pelagic copepods from 5,000 to 7,000 m depth of the western subarctic Pacific, as inferred from electron transfer system (ETS) activity. *J. Oceanogr.* 67 (6), 785–790.
- Ikeda, T., Kanno, Y., Ozaki, K., Shinada, A., 2001. Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Mar. Biol.* 139, 587–596.
- Ikeda, T., Mitchell, A.W., 1982. Oxygen uptake, ammonia excretion and phosphate excretion by krill and other Antarctic zooplankton in relation to their body size and chemical composition. *Mar. Biol.* 71, 283–298.
- Ikeda, T., Skjoldal, H.R., 1980. The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton. VI. Changes in physiological activities and biochemical components of *Acetes sibogae australis* and *Acartia australis* after capture. *Mar. Biol.* 58, 285–293.
- Isla, J., Anadón, R., 2004. Mesozooplankton size-fractionated metabolism and feeding off NW Spain during autumn: effects of a poleward current. *ICES J. Mar. Sci.* 61 (4), 526–534.
- Iversen, M.H., Ploug, H., 2010. Ballast minerals and the sinking carbon flux in the ocean: carbon-specific respiration rates and sinking velocity of marine snow aggregates. *Biogeosciences* 7 (9), 2613–2624.
- Ivleva, I.V., 1980. The dependence of crustacean respiration rate on body mass and habitat temperature. *Int. Rev. Hydrobiol.* 65 (1), 1–47.
- Jaeger, J.M., Nittrouer, C.A., DeMaster, D.J., Kelchner, C., Dunbar, R.B., 1996. Lateral transport of settling particles in the Ross Sea and implications for the fate of biogenic material. *J. Geophys. Res.* 101 (C8), 18,479–18,488.
- Jenkins, W.J., 1982. Oxygen utilization rates in North Atlantic subtropical gyre and primary production in oligotrophic systems. *Nature* 300 (November), 246–248.
- Jenkins, W.J., 1984. The use of tracers and water masses to estimate rates of respiration, heterotrophic activity in the sea. In: J.E. Hobbie, P.J.I.B. Williams (Eds.), *Heterotrophic Activity in the Sea*. Plenum Press, New York, pp. 391–403.
- Jeong, H.J., Seong, K.A., Yoo, Y.D., Kim, T.H., Kang, N.S., Kim, S., Park, J.Y., Kim, J.S., Kim, G.H., Song, J.Y., 2008. Feeding and grazing impact by small marine heterotrophic dinoflagellates on heterotrophic bacteria. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55 (4), 271–288.

- Jiao, N., Zhang, Y., Zhou, K., Li, Q., Dai, M., Liu, J., Guo, J., Huang, B., 2014. Re-visiting the CO₂ "source" problem in upwelling areas: a comparative study on eddy upwellings in the South China Sea. *Biogeosciences* 11 (9), 2465–2475.
- Johnson, M.P., 2000. Physical control of plankton population abundance and dynamics in intertidal rock pools. *Hydrobiologia* 440, 145–152.
- Karl, D.M., 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol Rev.* 44 (4), 739–796.
- Karl, D.M., 2014. Solar energy capture and transformation in the sea. *Elementa: Science of the Anthropocene* 2 (1), 000021.
- Kasimova, M.R., Grigiene, J., Krab, K., Hagerdorn, P.H., Flyvbjerg, H., Andersen, P.E., Moller, I.M., 2006. The free NADH concentration is kept constant in plant mitochondria under different metabolic conditions. *Plant Cell* 18, 688–698.
- Kenner, R.a., Ahmed, S.I., 1975a. Correlation between oxygen utilization and electron transport activity in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33 (2), 129–133.
- Kenner, R.A., Ahmed, S.I., 1975b. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33, 119–127.
- King, F.D., Devol, A.H., Packard, T.T., 1978. On plankton biomass and metabolic activity from the eastern tropical North Pacific. *Deep-Sea Research* 25, 689–704.
- King, F.D., Packard, T.T., 1975. Respiration and the activity of the respiratory electron transport system in marine zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* , 849–854.
- King, L., 1981. The coastal upwelling ecosystems analysis program as an experience in international cooperation. *Ocean Dev. Int. L.* 9, 269–288.
- Kjørboe, T., Møhlenberg, F., Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 26, 85–97.
- Kirk, K.L., 1997. Life-history responses to variable environments: starvation and reproduction in planktonic rotifers. *Ecology* 78 (2), 434–441.
- Kleiber, M., 1961. The fire of life: an introduction to animal energetics. John Wiley & Sons Ltd, New York.
- Kogelshatz, J., Shepherd, R., Whitledge, T.L., Codispoti, L.A., Huyer, A., 1978. JOINT II JASON 76 hydro data, R/V EASTWARD cruises E-5F-76 through E-5L-76. Tech. rep.

- Kruger, N.J., von Schaewen, A., 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (3), 236–246.
- Landry, M., Calbet, A., 2004. Microzooplankton production in the oceans. *ICES J. Mar. Sci.* 61 (4), 501–507.
- Lane, N., 2002. *The molecule that made the world*. Oxford University Press, Oxford, 384 pp.
- Lane, N., 2005. *Power, sex, suicide: Mitochondria and the meaning of life*. Oxford University Press, Oxford, 368 pp.
- Lane, N., 2009. *Life ascending: The ten great inventions of evolution*. Oxford University Press, Oxford, 352 pp.
- Lane, N., Allen, J., Martin, W., 2010. How did LUCA make a living? Chemiosmosis in the origin of life. *BioEssays* 32, 271–280.
- Laufkötter, C., Vogt, M., Gruber, N., 2013. Long-term trends in ocean plankton production and particle export between 1960–2006. *Biogeosciences* 10 (11), 7373–7393.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed. W H Freeman, New York.
- Leipe, T., Knoppers, B., Marone, E., Camargo, R., 1999. Suspended matter transport in coral reef waters of the Abrolhos Bank, Brazil. *Geo-Mar. Lett.* 19 (3), 186–195.
- Lin, S.J., Guarente, L., 2003. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2), 241–246.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determinations of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658–666.
- London, J., Knight, M., 1966. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 44, 241–254.
- Lorenzen, C., 1970. Surface chlorophyll as an index of the depth, chlorophyll content, and primary productivity of the euphotic layer. *Limnol. Oceanogr.* 15 (3), 479–480.
- Lotka, A., 1925. *Elements of physical biology*. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 495 pp.
- Lowe, C.D., Martin, L.E., Roberts, E.C., Watts, P.C., Wootton, E.C., Montagnes, D.J.S., 2011. Collection, isolation and culturing strategies for *Oxyrrhis marina*. *J. Plankton Res.* 33 (4), 569–578.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A., 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis sp.*) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133, 295–309.
- Lussier, S.M., Kuhn, A., Chammas, M.J., Sewall, J., 1988. Techniques for the laboratory culture of *Mysidopsis* species (Crustacea: Mysidacea). *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 969–977.
- MacIsaac, J.J., Dugdale, R.C., Barber, R.T., Blasco, D., Packard, T.T., 1985. Primary production cycle in an upwelling center. *Deep-Sea Research* 32 (5), 503–529.
- Madigan, M.T., Martinko, J., Parker, J., 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 991 pp.
- Maldonado, F., Packard, T.T., Gómez, M., 2012. Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 434–435, 110–118.
- Manlapaz-Fernandez, P., Olivera, B.M., 1973. Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248 (14), 5067–5073.
- Mariotti, A., Lancelot, C., Billen, G., 1984. Natural isotopic composition of nitrogen as a tracer of origin for suspended organic matter in the Scheldt estuary. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 48 (3), 549–555.
- Marshall, S.M., Orr, A.P., 1958. On the biology of *Calanus finmarchicus*. X. Seasonal changes in oxygen consumption. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 37, 459–472.
- Martel, C.M., Flynn, K.J., 2008. Morphological controls on cannibalism in a planktonic marine phagotroph. *Protist* 159, 41–51.
- Martin, J.H., Knauer, G.A., Karl, D.M., Broenkow, W.W., 1987. VERTEX: carbon cycling in the northeast Pacific. *Deep-Sea Res.* 34 (2), 267–285.
- Martínez, I., Gómez, M., Packard, T.T., 2010. Potential respiration is a better respiratory predictor than biomass in young *Artemia salina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 390, 78–83.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G., 2000. *Biochemistry*. 3 ed. Addison-Wesley, Boston.

- Matin, A., Gottschal, J.C., 1976. Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentrations and ratios in a *Pseudomonas* sp. grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 94, 333–341.
- Mayzaud, P., 1976. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton. IV. The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. *Mar. Biol.* 37, 47 – 58.
- McKinnon, A.D., Doyle, J., Duggan, S., Logan, M., Lønborg, C., Brinkman, R., 2015. Zooplankton growth, respiration and grazing on the Australian margins of the tropical Indian and Pacific oceans. *PLOS ONE* 10 (10), e0140012–27.
- Menden-Deuer, S., Lessard, E.J., Satterberg, J., Grünbaum, D., 2005. Growth rates and starvation survival of three species of the pallium-feeding, thecate dinoflagellate genus *Protoperidinium*. *Aquat. Microb. Ecol.* 41, 145–152.
- Menzel, D.W., Ryther, J.H., 1961. Zooplankton in the Sargasso Sea off Bermuda and its relation to organic production. *J. Conseil* 26, 250–258.
- Meunier, C.L., Haafke, J., Oppermann, B., Boersma, M., Malzahn, A.M., 2012. Dynamic stoichiometric response to food quality fluctuations in the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *Mar. Biol.* 159 (10), 2241–2248.
- Minas, J., Codispoti, L.A., Dugdale, R.C., 1982. Nutrients and primary production in the upwelling region off northwest Africa. *Rapp. P. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 180, 148–183.
- Minutoli, R., Guglielmo, L., 2009. Zooplankton respiratory Electron Transport System (ETS) activity in the Mediterranean Sea: spatial and diel variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 381, 199–211.
- Minutoli, R., Guglielmo, L., 2012. Mesozooplankton carbon requirement in the Tyrrhenian Sea: its vertical distribution, diel variability and relation to particle flux. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 446, 91–105.
- Mitchell, P., 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 41 (3), 445–502.
- Mohrholz, V., Eggert, A., Junkers, T., Nausch, G., Ohde, T., Schmidt, M., 2014. Cross shelf hydrographic and hydrochemical conditions and their short term variability at the northern Benguela during a normal upwelling season. *J. Mar. Syst.* 140 (B), 92–110.
- Moller, I.M., Rasmusson, A.G., 1998. The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci.* 3 (1), 21–27.

- Montagnes, D.J.S., Lowe, C.D., Roberts, E.C., Breckels, M.N., Boakes, D.E., Davidson, K., Keeling, P.J., Slamovits, C.H., Steinke, M., Yang, Z., Watts, P.C., 2011. An introduction to the special issue: *Oxyrrhis marina*, a model organism? *J. Plankton Res.* 33 (4), 549–554.
- Monteiro, P.M.S., Nelson, G., van der Plas, A., Mabilhe, E., Bailey, G.W., Klingelhoeffer, E., 2005. Internal tide—shelf topography interactions as a forcing factor governing the large-scale distribution and burial fluxes of particulate organic matter (POM) in the Benguela upwelling system. *Cont. Shelf Res.* 25 (15), 1864–1876.
- Moran, L., Horton, R., Scrimgeour, K., Perry, M., 2012. *Principles of Biochemistry*. 5 ed. Prentice Hall Inc., Saddle River, New Jersey, 832 pp.
- Moran, S.B., Weinstein, S.E., Edmonds, H.N., Smith, J.N., Kelly, R.P., Pilson, M.E.Q., Harrison, W.G., 2003. Does $^{234}\text{Th}/^{238}\text{U}$ disequilibrium provide an accurate record of the export flux of particulate organic carbon from the upper ocean? *Limnol. Oceanogr.* 48 (3), 1018–1029.
- Muller-Karger, F., Varela, R., Thunell, R., Luerssen, R., Hu, C., Walsh, J.J., 2005. The importance of continental margins in the global carbon cycle. *Geophys. Res. Lett.* 32 (1), L01602.
- Naqvi, S.W.a., Shailaja, M.S., Dileep Kumar, M., Sen Gupta, R., 1996. Respiration rates in subsurface waters of the northern Indian Ocean: evidence for low decomposition rates of organic matter within the water column in the Bay of Bengal. *Deep-Sea Res.* II 43 (1), 73–81.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth, New York, 1152 pp.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M., 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. MacMillan, New York, 1302 pp.
- Noctor, G., Queval, G., Gakière, B., 2006. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J. Exp. Bot.* 57 (8), 1603–1620.
- Ochoa, S., 1943. Efficiency of aerobic phosphorylation in cell-free heart extracts. *J. Biol. Chem.* 151, 493–505.
- Odum, H.T., 1956. Primary production in flowing waters. *Limnol. Oceanogr.* 1, 102–117.

- Osma, N., Fernández-Urruzola, I., Packard, T.T., Postel, L., Gómez, M., Pollehne, F., 2014. Short-term patterns of vertical particle flux in northern Benguela: a comparison between sinking POC and respiratory carbon consumption. *J. Mar. Syst.* 140 (B), 150–162.
- Owens, T., King, F.D., 1975a. The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30 (1), 27–36.
- Owens, T.G., King, F.D., 1975b. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30 (1), 27–36.
- Pace, M.L., Knauer, G.A., Karl, D.M., Martin, J.H., 1987. Primary production, new production and vertical flux in the eastern Pacific Ocean. *Nature* 325 (6107), 803–804.
- Packard, T.T., 1969. The estimation of the oxygen utilization rate in seawater from the activity of the respiration electron transport system in plankton. Ph.D. thesis, Seattle.
- Packard, T.T., 1971. The measurement of respiratory electron-transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 29 (3), 235–244.
- Packard, T.T., 1981. Organizers remarks: Coastal upwelling. In: F.A. Richards (Ed.), *Coastal and estuarine science*. American Geophysical Union, Washington DC, pp. xi–xiii.
- Packard, T.T., 1985a. Measurement of electron transport activity of microplankton. In: P.J.L. Williams, H.W. Jannasch (Eds.), *Advances in aquatic microbiology*. Academic Press, New York, pp. 207–261.
- Packard, T.T., 1985b. Oxygen consumption in the ocean: Measuring and mapping with enzyme analysis. In: A. Zirino (Ed.), *Mapping Strategies in Chemical Oceanography*. American Chemical Society, Washington D.C., pp. 177–209.
- Packard, T.T., Berdalet, E., Blasco, D., Roy, S.O., St-Amand, L., Lagacé, B., Lee, K., Gagné, J.P., 1996. Oxygen consumption in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* predicted from ETS activity and bisubstrate enzyme kinetics. *J. Plankton Res.* 18 (10), 1819–1835.
- Packard, T.T., Blasco, D., Dugdale, R.C., 1986. Coastal upwelling: a synopsis of it's physical, chemical and biological characteristics. In: B.U. Haq, J.D. Milliman (Eds.), *Marine geology and oceanography of Arabian sea and coastal Pakistan*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 339–350.
- Packard, T.T., Blasco, D., Estrada, M., 2004. Modeling physiological processes in plankton on enzyme kinetic principles. *Sci. Mar.* 68 (Suppl. 1), 49–56.

- Packard, T.T., Christensen, J.P., 2004. Respiration and vertical carbon flux in the Gulf of Maine water column. *J. Mar. Res.* 62, 93–115.
- Packard, T.T., Codispoti, L.A., 2007. Respiration, mineralization, and biochemical properties of the particulate matter in the southern Nansen Basin water column in April 1981. *Deep-Sea Res. I* 54, 403–414.
- Packard, T.T., Denis, M., Rodier, M., Garfield, P., 1988. Deep-ocean metabolic CO₂ production : calculations from ETS activity. *Deep-Sea Res.* 35 (3), 371–382.
- Packard, T.T., Devol, A.H., King, F.D., 1975. The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton. *Deep-Sea Res.* 22, 237–249.
- Packard, T.T., Garfield, P.C., Codispoti, L., 1983. Oxygen consumption and denitrification below the Peruvian upwelling. *NATO Conf. Ser.* , 147–173.
- Packard, T.T., Gómez, M., 2008. Exploring a first-principles-based model for zooplankton respiration. *ICES J. Mar. Sci.* 65 (3), 371–378.
- Packard, T.T., Gómez, M., 2013. Modeling vertical carbon flux from zooplankton respiration. *Prog. Oceanogr.* 110 (C), 59–68.
- Packard, T.T., Harmon, D., Boucher, J., 1974. Respiratory electron transport activity in plankton from upwelled waters. *Tethys* 6 (1-2), 213–222.
- Packard, T.T., Healy, M.L., Richards, F.A., 1971. Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton. *Limnol. Oceanogr.* 16 (1), 60–70.
- Packard, T.T., Jones, V., 1976. Biochemistry and ecology of the Peru Current: The JASON expedition to the Peru upwelling system. Tech. rep.
- Packard, T.T., Minas, H.J., Owens, T.G., Devol, A.H., 1977. Deep sea metabolism in the Eastern tropical North Pacific ocean. In: N.R. Andersen, B.J. Zahuranec (Eds.), *Oceanic sound scattering prediction*. Plenum Press, New York, pp. 101–116.
- Packard, T.T., Osma, N., Fernández-Urruzola, I., Codispoti, L.A., Christensen, J.P., Gómez, M., 2015. Peruvian upwelling plankton respiration: calculations of carbon flux, nutrient retention efficiency, and heterotrophic energy production. *Biogeosciences* 12 (9), 2641–2654.
- Packard, T.T., Williams, P.J.L., 1981. Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the northwest Atlantic. *Oceanol. Acta* 4 (3), 351–358.

- Pamatmat, M., Graf, G., Bengtsson, W., Novak, C., 1981. Heat production, ATP concentration and electron transport activity of marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4, 135–143.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. *Manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, New York, 173 pp.
- Paytan, A., Cade-Menun, B.J., McLaughlin, K., Faul, K.L., 2003. Selective phosphorus regeneration of sinking marine particles: evidence from ^{31}P -NMR. *Mar. Chem.* 82 (1-2), 55–70.
- Pilskaln, C.H., Paduan, J.B., Chavez, F.P., Anderson, R.Y., Berelson, W.M., 1996. Carbon export and regeneration in the coastal upwelling system of Monterey Bay, central California. *J. Mar. Res.* 54, 1149–1178.
- Pollak, N., Dölle, C., Ziegler, M., 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.* 402 (2), 205–14.
- Pollehne, F., Klein, B., Zeitzschel, B., 1993a. Low light adaptation and export production in the deep chlorophyll maximum layer in the northern Indian Ocean. *Deep-Sea Res. II* 40 (3), 737–752.
- Pollehne, F., Zeitzschel, B., Peinert, R., 1993b. Short-term sedimentation patterns in the northern Indian Ocean. *Deep-Sea Res. II* 40 (3), 821–831.
- Postel, L., Fock, H., Hagen, W., 2000. Biomass and abundance. In: R.P. Harris, P.H. Wiebe, J. Lenz, H.R. Skjoldal, M. Huntley (Eds.), *ICES Zooplankton methodology manual*. Academic Press, San Diego, pp. 83–192.
- Primeau, F., 2006. On the variability of the exponent in the power law depth dependence of POC flux estimated from sediment traps. *Deep-Sea Res. I* 53 (8), 1335–1343.
- Redfield, A.C., Ketchum, B., Richards, F., 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In: M.N. Hill (Ed.), *The Seas*. Interscience, New York, pp. 26–77.
- Reinthal, T., van Aken, H., Veth, C., Arístegui, J., Robinson, C., Williams, P.J.I.B., Lebaron, P., Herndl, G.J., 2006. Prokaryotic respiration and production in the meso- and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin. *Limnol. Oceanogr.* 51 (3), 1262–1273.
- Richards, F.A., 1957. Oxygen in the Ocean. In: J.W. Hedgpeth (Ed.), *Treatise on Marine Ecology and Paleoecology*. Geological Society of America, pp. 185–238.

- Richards, F.A., 1965. Anoxic Basins and Fjords. In: J.P. Riley, G. Skirrow (Eds.), *Chemical Oceanography*. Academic Press, pp. 611–645.
- Richards, F.A., 1981. *Coastal Upwelling*. American Geophysical Union, Washington DC, 529 pp.
- Riley, G., 1951. Oxygen, phosphate and nitrate in the Atlantic Ocean. *Bull. Bingham Oceanogr. Collect.* 13, 1–169.
- Romero, O., Boeckel, B., Donner, B., Lavik, G., Fischer, G., Wefer, G., 2002. Seasonal productivity dynamics in the pelagic central Benguela System inferred from the flux of carbonate and silicate organisms. *J. Mar. Sys.* 37, 259–278.
- Romero-Kutzner, V., Packard, T.T., Berdalet, E., Roy, S.O., Gagné, J.P., Gómez, M., 2015. Respiration quotient variability: bacterial evidence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 519, 47–59.
- Roy, S.O., Packard, T.T., 2001. CO₂ production rate predicted from isocitrate dehydrogenase activity, intracellular substrate concentrations and kinetic constants in the marine bacterium *Pseudomonas nautica*. *Mar. Biol.* 138, 1251–1258.
- Rutter, W.J., 1967. Protein determinations in embryos. In: F.H. Wilt, N.K. Wessels (Eds.), *Methods in developmental biology*. Academic Press, New York, pp. 671–684.
- Rykaczewski, R., Checkley, D., 2008. Influence of ocean winds on the pelagic ecosystem in upwelling regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 1065–1070.
- Ryther, J.H., Menzel, D.W., Hulburt, E., Lorenzen, C., Corwin, N., 1970. Production and utilization of organic matter in the Peru Coastal Current. *Anton Brun Reports* 4, 4.3–4.12.
- Sameoto, D.D., Wiebe, P.H., Runge, J., Postel, L., Dunn, J., Miller, C.A., Coombs, S., 2000. Collecting zooplankton. In: *ICES Zooplankton methodology manual*. Academic Press, San Diego, pp. 55–81.
- Santoso, A., McGregor, S., Jin, F., Cai, W., England, M., An, S., McPhaden, M., Guilyardi, E., 2013. Late-twentieth-century emergence of the El Niño propagation asymmetry and future projections. *Nature* 504, 126–130.
- Sarmiento, J.L., Slater, R.D., Fasham, M., Ducklow, H.W., Toggweiler, J.R., Evans, G.T., 1993. A seasonal three dimensional ecosystem model of nitrogen cycling in the North Atlantic euphotic zone. *Global Biogeochem. Cy.* 7 (2), 417–450.

- Savenkoff, C., Packard, T.T., Rodier, M., Gérino, M., Lefevre, D., Denis, M., 1995. Relative contribution of dehydrogenases to overall respiratory ETS activity in some marine organisms. *J. Plankton Res.* 17 (8), 1593–1604.
- Schlitzer, R., 2000. Applying the adjoint method for biogeochemical modeling: export of particulate organic matter in the world ocean. In: P. Kasibhatla, M. Heimann, P. Rayner, N. Mahowald, R.G. Prinn, D.E. Hartley (Eds.), *Inverse methods in Global Biogeochemical Cycles*. American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 107–124.
- Schlitzer, R., Usbeck, R., Fischer, G., 2003. Inverse Modeling of Particulate Organic Carbon Fluxes in the South Atlantic. In: G. Wefer, S. Mulitza, V. Ratmeyer (Eds.), *The South Atlantic in the Late Quaternary: Reconstruction of Material Budgets and Current Systems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Tokyo, pp. 1–19.
- Schmoker, C., Arístegui, J., Hernández-León, S., 2012. Planktonic biomass variability during a late winter bloom in the subtropical waters off the Canary Islands. *J. Mar. Syst.* 95, 24–31.
- Schmoker, C., Hernández-León, S., 2013. Stratification effects on the plankton of the subtropical Canary Current. *Prog. Oceanogr.* 119 (C), 24–31.
- Schmoker, C., Ojeda, A., Hernández-León, S., 2014. Patterns of plankton communities in subtropical waters off the Canary Islands during the late winter bloom. *J. Sea Res.* 85 (C), 155–161.
- Schomer, B., Epel, D., 1998. Redox changes during fertilization and maturation of marine invertebrate eggs. *Dev. Biol.* 203, 1–11.
- Segel, I.H., 1993. Enzyme kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, Inc., New York, 992 pp.
- Seiwell, H., 1934. The distribution of oxygen in the western basin of the North Atlantic. *Pap. Phys. Oceanogr. Meteor* 3, 1–86.
- Seiwell, H., 1937. Consumption of oxygen in seawater under controlled laboratory conditions. *Nature* 140, 506–507.
- Setlow, B., Setlow, P., 1977. Levels of oxidized and reduced pyridine nucleotides in dormant spores and during growth, sporulation, and spore germination of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 129 (2), 857–865.
- Shannon, L.V., Nelson, G., 1996. The Benguela: large scale features and processes and system variability. In: G. Wefer, W.H. Berger, G. Siedler, D. Webb (Eds.), *The South Atlantic ocean, present and past circulation*. Springer, Berlin, pp. 163–210.

- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 293–308.
- Shillington, F.A., Hutchings, L., Probyn, T.A., Waldron, H.N., Peterson, W.T., 1992. Filaments and the Benguela frontal zone: offshore advection or recirculating loops? *S. Afr. J. Marine Sci.* 12 (1), 207–218.
- Simon, M., Azam, F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201–213.
- Smith, R.L., 1968. Upwelling. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* 6, 11–46.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1994. Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotech. Bioeng.* 44, 837–848.
- Steinberg, D.K., Mooy, B.A.S.V., Buesseler, K.O., Boyd, P.W., Kobari, T., Karl, D.M., 2008. Bacterial vs. zooplankton control of sinking particle flux in the ocean's twilight zone. *Limnol. Oceanogr.* 53 (4), 1327–1338.
- Strittmatter, P., 1968. Microsomal electron transport. In: T.P. Singer (Ed.), *Biological oxidations*. Wiley Interscience, New York, pp. 171–192.
- Strom, S.L., 1991. Growth and grazing rates of the herbivorous dinoflagellate *Gymnodinium* sp. from the open subarctic Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 78, 103–113.
- Stubbs, M., Veech, R.L., Krebs, H.A., 1972. Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm. *Biochem. J.* 126, 59–65.
- Suess, E., 1980. Particulate organic carbon flux in the oceans-surface productivity and oxygen utilization. *Nature* 288, 260–263.
- Takahashi, T., Broecker, W.S., Langer, S., 1985. Redfield ratio based on chemical data from isopycnal surfaces. *J. Geophys. Res.* 90 (C4), 6907–6924.
- Thor, P., 2003. Elevated respiration rates of the neritic copepod *Acartia tonsa* during recovery from starvation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 283 (1–2), 133–143.
- Thornton, D.C.O., 2002. Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *Eur. J. Phycol.* 37 (2), 149–161.
- Tsuda, A., 1994. Starvation tolerance of a planktonic marine copepod *Pseudocalanus newmani* Frost. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 181 (1), 81–89.

- Umemura, K., Kimura, H., 2005. Determination of oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in cell monolayers using a single extraction procedure and a spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.* 338, 131–135.
- UNESCO, 1968. Zooplankton sampling. In: *Monography of Oceanographical Methods*. pp. 1–174.
- Usbeck, R., Schlitzer, R., Fischer, G., Wefer, G., 2003. Particle fluxes in the ocean: comparison of sediment trap data with results from inverse modeling. *J. Mar. Sys.* 39 (3–4), 167–183.
- van Loosdrecht, M.C.M., Smolders, G.J.F., Kuba, T., Heijnen, J.J., 1997. Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek* 71 (1–2), 109–116.
- Vinogradov, M.E., Menshutkin, V.V., Shushkina, E.A., 1972. On mathematical simulation of a pelagic ecosystem in tropical waters of the ocean. *Mar. Biol.* 16, 261–268.
- Volk, T., Hoffert, M.I., 1985. Ocean carbon pumps: analysis of relative strengths and efficiencies in ocean-driven atmospheric CO₂ changes. *Geophys. Monogr.* 32, 99–110.
- von Bodungen, B., Wunsch, M., Fürderer, H., 1991. Sampling and analysis of suspended and sinking particles in the northern North Atlantic. *Geophys. Monogr.* 63 (3), 47–56.
- Vosjan, J.H., 1982. Respiratory electron transport system activities in marine environments. *Hydrobiol. Bull.* 16 (1), 61–68.
- Wagner, T.C., Scott, M.D., 1994. Single extraction method for the spectrophotometric quantification of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes. *Anal. Biochem.* 222, 417–426.
- Walker, J.E., 1998. ATP synthesis by rotary catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 37 (17), 2308–2319.
- Walsh, J.J., 1972. Implications of a systems approach to oceanography. *Science* 176, 696–975.
- Walsh, J.J., Kelly, J.C., Dugdale, R.C., Frost, B.W., 1971. Gross features of the Peruvian upwelling system with special reference to possible diel variation. *Invest. Pesq.* 35, 25–42.
- Walsh, J.J., Rowe, G.T., Iverson, R.L., McRoy, C.P., 1981. Biological export of shelf carbon is a sink of the global CO₂ cycle. *Nature* 291, 196–201.

- Watt, N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16823–16827.
- Watts, P.C., Martin, L.E., Kimmance, S.A., Montagnes, D.J.S., Lowe, C.D., 2011. The distribution of *Oxyrrhis marina*: a global disperser or poorly characterized endemic? *J. Plankton Res.* 33 (4), 579–589.
- Williams, P.J.I.B., Quay, P.D., Westberry, T.K., Behrenfeld, M.J., 2013. The Oligotrophic Ocean Is Autotrophic*. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 5 (1), 535–549.
- Wilson, S., Kolber, Z., Tozzi, S., Zehr, J.P., Karl, D.M., 2012. Nitrogen fixation, hydrogen cycling and electron transport kinetics in *Trichodesmium erythraeum* (cyanobacteria) strain ims1011. *J. Phycol.* 48, 595–606.
- Wimpenny, J.W.T., Firth, A., 1972. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. Bacteriol.* 111 (1), 24–32.
- Wirtky, K., 1967. Circulation and water masses in the Eastern equatorial Pacific Ocean. *Int. J. Oceanol. Limnol.* 1, 117–147.
- Wooster, W., 1961. Yearly changes in the Peru Current. *Limnol. Oceanogr.* 6, 222–226.
- Yentsch, C.S., Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Research I* 10, 221–231.
- Ying, W., 2008. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signaling* 10 (2), 179–206.
- Zheng, Y., Schlosser, P., Swift, J., Jones, E., 1997. Oxygen utilization rates in the Nansen Basin, Arctic Ocean: Implications for new production. *Deep-Sea Research I* 44, 1923–1943.
- Ziegler, M., 2005. A vital link between energy and signal transduction. Regulatory functions of NAD(P). *FEBS J.* 272, 4561–4564.

APPENDIX APÉNDICE

Appendix I. Rotifers and mysids showing morphological changes in relation to food quantity and quality

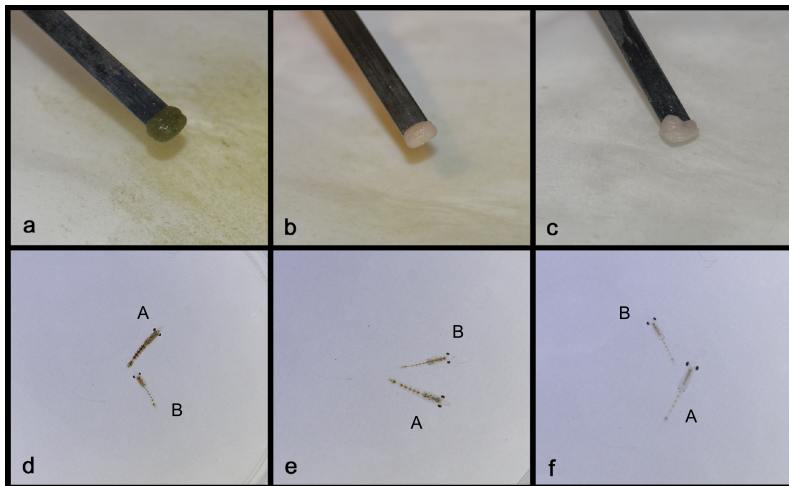


Figure A.1: The rotifer *Brachionus plicatilis* (upper panels) and the mysid *Leptomysis lingvura* (bottom panels), showing morphological differences in individuals grown under different diets and food levels: (a) *B. plicatilis* fed at saturation with the microalgae *Nannochloropsis oculata*; (b) *B. plicatilis* fed at saturation with dry yeast; (c) *B. plicatilis* fed with the microalgae *Nannochloropsis oculata* after 48 h starvation; (d) *L. lingvura* fed at saturation with *Artemia salina* (A) and with *B. plicatilis* (B), (e) after 12 h starvation, and (f) after 60 h starvation.

Appendix II. Another published article related with this thesis

AII.1 Fernández-Urruzola, I., **Osma, N.**, Packard, T.T., Gómez, M., Postel, L., 2014. Distribution of zooplankton biomass and potential metabolic activities across the northern Benguela upwelling system. *J. Mar. Syst.* 140 (B), 138 - 149.



Distribution of zooplankton biomass and potential metabolic activities across the northern Benguela upwelling system



I. Fernández-Urruzola^{a,*}, N. Osma^a, T.T. Packard^a, M. Gómez^a, L. Postel^b

^a Plankton Ecophysiology Group, Instituto de Oceanografía y Cambio Global, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Canary Islands, Spain

^b Zooplankton Ecology Group, Baltic Sea Research Institute, D-18119 Rostock, Warnemünde, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2013

Received in revised form 14 May 2014

Accepted 16 May 2014

Available online 24 May 2014

Keywords:

Zooplankton

Biomass

Electron transport system (ETS)

Glutamate dehydrogenase (GDH)

Benguela upwelling system

ABSTRACT

The distribution of zooplankton biomass and potential metabolic rates, in terms of electron transport system (ETS) and glutamate dehydrogenase (GDH), were analyzed along a cross-shelf transect in waters off Namibia. The highly variable dynamics of upwelling filaments promoted short-term fluctuations in the zooplankton biomass and metabolism. Maximum values were characteristically found over the shelf-break, where zooplankton biomass as dry mass (DM) reached peaks of 64.5 mg m^{-3} within the upper 200 m in late August. Two weeks later, the zooplankton-DM decreased by more than a third (19 mg DM m^{-3}). Zooplankton potential respiration and NH_4^+ excretion averaged $234 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $169 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ in the Namibian shelf, respectively. High protein-specific ETS activities even in the low-chlorophyll waters outside the filament suggested a shift into greater omnivory seaward. In this light, zooplankton elemental and isotopic compositions were used to investigate the pelagic food web interactions. They evidenced spatial changes in the carbon resource for zooplankton as well as changes in the form of nitrogen that fueled the biological production in aging advected waters. Overall, both aspects of zooplankton metabolism impacted the primary productivity at a level less than 10% under all the different oceanographic conditions.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Upwelling ecosystems are among the most productive areas in the ocean. They mainly occur along the eastern boundaries of an ocean where the wind-driven divergence forces deep cold waters, rich in nutrients, into the sunlit layer. Both nutrient enrichment and light availability together, provide a suitable environment for sustaining high biological productivity. One of the major eastern boundary current systems of the world is the Benguela, which is divided in two sub-systems by a permanent upwelling cell located around $27\text{--}28^\circ\text{S}$ (Boyer et al., 2000). Here, the northern part is the focus of investigation. It is limited by the warm water of the Angola–Benguela Front (Shannon, 2001) and exhibits important instabilities at short temporal and spatial scales in addition to the well-documented interannual fluctuations (Hutchings et al., 2009; Shannon and Nelson, 1996). Both oceanographic and atmospheric forces intensify the upwelling pulses during the austral winter and spring, and relax them in autumn (Boyd et al., 1987). Other processes such as jets and filaments emerging from the perennial cell also promote the variability in the northern Benguela ecosystem. These mesoscale structures will ultimately impact the plankton populations dynamics.

In this and in all upwelling systems, mesozooplankton play a key role in the mass and energy flows through the food web (Moloney, 1992). They are the primary food resource for fish larvae and consequently, the main trophic link to the top predators. In recognizing the importance of zooplankton in the Benguela system, several studies have paid attention to its spatial distribution (Hansen et al., 2005; Olivar and Barangé, 1990; Postel et al., 2007; Verheye and Hutchings, 1988, among others), as well as to the long-term trends in the zooplankton abundance (Verheye et al., 1998) and biomass (Hugggett et al., 2009). Changes in the community composition (Gibbons and Hutchings, 1996; Verheye et al., 2001), ecology (Gibbons et al., 1992; Verheye et al., 1992) and secondary production (Hutchings et al., 1991; Richardson and Verheye, 1999) in relation to physical and biological forcings have also been described in the last decades. However, these studies have not considered the short-term zooplankton structural dynamics caused by successive upwelling-relaxation events, filaments or eddies which take place in a particular region. Wind-driven offshore advection, for instance, causes the stratified plankton-rich waters to be rapidly replaced by deeper waters, which introduce a new batch of nutrients into the photic layer, but little plankton. Accordingly, the inherent variability of these chemical and physical phenomena constrains the integrity of biological communities on the order of days.

Furthermore, the instability of the oceanographic setting also affects the physiological dynamics of zooplankton (Gaudy and Youssara, 2003). Respiration and NH_4^+ excretion are important processes in marine

* Corresponding author. Tel.: +34 928 45 44 73; fax: +34 928 45 29 22.
E-mail address: ifernandez@becarios.ulpgc.es (I. Fernández-Urruzola).

ecology, as the balance between synthesis and demand of both carbon and nitrogen controls the efficiency of the net production (Margalef, 1982). In this context, Chapman et al. (1994) measured electron transport system (ETS) activities in microplankton to broadly estimate the carbon requirements and the nutrient regeneration in the waters south of Walvis Bay. Few studies have directly dealt, however, with mesozooplankton metabolism in this upwelling ecosystem. Recently, Huenerlage and Buchholz (2013) demonstrated variations in the physiological behavior of *Euphausia hansenii* under changeable trophic conditions in the Angola–Benguela frontal waters. The respiration in terms of ETS activity was also determined, but only on the dominant copepod species from Benguela (Bode et al., 2013; Timonin et al., 1992). Indeed, from respiration measurements, Schukat et al. (2013) assessed an important daily phytoplankton removal by copepods. Here we elucidate the magnitude of the respiration and NH_4^+ excretion rates by the total mesozooplankton community in a cross-shelf transect off Namibia. We used the enzymatic approach because direct measurements of physiology such as the water-bottle procedures give low spatial resolution and are additionally complicated by artifacts derived from organism manipulation, overcrowding and even starvation when long incubation times are needed (Bidigare, 1983). Enzymatic assays in turn, require the addition of saturating levels of substrates to ensure the specificity of the reaction (Maldonado et al., 2012; Segel, 1993), resulting in a potential measurement which gives the maximum rate ($V_{\max}$) instead of the actual one. Nevertheless, studies have demonstrated the utility of enzymes as an accurate index of metabolic rates, specially when they are previously calibrated for the surveyed system (e.g., Bode et al., 2013; Hernández-León et al., 1999; Packard, 1985).

This field study is embedded in an interdisciplinary research of the aging process of a coastal upwelling system. We aimed to characterize how the physical structuring processes affect the biomass of zooplankton, as well as to describe the impact that zooplankton metabolism has on the primary productivity from the northern Namibian cell. Elemental composition and stable isotopes of zooplankton were additionally used to infer spatial changes in the pelagic food web of this ecosystem. Since continuous monitoring is required to understand the structure and functioning of the plankton community, we applied a

Eulerian approach by sampling a cross-shelf transect four times during a month of intense wind-forcing. The irruption of eddies and filaments will affect the maturation pattern of the fresh upwelled waters along its pathway seaward. This influences the successional developments in these aging advected waters, promoting the heterogeneity in zooplankton populations towards the open ocean. In this scenario, our research illustrates the dynamics of zooplankton biomass and potential metabolism in face of the different oceanographic situations recorded in the northern Benguela.

2. Material and methods

Four consecutive transects were made to collect zooplankton samples and hydrographic data at 20°S off Namibia during the SUCCESSION cruise onboard RV Maria S. Merian from August 27th to September 15th, 2011. Three of the transects sampled 12 stations to a distance of 230 km from the coast, while the fourth one was extended seaward by 9 stations to 500 km (Fig. 1). Stations from NAM001 to NAM018 were sampled during both day and night in order to minimize the effect of the vertical migrations by the large zooplankton. Salinity, temperature, chlorophyll-a fluorescence and dissolved oxygen profiles were obtained at each station by deployment of a CTD SBE 911+, equipped with a WETlab FLRT-1754 fluorometer, and mounted on a rosette sampler with twenty-four 10 L Niskin bottles. Nutrients (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ and SiO_4^{2-}) as well as chlorophyll-a concentrations were also measured at different depths (Mohrholz et al., 2014; Nausch and Nausch, 2014).

2.1. Zooplankton sampling

Zooplankton was collected by Multinet vertical hauls (Hydrobios GmbH, Kiel, Germany). The equipment consisted of a net frame with an opening of 0.25 m², fitted alternatively with 100 and 500 µm meshed nets ($L = 2.5$ m, diameter at the end = 0.11 m) and stabilized by V-fin depressor. Each net ended in a cod-end consisting of a plastic bucket with side windows covered by gauze. The two flowmeters, mounted inside and outside of the frame, measured the amount of water filtered by

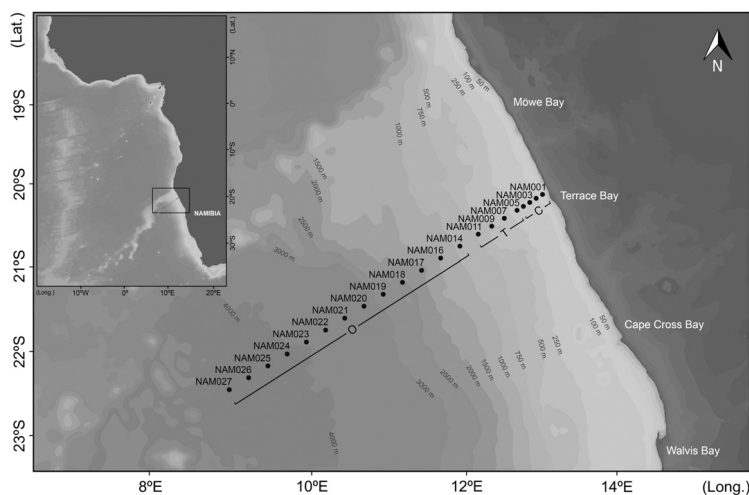


Fig. 1. Map of the study area showing the cross-shelf transect of the Namibian upwelling where zooplankton samples were collected during the SUCCESSION cruise. Stations from NAM001 to NAM018 were sampled four times, while samples from NAM019 to NAM027 were collected only once. The transect was divided into coastal (C), transition (T) and offshore (O) areas according to the geological and oceanographical properties of the stations.

the net during each haul, and a pressure sensor recorded the depth in real-time. The multiple open/closing system enabled the collection of stratified zooplankton samples in a single deployment. Three depth layers were sampled: from 200 to 75 m (or 10 m from the bottom in the shallower stations), 75 to 25 m and 25 m to the sea surface. Net sets with the two mesh sizes sampled each strata, so two samples per depth layer were recovered. We used the 100 µm mesh size for the zooplankton fractions below 500 µm, and the 500 µm mesh size for the larger ones. This approach ensured a quantitative sampling for size fractions below 10 mm.

Once on deck, the net was rinsed with seawater and the samples were maintained at 4 °C while awaiting the processing. First, we split the samples by the beaker technique (Van Guelpen et al., 1982). One half was fractionated for the 100–200, 200–500, 500–1000 and >1000 µm size classes, and immediately frozen in liquid nitrogen before being stored in the freezer (–80 °C) for subsequent enzymatic analyses. The other was split into two new subsamples: one was frozen at –20 °C for biomass and isotopic determinations; the other was stored in plastic bottles filled with buffered formaldehyde (4% final concentration) for taxonomic analysis. Size fractionation was made in both cases as well. Organisms over 5000 µm such as jellyfish were not included in our calculations. However, they were counted and the diameter of the umbrella was measured with a calibrated rule in order to convert them into dry mass (DM) using the equation $DM = 0.03 \text{ Diameter}^{2.3}$ given in Møller and Riisgård (2007) for the genus *Aurelia*.

Chains of diatoms were found in a few 100 µm meshed net hauls in the surface layer from NAM005 to NAM009, mainly during the first two transects. Despite the samples being carefully washed with filtered seawater, some diatoms still remained in them. This contamination was noticeable in only 18% of the samples. In order to quantify the biomass due to phytoplankton in these samples, the amount of chlorophyll-a was first determined by spectrophotometry (Parsons et al., 1984). Then, chlorophyll-a values were converted into organic carbon with a factor of 27 (µg C/µg chl-a) calculated from the relationship: $C = 24.3 \text{ chl-a} + 29.3$ ($n = 29$, $r^2 = 0.75$, $p < 0.05$) given in Schlüter and Havskum (1997) with the intercept forced through zero. This factor agrees with others reported for marine phytoplankton communities in an exponential growth phase (Banse, 1977; Smetacek and Hendrikson, 1979). For communities in senescence with high detrital presence, the relationship between carbon and chlorophyll-a can rise up to 200. This was not the case here. Since the samples in question were found in mature waters rich in nutrients, suitable for a bloom of diatoms, the lower limit of the C/Chl-a ratio (ranging from 22 to 200) was used. Accordingly, these should be considered as conservative estimates. The phytoplankton-associated carbon value was subtracted from the total organic carbon of each contaminated sample. On average, these zooplankton samples contained $35 \pm 24\%$ phytoplankton biomass. Afterwards, our own ratios (see Results) were applied to Ricker's concept based on the sum of the least products (Ricker, 1973) so as to recalculate the biomass of zooplankton in terms of DM, organic nitrogen and protein in these samples.

2.2. Biomass analyses and stable isotopes measurements

Frozen samples were dried at 60 °C in the land-based laboratory. The isotope, particulate organic carbon (POC) and particulate organic nitrogen (PON) samples were ground to fine powder and weighed in tin capsules. Measurements were made by means of Flash combustion in a CE Instruments Flash EA 1112 at 1020 °C in a Finnigan Delta S isotope ratio mass-spectrometer via a Conflow III open split interface. Calibration for the total POC and PON determinations was done daily with anacetanilide standard. The stable nitrogen and carbon isotope ratios measured for each sample were corrected with the values obtained from standards with defined nitrogen and carbon element and isotopic compositions (International Atomic Energy Agency IAEA: IAEA-N1, IAEA-N2, IAEA-N3, NBS 22, IAEA-C3 and IAEA-CH-6) by mass balance. Values are reported

relative to atmospheric N_2 (^{15}N) and VPDB (^{13}C – Vienna Pee Dee belemnite). The analytical precision for both stable isotope ratios was 0.2‰. Carbon and nitrogen contents were calculated by the percentages of the initial dry masses in relation to the total. Then, considering the split part and the amount of water filtered, the carbon and nitrogen concentrations were given in $mg\ m^{-3}$. C/N ratios were calculated on a molar basis. Samples were not generally acidified prior to combustion in order to remove inorganic carbon. An experiment using 45 samples selected by chance served as a data base to estimate the effect. The average of non acidified samples amounted to $25.1 \pm 6.9\%$ as compared to $22.4 \pm 7.1\%$ after acidifying them. The difference amounted to a maximum of 7.5%, but was not significant ($p > 0.05$). None of the zooplankton samples contaminated with phytoplankton were considered for isotope characterization. In addition, biomass in terms of protein content was determined from the samples kept for enzyme activities by using the method of Lowry et al. (1951) modified by Rutter (1967).

2.3. Zooplankton community composition

Taxonomic analysis was done with great deliberation on all size classes and all depth levels down to 200 m from five transect II stations. The distance to shore was 10, 20, 110, 200, and 230 km or a “pseudo-age” (Mohrholz et al., 2014) of 4.0, 3.7, 48.9, 46.4 and 44.5 days, respectively. Transect II was chosen to facilitate a later comparison with the results obtained by the Video-Plankton-Recorder VPR II, which produces the same taxonomic resolution, but at higher sampling frequency. Samples were taken at night except for NAM001, which was taken at dawn. As a result, the vertical profiles were not affected by daily vertical migration and consequently, are comparable.

The species analysis of the larger zooplankton required a stereomicroscope (Leica, MZ 8) with a magnification between 16 and 80×. The smaller size classes were analyzed by an inverted microscope (Labovet FS, Leitz) usually with a magnification of 50×. In both cases, Bogorov trays of suitable sizes were used for counting. The total samples were first surveyed for rare specimens. High sample concentrations often required the analysis of sub-samples. The entire procedure and the discussion of errors have been described in detail in Postel et al. (2000). Taxonomic determinations were performed to different levels, often down to genera, using the literature for the Angolan–South African region (Gibbons, 1997), the South Atlantic (Bolotovskoy, 1999), the northern hemisphere (ICES, 2001) and the Mediterranean (Riedl, 1983; Trégouboff and Rose, 1978).

2.4. Indices of metabolism

Electron transport system (ETS) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities were measured on the same homogenate that was used for protein determination. During the whole procedure, the samples were kept in ice in order to prevent a decline in the enzymatic activities. The supernatant fluid was assayed for ETS activity following the Owens and King (1975) methodology, and for GDH activity using the procedure of Bidigare and King (1981) modified according to Fernández-Urruzola et al. (2011). Both analyses were carried out kinetically at 18 °C and then corrected for temperature. This recalculation assured an accurate estimation of the in situ respiration and NH_4^+ excretion by employing the Arrhenius equation with activation energies of 15 kcal mol^{-1} (Packard et al., 1975) and 10 kcal mol^{-1} (calculated from Park et al., 1986), respectively. The phytoplankton associated-ETS activities in the aforementioned samples were subtracted from the total ETS by means of an ETS to zooplankton–protein ratio equal to $61.6\text{ }\mu\text{mol O}_2\text{ mg protein}^{-1}\text{ d}^{-1}$. This factor was obtained by regression analysis of non-contaminated zooplankton smaller than 500 µm, and sampled from the same area (ETS activity = 61.6 protein , $n = 91$, $r^2 = 0.93$, $p < 0.001$). However, it was not necessary to correct the GDH activities since the deamination function for NAD^+ -specific GDH in phytoplankton is negligible (King, 1984; Park et al., 1986).

Additionally, water-bottle incubations for respiration and NH_4^+ excretion were conducted on board in order to calibrate the enzymatic measurements with specific R/ETS and GDH/ NH_4^+ ratios for the Benguela system. Zooplankters were collected by WP-2 net hauls and after fractionation, maintained in filtered seawater at sea surface temperature (14–16 °C). After an hour acclimation period, the healthiest organisms were incubated in filtered seawater at 14 °C for 2 h in glass-capped bottles. All the experiments included at least one control flask. Oxygen consumption was estimated by the continuous measurement of dissolved O_2 with a 6-channel Strathkelvin 928 Oxygen System® respirometer. Once the incubation was finished, a sample of seawater (10 ml) was siphoned off from each bottle for NH_4^+ determinations in accordance with the phenol–hypochlorite method (Solorzano, 1969). Afterwards, the zooplankters were removed and frozen at –80 °C in order to analyze the enzyme activities as described above. The mean R/ETS value for zooplankton was 0.48 ± 0.29 ($n = 19$), while for GDH/ NH_4^+ it was 16.4 ± 12.2 ($n = 26$). Although the standard deviations were high, these ratios are close to the reported R/ETS ratio by Bode et al. (2013) for the same region, and in the middle of the range of GDH/ NH_4^+ ratios from the literature (Fernández-Urruzola et al., 2011). The errors caused by these ratios have been discussed by King and Packard (1975), and Hernández-León and Gómez (1996). Furthermore, del Giorgio (1992) found that these errors were not greater than those of other methods used in standard ecological procedures for plankton metabolic processes, such as the thymidine and ^{14}C uptake techniques (Richardson, 1991). As a result, the average ratios measured here were used to estimate the community respiration and NH_4^+ excretion throughout this study. Oxygen consumption rates were converted into carbon from the respiratory quotient of 0.86, assuming a mixed diet (Omori and Ikeda, 1984). The C/N uptake ratio of 6.1 ($\mu\text{g C}/\mu\text{g N}$) given by Dugdale and Goering (1967) was used to assess the carbon regenerated by the zooplankton NH_4^+ excretion rates. Gross primary production (GPP) was estimated from chlorophyll-*a* and ^{14}C uptake measurements made on board; the calculations followed the procedure described in Brown et al. (1991) for the Benguela system, with the regression model (best fit to the data): $^{14}\text{C} = 3.75 \text{ chlorophyll-}a^{0.653}$ ($n = 24$, $r^2 = 0.60$, $p < 0.001$). The difference between GPP and the daily phytoplankton respiration (assumed to be 10% of hourly production multiplied by night hours) equaled the net primary production (NPP).

3. Results

Mohrholz et al. (2014) describe in detail the hydrographic conditions during the SUCCESSION cruise. Different water masses were present in the study area, most of them with a northern origin. Additionally, a cold water filament was found extending offshore from the coastal upwelling center. This filament influenced the near-shore stations, while the ones over 140 km from the coast were mainly under the influence of warmer water masses, especially at the end of the cruise. The phytoplankton development was coupled with the presence of the cold water filament, reaching a maximum peak of chlorophyll-*a* at the beginning of September. Ekman divergence dominated near the coast, whereas curl-driven upwelling introduced nutrient-rich South Atlantic Central Waters (SACW) into the euphotic zone with a maximum vertical velocity of 0.35 m d^{-1} around the outer shelf. These differences in hydrology allowed us to distinguish three regions within the transect (Fig. 1). The coastal stations (NAM001–NAM004) were characterized by the Ekman transport that brings deep central waters to the surface with high vertical velocities. The transition zone (NAM005–NAM011) occurred over the shelf-break and was strongly influenced by both the filaments and the curl driven upwelling. The offshore stations over the continental slope (NAM014–NAM027) were mainly affected by warmer southern water masses (ESACW) and by the occasional occurrence of younger waters arising from the filaments. The selection of the limits of these regions was strengthened by a cluster

analysis of physical and chemical properties of the stations (diagram not shown).

3.1. Zooplankton biomass and community structure

The pattern of water masses at 20°S promoted great temporal variability in zooplankton biomass along the transect (Fig. 2). Accordingly, peaks of zooplankton were found coinciding with maximum values of chlorophyll-*a* in late August. At that time, a nearly stable cold water filament sustained high primary productivity, even at the outer stations such as NAM017 (see Hansen et al., 2014). Afterwards, the filament was dispersed to the northwest, which led to a decrease in the chlorophyll-*a* concentration as well as a three-fold decrease in the zooplankton biomass. In order to reduce the impact of these mesoscale structures, the measurements of the four transects were averaged for some analyses.

Despite the fact that the zooplankton and more particularly the size fractions over 500 μm showed higher biomass during the night (Fig. 3), the non-parametric Mann–Whitney *U* test did not reveal a significant day–night difference ($p > 0.05$). This means that only a small percentage of the larger zooplankton migrated out of the upper 200 m during the day. Nonetheless, the schedule of the sample collection during the cruise minimized those vertical differences by sampling two days and two nights at each station and averaging results over time. Larger horizontal differences of the biomass were observed among the areas (one-way ANOVA, $F_{2,48} = 20.22$, $p < 0.001$). The DM-values averaged 51 mg m^{-3} in the upper 75 m of the transition zone, a value much higher than those measured at the other two zones (Table 1). The development of salp blooms in the mature waters from the transition area during the first half of the cruise resulted in high biomass deviations in the largest size class.

The total zooplankton biomass peaked at all three depth layers at 90 km from the coast (Fig. 4). The maximum mean value in the surface layer was 81 mg DM m^{-3} . This occurred slightly displaced offshore from the diatom bloom that was found at 70 km from the coast. Then, the zooplankton biomass diminished seaward down to 3 mg DM m^{-3} , although an unexpected peak in the upper 25 m was found 380 km from the shore owing to the high abundance in the largest size fraction. The highest densities of zooplankton were always found in the upper 25 m, where the chlorophyll-*a* concentration was about two-fold greater than the one measured from 25 to 75 m, and almost one order of magnitude greater in comparison with the deepest layer. In general, our zooplankton biomass results were of similar magnitude to those registered in 1979 along the same transect (Southwest Atlantic cruise, SWA; see details in Postel, 1995). However, peaks of zooplankton during our cruise were displaced inshore compared to the earlier expedition (Fig. 4). Throughout the entire transect, cyclopoid copepods were the most abundant taxa within the size fractions below 500 μm (Fig. 5a). At the inner stations, the relative abundance of meroplanktonic larvae (ophioplutei) was also high (30%). They decreased further offshore, while the presence of other groups such as calanoids, harpacticoids and tintinnids increased. In the larger zooplankton there appeared more variability in the dominant species (Fig. 5b). Thaliaceans predominated at the shelf-break and calanoids were more important inshore and offshore. Jellyfish were not considered here, although we noted their presence mainly confined to the inner shelf (Fig. 6).

3.2. Body composition and stable isotopes in zooplankton

The relationship between organic carbon and DM varied from 0.11 to 0.33, while protein and DM were related by a factor of 0.18 ± 0.05 . Nitrogen content averaged 36% of the protein (see Table 1). Furthermore, the resulting C/N atomic ratios of zooplankton ranged between 4.2 and 6.4 (Fig. 7), with the values being significantly higher in the transition area (one-way ANOVA, $F_{2,210} = 11.16$, $p < 0.0001$; post hoc Tukey's HSD, $p < 0.0001$). Only the C/N ratios of the microzooplankton

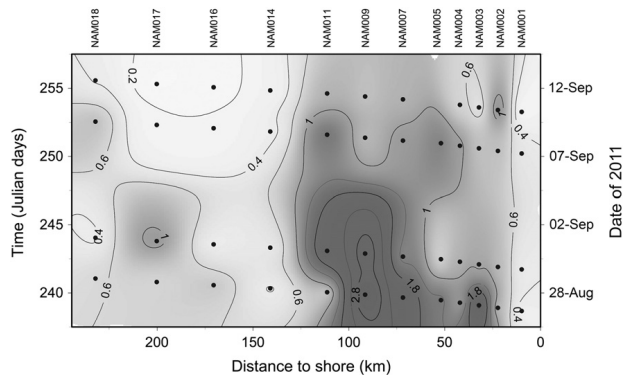


Fig. 2. Temporal variability of zooplankton biomass (g DM m^{-2}) along the SUCCESSION transect. Only the first 25 m of the water-column is considered because this layer contains most of the variability. The secondary axis (right) shows the corresponding sampling-dates. Ocean Data View (ODV) software was used to generate interpolated values using the weighted averaged gridding method option.

(100–200 μm) were invariant throughout the transect (one-way ANOVA, $F_{2,50} = 0.27$, $p = 0.765$). Overall, the smaller size classes (100–200 μm and 200–500 μm) tended to have C/N ratios above 5.2, whereas the larger size classes (500–1000 μm and $> 1000 \mu\text{m}$) tended to have ratios below 5.2.

The averaged zooplankton- $\delta^{13}\text{C}$ (ranging from -21.3 to -18.9‰) revealed variability in the carbon source along the transect (Fig. 8). More negative $\delta^{13}\text{C}$ values were mainly found in the inner stations (Kruskal–Wallis test, $p < 0.005$). In the case of $\delta^{15}\text{N}$, the averaged zooplankton-values showed a more pronounced decrease from 11.0 to 4.8‰ within the first 100 km (Kruskal–Wallis test, $p < 0.0001$). The individual patterns of the different size categories followed the same shape (data not shown). In addition, with increasing size, the zooplankton exhibited an enrichment in ^{15}N and a depletion in ^{13}C .

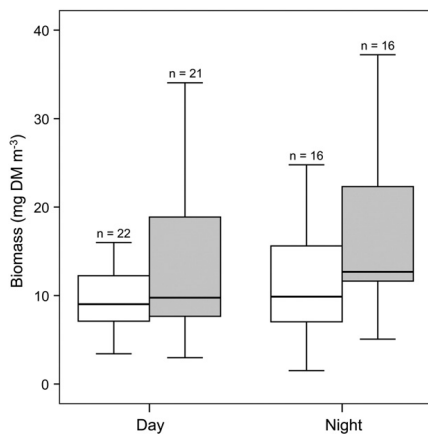


Fig. 3. Differences in zooplankton biomass distribution between day and night in the upper 75 m of the water-column. The gray boxes represent the zooplankton $> 500 \mu\text{m}$ and the white boxes, the 100–500 μm size fraction. The lower and upper boundaries of the boxes represent the first and third quartiles of the data distribution, respectively, with the dark line in the middle as the median. Error bars indicate the 95% confidence limits (C.L.).

3.3. Zooplankton metabolism

The zooplankton potential respiratory (ETS activity) and potential excretory (GDH activity) rates for the four transects are presented in Fig. 9. The highest metabolic activities were measured in late August (i.e., transects 1 and 2), which concurs with the pattern described for the zooplankton biomass. Thus, during the first two transects, the zooplankton enzyme activities exceeded by almost two-fold the ones measured in mid September (transect 4). A strong gradient in the ETS and GDH activities was also found with distance to shore. Highest metabolic rates were displaced further offshore by the filament during the transects 1 and 2. Accordingly, both enzyme activities peaked between NAM007 and NAM011. Afterwards, these peaks moved inward as the system became more stable and therefore, the zooplankton exhibited higher potential respiration and potential NH_4^+ excretion rates from NAM002 to NAM005. Here in the upper 75 m, the averaged ETS activity was $360 \pm 240 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, and the averaged GDH activity was $320 \pm 155 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. A second maximum appeared in the surface of NAM023 (transect 4) due to a patch particularly rich in large zooplankton, with values of $490 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and $316 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ for ETS and GDH, respectively (Fig. 9). The contribution of the smaller zooplankton (100–200 μm) to the total NH_4^+ excretion was significantly greater in the near-shore stations (one-way ANOVA, $F_{1,51} = 26.42$, $p < 0.0001$). On the contrary, the high metabolic rates found in the transition waters were mainly associated with the largest size fraction.

Measurable differences in the protein-specific ETS activities were found when both region and size class were considered (one-way ANOVA, $F_{11,196} = 8.53$, $p < 0.001$). GDH activities per unit of biomass displayed similar variability (one-way ANOVA, $F_{11,188} = 15.97$, $p < 0.001$). In general, the zooplankton from the transition area had lower specific rates (Table 2). Here, the specific ETS activity of the largest size fraction dropped from 2.72 to $1.28 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (post hoc Tukey's HSD, $p < 0.001$). This coincided with blooms of salps (Fig. 5b), which have a lower specific-metabolism. In contrast, the main decrease in the GDH activity was observed in the smaller size classes (100–200 μm and 200–500 μm), as their rates declined by half to values of around $1.2 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ over the transition zone shelf-break (post hoc Tukey's HSD, $p < 0.001$). The slopes of the regression of log-transformed data for both ETS and GDH scaled to exponents of 1.04 and 0.88 with protein mass, respectively (Fig. 10). These relationships showed positive correlations with a Pearson

Table 1

Cross-shelf distribution of averaged ($\pm$ SD) zooplankton biomass for the three regions in terms of dry mass (DM), organic carbon (C), organic nitrogen (N) and protein (all in mg m^{-3}) measured on four size fractions in the upper 75 m. The relative contribution (%) of each fraction to the total protein biomass is also given.

Area	Size (μm)	n	DM	C	N	Protein	%
Coastal	100–200	16	3.60 ± 1.54	1.08 ± 0.45	0.26 ± 0.11	0.63 ± 0.21	13.7
	200–500	16	6.61 ± 4.20	1.71 ± 0.94	0.46 ± 0.24	1.24 ± 0.60	27.1
	500–1000	16	3.50 ± 2.58	1.17 ± 0.89	0.33 ± 0.24	0.75 ± 0.54	16.3
	> 1000	16	9.34 ± 8.94	2.89 ± 3.03	0.89 ± 0.85	1.97 ± 2.11	42.9
	Total	64	23.05 ± 10.32	6.85 ± 3.32	1.94 ± 0.92	4.59 ± 2.27	100
Transition	100–200	14	3.96 ± 3.00	0.67 ± 0.41	0.16 ± 0.09	0.67 ± 0.50	6.4
	200–500	14	16.44 ± 12.32	2.60 ± 1.71	0.57 ± 0.38	3.74 ± 3.12	35.8
	500–1000	16	4.12 ± 2.77	1.36 ± 0.94	0.36 ± 0.25	1.28 ± 1.02	12.3
	> 1000	14	26.38 ± 34.18	7.01 ± 5.04	1.71 ± 1.16	4.75 ± 3.29	45.5
	Total	58	50.90 ± 36.56	11.64 ± 5.42	2.80 ± 1.24	10.44 ± 4.67	100
Offshore	100–200	23	1.87 ± 1.44	0.41 ± 0.29	0.10 ± 0.07	0.29 ± 0.18	10.4
	200–500	24	4.86 ± 4.58	1.03 ± 0.80	0.26 ± 0.20	0.68 ± 0.58	24.3
	500–1000	23	2.64 ± 1.82	0.84 ± 0.61	0.24 ± 0.18	0.47 ± 0.34	16.8
	> 1000	24	8.51 ± 5.32	2.07 ± 1.39	0.57 ± 0.39	1.36 ± 1.14	48.6
	Total	92	17.88 ± 7.39	4.35 ± 1.74	1.17 ± 0.48	2.80 ± 1.34	100

coefficient of 0.92 for ETS and a non-parametric Spearman coefficient of 0.81 for GDH (in both cases, $p < 0.0001$).

Estimations of the physiological rates of the zooplankton community reflected higher respiration and NH_4^+ excretion at those stations where the primary productivity attained its maximum values (Table 3), with the largest size class contributing most (data not shown). However, the phytoplankton carbon which was respired in the upper 75 m by mesozooplankton (from 0.73 to $16.90 \text{ mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) barely amounted to 1.1–10.6% of what was produced. It is noteworthy that the range of these percentages was wider in mature waters (from 15 to 39 days). Likewise, the potential contribution of the excreted nitrogen (global average = $0.97 \text{ mmol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) did not exceed more than the $4.8 \pm 2.3\%$ of the primary producers' requirements. This percentage remained fairly constant irrespective of the system productivity, although zooplankton seemed to fulfill more of the phytoplankton demands in aged waters (Table 3). Overall, the relationship between respiration and NH_4^+ excretion (O/N ratios) showed higher values in the transition area (from 12 to 20); then, they decreased towards the open ocean to a range of 5 to 13. This means that zooplankton metabolism relied on more protein offshore.

4. Discussion

4.1. Zooplankton biomass and community structure

The signature of several water masses such as the South Atlantic Central Water (SACW), the East South Atlantic Central Water (ESACW) and the cold filament intrusions from the fresh upwelled waters coexisted in the northern Namibian cell during the study. This coincides with previous findings of Boyd et al. (1987) in the same area. As a result, zooplankton biomass was not distributed uniformly throughout the transect (Fig. 2), but displayed strong temporal and spatial gradients caused by the physical forcing. For instance, the upwelling of deep waters rapidly disrupts the structure of the resident biota, and generates an ecological succession in the aging advected waters. In our study, mature waters rich in nutrients predominated at the end of August over most of the transect, and promoted the enhancement of phytoplankton (Hansen et al., 2014) and eventually of zooplankton, just as the model of Vinogradov et al. (1972) predicted. At this time, zooplankton biomass reached peaks of 65 mg DM m^{-3} in the upper 200 m of the transition area, which agreed with the values reported in Postel (1995) and Postel et al. (2007) in the upwelled waters north of Walvis Bay, but not with the estimates of zooplankton standing stock recorded in quiescent periods (Olivar and Barangé, 1990; Verheye and Hutchings, 1988). The latter research sampled the northern Benguela during the austral autumn, when the upwelling activity is the most sluggish, resulting in a mean biomass of only 26 mg DM m^{-3} for the entire

shelf area. This value falls in the range observed in other less productive upwelling systems (Bode et al., 2005; Hernández-León et al., 2002). Here, similar values were measured in September, when filaments were not strongly influencing the transect and thereby, the less productive aged waters dominated in the study area. In general, the low zooplankton biomass found in the newly upwelled waters, increased as it moved seaward to a maximum over the shelf-break. This coincided with the offshore edge of the chlorophyll maxima. Further offshore, the zooplankton biomass decreased dramatically. Such a pattern is in accordance with the spatial trend described in Shannon and Pillar (1986) and Olivar and Barangé (1990). One exception, however, was found in the surface waters 380 km from the coast (NAM023) in mid September (Fig. 4). The extraordinarily high concentration of large organisms ($> 1000 \mu\text{m}$) at this oceanic station (70 mg DM m^{-3}) was explained by the introduction of SACW waters via the filament (see Fig. 6e in Mohrholz et al., 2014). This water still maintained some of its original properties. Accordingly, a successional development in this water mass resulted in a mature plankton community (sensu Vinogradov and Shushkina, 1978) dominated by predatory zooplankton in a low chlorophyll environment.

Overall, the zooplankton correlated with the diatom distribution (Fig. 11), which argues for a “bottom-up” control over the trophic chain as usually occurs in productive ecosystems (Cury and Shannon, 2004). The dominance of chain-forming diatoms in the transition area might entail, however, a food particle size limitation to the microzooplankton (100–200 μm), whose diet relies primarily on both individual phytoplanktonic cells and small microheterotrophs (Irigoien, 2005). Accordingly, their contribution to the total biomass dropped at the shelf edge (Table 1). Unfortunately, the coarse taxonomic resolution (Fig. 5) constrains our discussion of how the biological forcing, as well as the highly advective environment, disrupted the zooplankton assemblages. In general, the numerical prevalence of copepods that we observed (Fig. 5) concurs with investigations of Timonin (1997) and Loick et al. (2005) for the Benguela ecosystem. However, in our study the pelagic copepods peaked near the coast (6751 ind m^{-3}), contrary to the previous findings of maximum densities developing at the outer shelf resulting from advection by Ekman transport (Verheye et al., 1992). Indeed, this offshore transport via filaments together with the inshore upwelling cells, may explain the oceanic occurrence of organisms normally common in neritic waters such as chaetognaths (Gibbons et al., 1992), tintinnids (Dolan et al., 2012) and the benthic harpacticoids that we have documented. Still, other processes such as biological competition may be controlling the pelagic copepod population. With a plentiful food supply, salps can take immediate advantage of their high filtering rates and rapid growth (Aldredge and Madin, 1982), so swarms of these tunicates could easily exclude other planktonic grazers over the shelf-break. Thus, the spatial pattern of

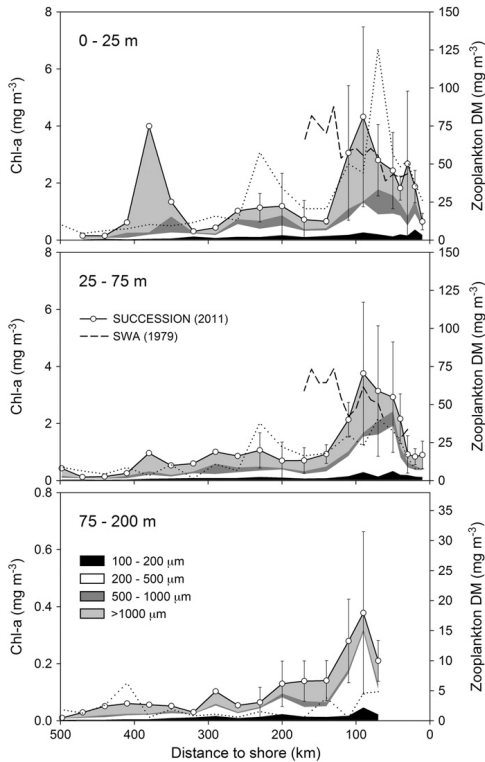


Fig. 4. Mean zooplankton biomass at different depth levels with the contribution of each size fraction. Dotted line stands for the chlorophyll-*a* concentration. Zooplankton biomass data for the SUCCESION cruise are compared (top two panels) with data from the same transect made 32 years before (1979), during the Southwest Atlantic cruise (SWA). No data are shown for the shallow stations along the first 70 km in the bottom panel. Note that the scale for both chlorophyll-*a* and zooplankton is smaller in the 75–200 m layer. Error bars indicate the 95% C. L., but not for the data seaward of 230 km where only one measurement was made.

zooplankton from the Benguela upwelling seems to be determined in the short-term not only by the complex interplay between mesoscale structures, as the satellite images show, but also by the interspecific relationships linked to the successional development of the water masses.

4.2. Body composition and stable isotopes in zooplankton

The data on elemental composition (Table 1) are comparable to DM, carbon and nitrogen content reported for the zooplankton community from the NW Spanish upwelling (Bode et al., 1998). Differences between the three zones were not marked, although a shift in both nutritional source and zooplankton assemblages might explain a slightly higher carbon and nitrogen contribution to the total mass in the transition area. Nonetheless, low carbon content (ranging from 11 to 33% of DM) in comparison to that measured in polar regions (e.g., from 23.5 to 61.0% in Ikeda and Skjoldal, 1989) suggests minor lipid storage by

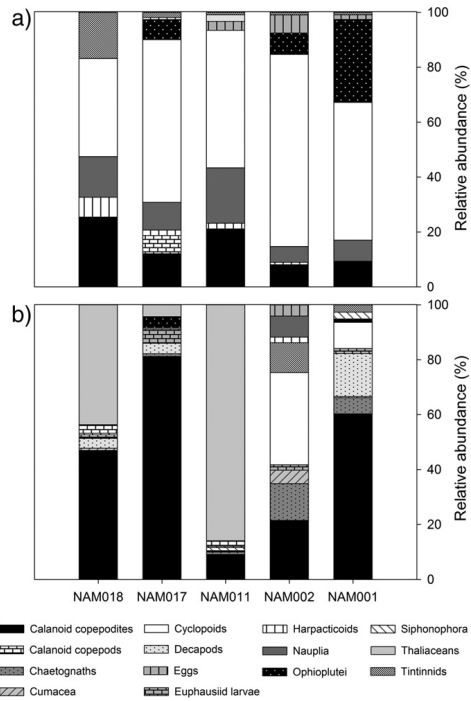


Fig. 5. Relative abundances of the taxa which contributed to more than 2% of the zooplankton community abundance in both the 100–500 µm (a) and the >500 µm (b) size classes. Only the upper 25 m of the water-column was considered.

the zooplankton in Benguela. In fact, protein is often the dominant metabolic reserve in areas with abundant and constant food supply (Postel et al., 2000). Likewise, atomic C/N ratios were in a range consistent with those found in several groups of mesozooplankton from the northern Benguela (Schukat et al., 2014), and in marine crustaceans in general (Bode et al., 1998). The larger values in the C/N relationship at the

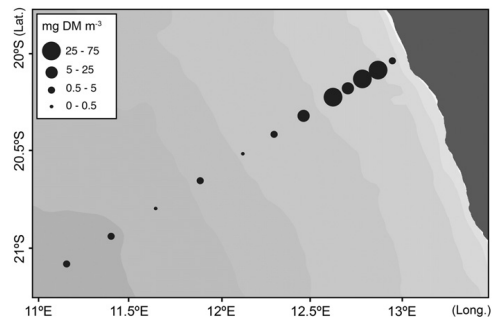


Fig. 6. Cross-shelf distribution of jellyfish biomass in the upper 200 m of the water-column, except for the five near-shore stations where the bottom depth was shallower.

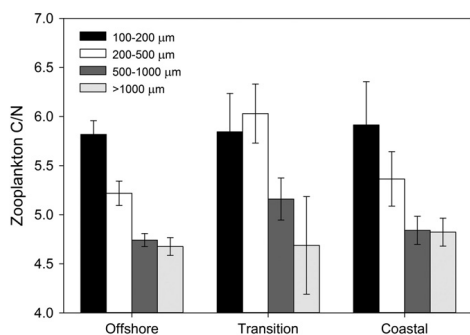


Fig. 7. Averaged atomic C/N ratios for each size fraction in the different zones. Error bars indicate the 95% C.L.

transition zone, however, may reflect a shift in the zooplankton diet (Fig. 7). This enhancement, jointly with lower specific-GDH activities (Table 2), would result in reduced NH_4^+ excretion rates per unit of biomass in the transition waters (Anderson, 1992). Furthermore, C/N ratios resembled the trend set by the O/N ratios (see Table 3), which provide an indicator of the metabolic substrate oxidized for energy. Depending on the amino-acid and the fatty acid involved in the catabolic pathways, the O/N ratio can theoretically range from 3 to infinity (Mayzaud and Conover, 1988). Accordingly, pure protein catabolism is assumed to yield O/N ratios below 13, while a value of around 24 indicates a reliance on both protein and lipids. In our study, offshore, outside of the filament, the O/N ratios were characteristically between 4 and 6, indicating protein-dominated catabolism. This was likely caused by higher indices of carnivory within this area. On the contrary, at the transition zone the O/N ranged between 12 and 20, which would correspond to a more lipid-rich diet.

Additional ecological understanding is achieved through a study of the zooplankton isotopic composition, since the stable isotopes constitute a useful tool to describe the structure of the food web and nutrient dynamics of a given ecosystem. Thus, $\delta^{15}\text{N}$ sheds light on the trophic position of organisms as well as on the contribution of isotopically distinct nitrogen sources entering the base of the food chain (Montoya, 2008). $\delta^{13}\text{C}$ provides insight into the character of the zooplankton carbon source (Koppelman et al., 2009). Here we use both isotopes in order to determine potential changes in dietary relationships in the study area. The significance in the spatial variability in $\delta^{13}\text{C}$ that we observed

was likely caused by changes in food resources from the diverse water masses found along the transect (Fig. 8). For instance, zooplankton with small lipid reserves would explain lower $\delta^{13}\text{C}$ at the inner shelf (Saupe et al., 1989). Preying more on diatoms, which are enriched in ^{13}C compared to the small flagellates (Fry and Wainright, 1991), would lead to less negative zooplankton- $\delta^{13}\text{C}$ values in transition waters. On the other hand, the differences in $\delta^{15}\text{N}$ signatures were remarkably greater than the corresponding differences in the $\delta^{13}\text{C}$ signatures. This likely originated in the source of the nitrogen utilized by phytoplankton rather than in species succession processes, since the same trend was followed by all the size fractions. Thus, upwelled nitrate near the coast is expected to be enriched in ^{15}N through bacterial remineralization in deep waters. This resulted in a progressive phytoplankton enrichment in ^{15}N as the primary producers removed dissolved nitrate over the shelf waters (Bode and Álvarez-Ossorio, 2004; O'Reilly et al., 2002). Farther offshore, $\delta^{15}\text{N}$ -depleted nitrogen-species, such as N_2 fixed by diazotrophs or NH_4^+ excreted by heterotrophs, could become dominant in supporting the primary production and therefore, lower $\delta^{15}\text{N}$ signatures would be propagated into the other components of the trophic chain. Differences in the number of intermediary trophic levels which are channeling the mass transfer through the food web could also explain such a variability, but isotope reference values for phytoplankton would be necessary for confirmation.

4.3. Zooplankton metabolism

In seeking an understanding of the carbon balance it is important to know whether the heterotrophs consume all the primary productivity or whether there is some fixed carbon left over to be exported to the bottom (Ducklow and Doney, 2013). This will depend on the level of primary productivity which will be limited by nitrogen, among other elements. In this scenario, zooplankton metabolism impacts both carbon and nitrogen cycles, with environment, season and taxonomy modulating its biogeochemical role. Compared to shelf waters of other upwelling case studies where zooplankton respiration and NH_4^+ excretion in the upper 200 m varied from 7.5 to 103.1 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and from 0.2 to 5.4 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectively (Hernández-León et al., 2002; Isla and Anadón, 2004; Packard et al., 1974; Pérez-Aragón et al., 2011), here zooplankton consumed on average more oxygen (112.4 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) and released more NH_4^+ (10.3 $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). In spite of this elevated respiration and NH_4^+ excretion, when compared to the net primary productivity (NPP), the relative values of these two processes were consistent with those measured in NW Africa (Packard, 1979) and in Benguela (Chapman et al., 1994).

The respiratory carbon demand of zooplankton averaged $7.1 \pm 4.7 \text{ mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in the whole transect (Table 3). According to the energy budget approach given in Ikeda and Motoda (1978), the ingestion rate can be derived from the respiration by a factor of 2.5. This means that the zooplankton would remove between 6.0 and 29.5 $\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in the upper 75 m of the water-column, i.e., about 14% of mean daily (net) production if we assume major herbivory and an assimilatory efficiency of 70% (Kiørboe et al., 1985). These estimates are slightly higher than the average copepod consumption rates reported by Schukat et al. (2013) for the northern Benguela (1.8–6.5 $\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Even though Hernández-León and Ikeda (2005) calculated a mesozooplankton carbon demand ranging from 34 to 63% of the global primary productivity, the percentage drops more than three times in eutrophic ecosystems (Calbet, 2001), which encompasses our approximations. It is known that microheterotrophs' grazing often accounts for most of the phytoplankton production, but will these organisms be able to consume the remaining carbon in such a productive system? Parallel research with bacteria during the same cruise (Bergen et al., in prep.) calculated that a consumption of around 29% of the net production was necessary to sustain their metabolic carbon requirements in the upper 75 m (43 $\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). In addition, estimations of Chapman et al. (1994) suggested that

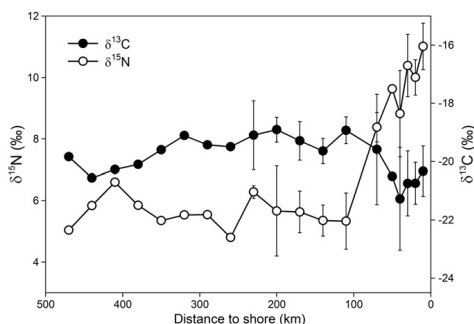


Fig. 8. Spatial variation of averaged zooplankton $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values along the transect. Note that each value in the first 230 km comes from the average of the four sections. Error bars indicate the 95% C.L.

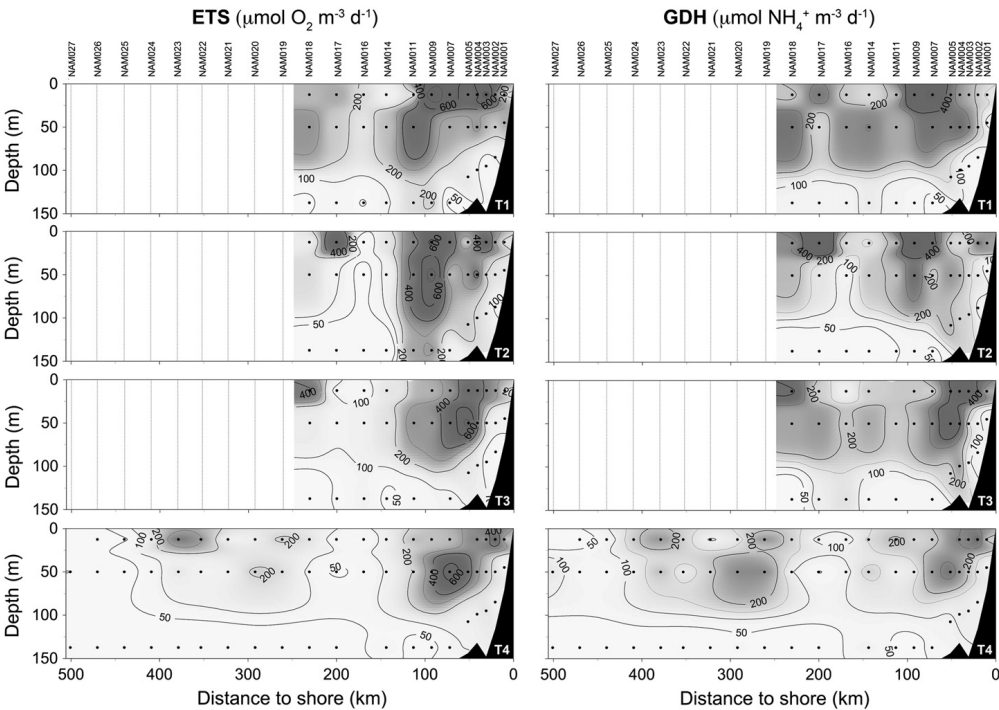


Fig. 9. Depth-profiles of zooplankton ETS activities ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) and GDH activities ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) for each transect. Sampling dates in 2011 were as follows: 27 Aug–30 Aug (T1), 31 Aug–02 Sep (T2), 08 Sep–10 Sep (T3) and 11 Sep–15 Sep (T4). ODV software was used to generate interpolated values using the weighted averaged gridding method option.

microplankton would double the carbon losses attributable to zooplankton (i.e., ~28% of the NPP in our case study). Considering the top predators and large gelatinous zooplankton as minor sinks for phytoplankton biomass, it seems reasonable to presume that the system was autotrophic during the active upwelling season. In other words, there was a surplus of net production to be exported. In support of this, estimates by Osma et al. (2014) revealed that an average of about 23% of the NPP was either respired in the water column below 75 m or deposited in the sediments. Some of the remaining NPP was likely exported by the filament towards the open ocean.

The contribution of zooplankton NH_4^+ excretion to the phytoplankton productivity (Table 3) was also limited (0.5–11.3%). Although a secondary role might be expected for remineralization in areas with large inputs of new nitrogen, there is no obvious pattern about the importance of zooplankton in fueling the primary productivity throughout different ecosystems (Bronk and Steinberg, 2008). Here, the zooplankton did not seem to be a key component of the total NH_4^+ regeneration via excretion processes. Our results were comparable with the

mesozooplankton regeneration in the upwelling off NW Spain (Bode et al., 2004; Isla et al., 2004). Accordingly, dissolved NH_4^+ displayed a weak correlation with zooplankton distribution (Fig. 11), although some caution about this interpretation is needed as the NH_4^+ has a very rapid turnover. In fact, remineralized nitrogen (Benavides et al., 2014) and phosphorus (Nausch and Nausch, 2014) were found necessary to support the large phytoplankton biomass at 20°S. This may reveal a major remineralization pathway through microheterotrophs as Probyn (1987) found for the southern Benguela. Despite the dynamics of zooplankton metabolism in both the time and space domain, we conclude that it had little impact on the NPP in all the different productivity regimes within the Namibian system.

On a physiological basis, the indices of metabolism did not sharply respond to the patterns of chlorophyll-a and productivity. While phytoplankton biomass declined in the transition area, likely due to the grazing pressure and nutrient depletion, high values of specific-ETS activities remained relatively constant from the rich upwelled waters to the oceanic ones (Table 2). Longer life cycles allow zooplankton to

Table 2
Mean values ($\pm$ SD) of biomass-specific ETS and GDH of size-fractionated zooplankton in coastal (C), transition (T) and offshore (O) stations, averaged over the 200 m water-column.

Size (μm)	Specific ETS ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			Specific GDH ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	C	T	O	C	T	O
100–200	1.95 $\pm$ 0.65	1.98 $\pm$ 0.52	2.07 $\pm$ 0.45	2.99 $\pm$ 0.87	1.16 $\pm$ 0.74	2.68 $\pm$ 1.16
200–500	2.36 $\pm$ 0.66	2.23 $\pm$ 0.59	2.46 $\pm$ 0.46	2.88 $\pm$ 1.00	1.58 $\pm$ 0.79	3.77 $\pm$ 0.87
500–1000	2.96 $\pm$ 1.14	2.12 $\pm$ 0.60	2.61 $\pm$ 0.74	2.63 $\pm$ 1.01	2.25 $\pm$ 1.02	3.41 $\pm$ 0.82
>1000	2.72 $\pm$ 0.79	1.28 $\pm$ 0.39	1.66 $\pm$ 0.60	1.15 $\pm$ 0.61	1.15 $\pm$ 0.57	2.09 $\pm$ 0.81

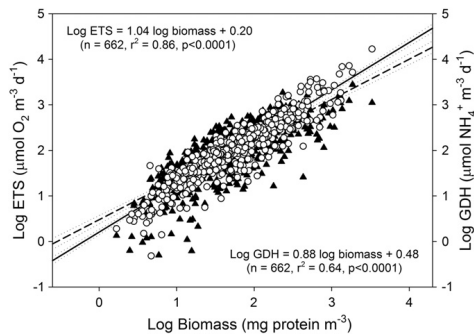


Fig. 10. Log-transformed ETS activities (open dots and solid line) and GDH activities (black symbols and dashed line) versus Log-transformed protein mass. Dotted lines limit the 95% confident interval for each regression line.

reside longer in the water-column than the phytoplankton, so they are more intensely subjected to both advection and active transport seaward. During this process, the zooplankton diet shifts gradually into omnivory (Hernández-León et al., 2002), which would sustain a highly active metabolism even offshore. Indeed, more carnivory would explain the decrease in zooplankton biomass and a more protein-based metabolism (as denoted by lower O/N ratios) towards the ocean. In contrast, specific-GDH activities fell in the highly productive transition waters, similar to the findings of Hernández-León et al. (2001) in Canary Islands' waters. Those authors showed negative correlations between GDH and both zooplankton gut content and chlorophyll-a. In fact, GDH activity not only depends on the intracellular substrate availability, but also on the energy charge of the organisms. As the guanosine-5-triphosphate (GTP) levels increase in response to the nutrient-sufficient metabolic states, GDH should be inhibited and, rather than being deaminated, amino acids such as glutamate could be used for growth and protein biosynthesis (Bidigare and King, 1981). Thus, the enhanced O/N ratios over the shelf-break implied a decrease in protein catabolism. Independently of these internal adjustments in

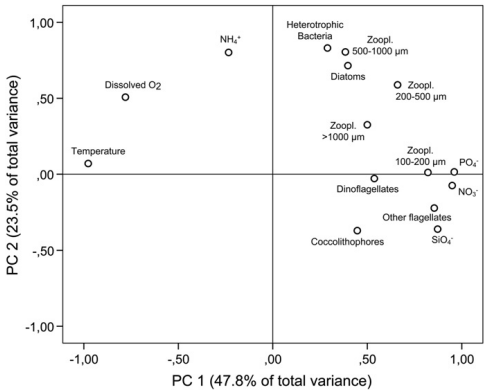


Fig. 11. Correlation matrix-based principal component analysis plotted according to the hydrographic characteristics (PC 1) and the occurrence of different biological communities (PC 2). Both axes together explained 71.3% of the total variance. Chemical variables were given in μM units, while the biological ones were correlated in terms of biomass (mg C m^{-3}). Non-normal data sets were previously normalized through the $\log(x + 1)$ transformation.

zooplankton biochemistry, both enzymatic indices showed good correlations with biomass, reflecting their constitutive nature as permanent components of living cells. Scaling exponents of 1.04 and 0.88 (Fig. 10) revealed nearly isometric relationships between the potential respiration or NH_4^+ excretion and protein-biomass, which appears to be a common feature in the metabolism of pelagic organisms (Glazier, 2006). This means that both ETS and GDH activities covary linearly with biomass. However, short-term fluctuations in the environmental conditions might force the physiology to diverge from biomass more rapidly than do the potential rates, resulting in different scaling exponents. This would impact both R/ETS and GDH/ NH_4^+ ratios (Berges et al., 1993; Fernández-Urruzola et al., 2011), but its influence would not be great enough to deter the use of these enzymes as ecological indices.

Table 3
Averaged ($\pm$ SD) net primary production (NPP) for each station, and the respiration and NH_4^+ excretion of zooplankton in the upper 75 m of the water-column. The resultant O/N ratios as well as the range of NPP (%) both respired and regenerated by zooplankton are also presented. Pseudo-age stands for the estimated age of the waters (mean $\pm$ SD), as detailed in Mohrholz et al. (this volume). Note that no SDs are given from NAM019 to NAM027 as these stations were sampled just once. A dash indicates data not determined.

Station	Pseudo-age (d)	NPP ($\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Respiration ($\text{mmol C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	% NPP _{Resp.}	NH_4^+ excretion ($\text{mmol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	% NPP _{Regen.}	O/N
NAM001	5.3 $\pm$ 2.9	64.4 $\pm$ 24.2	4.60 $\pm$ 1.81	6.9–7.2	0.45 $\pm$ 0.09	3.7–5.5	11.0 $\pm$ 8.7
NAM002	7.3 $\pm$ 3.4	123.0 $\pm$ 14.3	7.24 $\pm$ 2.41	4.4–7.0	1.01 $\pm$ 0.11	5.0–5.1	10.3 $\pm$ 7.6
NAM003	11.0 $\pm$ 1.8	123.7 $\pm$ 50.8	10.19 $\pm$ 6.14	5.6–9.4	0.95 $\pm$ 0.34	4.5–5.1	10.3 $\pm$ 7.4
NAM004	15.5 $\pm$ 4.2	169.7 $\pm$ 37.3	12.76 $\pm$ 2.55	7.4–7.7	1.60 $\pm$ 0.60	4.6–6.5	12.2 $\pm$ 10.4
NAM005	23.3 $\pm$ 10.7	184.2 $\pm$ 50.4	14.32 $\pm$ 10.54	2.8–10.6	1.74 $\pm$ 0.74	4.6–6.4	12.1 $\pm$ 7.2
NAM007	31.5 $\pm$ 16.1	215.2 $\pm$ 49.0	14.22 $\pm$ 4.87	5.6–7.2	1.44 $\pm$ 0.58	3.2–4.7	14.5 $\pm$ 11.1
NAM009	38.9 $\pm$ 10.8	210.8 $\pm$ 66.7	16.90 $\pm$ 11.30	3.9–10.2	1.55 $\pm$ 1.44	0.5–6.6	19.9 $\pm$ 13.2
NAM011	70.1 $\pm$ 18.6	196.4 $\pm$ 27.1	9.64 $\pm$ 2.79	4.0–5.6	0.82 $\pm$ 0.19	2.3–2.8	15.1 $\pm$ 10.8
NAM014	78.2 $\pm$ 8.0	109.4 $\pm$ 27.0	4.64 $\pm$ 1.29	4.1–4.3	0.98 $\pm$ 0.14	5.0–6.2	5.8 $\pm$ 2.0
NAM016	74.9 $\pm$ 11.2	113.7 $\pm$ 16.0	3.23 $\pm$ 2.18	1.1–4.2	0.79 $\pm$ 0.35	2.7–5.4	4.5 $\pm$ 2.5
NAM017	62.5 $\pm$ 22.9	154.1 $\pm$ 53.7	4.65 $\pm$ 3.44	1.2–3.9	0.93 $\pm$ 0.56	2.2–4.4	6.6 $\pm$ 3.8
NAM018	62.1 $\pm$ 15.9	110.0 $\pm$ 39.4	6.25 $\pm$ 2.56	5.2–5.9	1.06 $\pm$ 0.43	5.4–6.1	7.1 $\pm$ 2.7
NAM019	68.9	86.3	7.06	8.2	1.60	11.3	5.3
NAM020	68.7	111.0	6.39	5.8	1.12	6.2	6.3
NAM021	67.4	94.1	2.27	2.4	0.61	4.0	4.8
NAM022	82.8	106.1	5.20	4.9	0.47	2.7	12.7
NAM023	85.6	87.7	8.99	10.3	1.25	8.7	8.6
NAM024	86.8	74.1	1.97	2.7	0.59	4.9	4.5
NAM025	100.3	68.1	0.77	1.1	0.22	2.0	5.6
NAM026	104.6	72.9	0.73	1.0	0.16	1.3	6.9
NAM027	104.3	87.8	–	–	–	–	–

5. Conclusions

The distribution of zooplankton biomass as well as the impact of its metabolism on the northern Namibian phytoplankton community during active upwelling have been described here. Our results are in broad agreement with previous findings from this system. Zooplankton biomass and metabolic rates fluctuated highly with the upwelling filaments, but their maxima were characteristically observed over the outer shelf. Thus, there was a horizontal zonation determined by the hydrographic and hydrochemical conditions. The pelagic copepods dominated the zooplankton in all parts of the transect. Nevertheless, the structure of the community was strongly altered by salp blooms over the shelf-break. On average, the elemental composition of zooplankton indicated low lipid storage in the study area. This was more noticeable in neritic waters, where plankton with lower $\delta^{13}\text{C}$ such as flagellates constituted the main carbon resource for zooplankton. In addition, the spatial pattern of zooplankton- $\delta^{15}\text{N}$ in the aging advected waters revealed a progressive substitution of the nitrogen-species that sustained the biological production.

The zooplankton respiration and NH_4^+ excretion rates in the highly productive waters of the northern Benguela exceeded those measured in other upwelling systems. Still, this respiration consumed just a small proportion of the daily primary production (1.1–10.6%). Accordingly, the northern Benguela ecosystem acted as an autotrophic system during the intense wind-forcing season. High protein-specific respiration rates over the entire transect suggested an enhancement in omnivory over herbivory in the low-chlorophyll offshore area. This also explains the decrease in zooplankton biomass and the increase in protein-catabolism towards the open ocean. Parallel with the respiration, zooplankton NH_4^+ excretion only contributed 0.5 to 11.3% of primary production's nitrogen requirements. Therefore, most of the organic matter produced in these Namibian waters should be recycled through the microbial food web.

Acknowledgments

We wish to thank the crew of the RV Maria S. Merian for their assistance during the cruise, and the researchers involved in collecting the samples. We are also grateful to I. Martínez for the protein determinations, to A. Herrera for her collaboration in ETS measurements, to I. Liskow for the isotopic analyses as well as to S. Rubin for the taxonomic characterization. Furthermore, N. Wasmund kindly lent us his ^{14}C data. Comments from anonymous referees also contributed in improving the manuscript. This work was funded by the German Research Foundation (DFG) cruise support and by the BIOMBA project (CTM2012-32729/MAR). The latter was granted to M. Gómez by the Spanish Economy and Competitiveness Ministry. I. Fernández-Urruzola and N. Osma received financial support from the Formation and Perfection of the Researcher Personal Program from the Basque Government. T.T. Packard was partially supported by a grant from the Leibniz Institute for Baltic Sea Research.

References

Allredge, A.L., Madin, L.P., 1982. Pelagic tunicates: unique herbivores in the marine plankton. *Bioscience* 32 (8), 655–663.

Anderson, T.R., 1992. Modelling the influence of food C:N ratio, and respiration on growth and nitrogen excretion in marine zooplankton and bacteria. *J. Plankton Res.* 14 (12), 1645–1671.

Banase, K., 1977. Determining the carbon-to-chlorophyll ratio of natural phytoplankton. *Mar. Biol.* 41 (3), 199–212.

Benavides, M., Santana, Y., Wasmund, N., Aristegui, J., 2014. Microbial uptake and regeneration of inorganic nitrogen off the coastal Namibian upwelling system. *J. Mar. Syst.* 140, 51–57.

Berges, J.A., Roff, J.C., Ballantyne, J.S., 1993. Enzymatic indices of respiration and ammonia excretion: relationships to body size and food levels. *J. Plankton Res.* 15 (2), 239–254.

Bidigare, R.R., 1983. Nitrogen excretion in marine zooplankton. In: Carpenter, E.J., Capone, D.G. (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, pp. 385–409.

Bidigare, R.R., King, F.D., 1981. The measurement of glutamate dehydrogenase activity in *Praunus flexuosus* and its role in the regulation of ammonium excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 70 (B), 409–413.

Bode, A., Álvarez-Ossorio, M.T., 2004. Taxonomic versus trophic structure of mesozooplankton: a seasonal study of species succession and stable carbon and nitrogen isotopes in a coastal upwelling ecosystem. *ICES J. Mar. Sci.* 61 (4), 563–571.

Bode, A., Álvarez-Ossorio, M.T., González, N., 1998. Estimations of mesozooplankton biomass in a coastal upwelling area off NW Spain. *J. Plankton Res.* 20 (5), 1005–1014.

Bode, A., Barquero, S., González, N., Álvarez-Ossorio, M.T., Varela, M., 2004. Contribution of heterotrophic plankton to nitrogen regeneration in the upwelling ecosystem of A Coruña (NW Spain). *J. Plankton Res.* 26 (1), 11–28.

Bode, A., Álvarez-Ossorio, M.T., González, N., Lorenzo, J., Rodríguez, C., Varela, M., Varela, M.M., 2005. Seasonal variability of plankton blooms in the Ria de Ferrol (NW Spain): II. Plankton abundance, composition and biomass. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 63 (1–2), 285–300.

Bode, M., Schukat, A., Hagen, W., Auel, H., 2013. Predicting metabolic rates of calanoid copepods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 444, 1–7.

Boltovskoy, D., 1999. South Atlantic Zooplankton, vol. 1. Backhuys, Leiden (1075 pp.).

Boyd, A.J., Salat, J., Masó, M., 1987. The seasonal intrusion of relatively saline water on the shelf off northern and central Namibia. *Afr. J. Mar. Sci.* 5 (1), 107–120.

Boyer, D., Cole, J., Bartholomae, C., 2000. Southwestern Africa: Northern Benguela current region. *Mar. Pollut. Bull.* 41 (1–6), 123–140.

Bronk, D.A., Steinberg, D.K., 2008. Nitrogen regeneration. In: Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Carpenter, E.J. (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, London, pp. 385–467.

Brown, P.C., Painting, S.J., Cochrane, K.L., 1991. Estimates of phytoplankton and bacterial biomass and production in the northern and southern Benguela ecosystems. *Afr. J. Mar. Sci.* 11 (1), 537–564.

Calbet, A., 2001. Mesozooplankton grazing effect on primary production: a global comparative analysis in marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 46 (7), 1824–1830.

Chapman, P., Mitchell-Innes, B.A., Walker, R., 1994. Microplankton ETS measurements as a means of assessing respiration in the Benguela ecosystem. *Afr. J. Mar. Sci.* 14, 297–312.

Cury, P., Shannon, L., 2004. Regime shifts in upwelling ecosystems: observed changes and possible mechanisms in the northern and southern Benguela. *Prog. Oceanogr.* 60, 223–243.

del Giorgio, P.A., 1992. The relationship between ETS (electron transport system) activity and oxygen consumption in lake plankton: a cross-system calibration. *J. Plankton Res.* 14 (12), 1723–1741.

Dolan, R.J., Montagnes, D.J.S., Agatha, S., Coats, D.W., Stoecker, D.K., 2012. *The Biology and Ecology of Tintinnid Ciliates: Models for Marine Plankton*, 1st ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, (296 pp.).

Ducklow, H.W., Doney, S.C., 2013. What is the metabolic state of the oligotrophic ocean? A debate. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 5 (1), 525–533.

Dugdale, R.C., Goering, J.J., 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12, 196–206.

Fernández-Urruzola, I., Packard, T.T., Gómez, M., 2011. GDH activity and ammonium excretion in the marine mysid *Leptomysis lingvura*: effects of age and starvation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409 (1–2), 21–29.

Fry, B., Wainright, S.C., 1991. Diatom sources of ^{13}C -rich carbon in marine food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76, 149–157.

Gaudy, R., Youssara, F., 2003. Variations of zooplankton metabolism and feeding in the frontal area of the Alboran Sea (western Mediterranean) in winter. *Oceanol. Acta* 26 (2), 179–189.

Gibbons, M.J., 1997. An Introduction to the Zooplankton of the Benguela Current Region. Zoology department, University of Western Cape, Cape Town, South Africa, (51 pp.).

Gibbons, M.J., Hutchings, L., 1996. Zooplankton diversity and community structure around southern Africa, with special attention to the Benguela upwelling system. *S. Afr. J. Sci.* 92 (2), 63–77.

Gibbons, M.J., Stuart, V., Verheye, H.M., 1992. Trophic ecology of carnivorous zooplankton in the Benguela. *Afr. J. Mar. Sci.* 12 (1), 421–437.

Glazier, D.S., 2006. The 3/4-Power law is not universal: evolution of isometric, ontogenetic metabolic scaling in pelagic animals. *Bioscience* 56 (4), 325–332.

Hansen, F.C., Cloete, R.R., Verheye, H.M., 2005. Seasonal and spatial variability of dominant copepods along a transect off Walvis Bay (23°S) Namibia. *Afr. J. Mar. Sci.* 27 (1), 55–63.

Hansen, A., Wasmund, N., Ohde, T., 2014. Succession of micro- and nanoplankton groups in ageing upwelled waters off Namibia. *J. Mar. Syst.* 140, 130–137.

Hernández-León, S., Gómez, M., 1996. Factors affecting the respiration/ETS ratio in marine zooplankton. *J. Plankton Res.* 18 (2), 239–255.

Hernández-León, S., Ikeda, T., 2005. A global assessment of mesozooplankton respiration in the ocean. *J. Plankton Res.* 27 (2), 153–158.

Hernández-León, S., Postel, L., Aristegui, J., Gómez, M., Montero, M.F., Torres, S., Almeida, C., Kühner, E., Brenning, U., Hagen, E., 1999. Large-scale and mesoscale distribution of plankton biomass and metabolic activity in the Northeastern Central Atlantic. *J. Oceanogr.* 55, 471–482.

Hernández-León, S., Almeida, C., Gómez, M., Torres, S., Montero, I., Portillo-Hahnfeld, A., 2001. Zooplankton biomass and indices of feeding and metabolism in island-generated eddies around Gran Canaria. *J. Mar. Syst.* 30, 51–66.

Hernández-León, S., Almeida, C., Portillo-Hahnfeld, A., Gómez, M., Rodríguez, J.M., Aristegui, J., 2002. Zooplankton biomass and indices of feeding and metabolism in relation to an upwelling filament off northwest Africa. *J. Mar. Res.* 60, 327–346.

Huenerlage, K., Buchholz, F., 2013. Kill of the northern Benguela Current and the Angola-Benguela frontal zone compared: physiological performance and short-term starvation in *Euphausia hansenii*. *J. Plankton Res.* 35 (2), 337–351.

- Huggett, J., Verheye, H., Escribano, R., Fairweather, T., 2009. Copepod biomass, size composition and production in the Southern Benguela: spatio-temporal patterns of variation, and comparison with other eastern boundary upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 83 (1–4), 197–207.
- Hutchings, L., Pillar, S.C., Verheye, H.M., 1991. Estimates of standing stock, production and consumption of meso- and macrozooplankton in the Benguela ecosystem. *Afr. J. Mar. Sci.* 11 (1), 499–512.
- Hutchings, L., van der Lingen, C.D., Shannon, L.J., Crawford, R.J.M., Verheye, H.M.S., Bartholomae, C.H., van der Plas, A.K., Louw, D., Kreiner, A., Ostrowski, M., Fidel, Q., Barlow, R.G., Lamont, T., Coetzee, J., Shillington, F., Veitch, J., Currie, J.C., Monteiro, P.M.S., 2009. The Benguela Current: an ecosystem of four components. *Prog. Oceanogr.* 83 (1–4), 15–32.
- ICES, 2001. ICES Identification Leaflets for Plankton, 1939–2001. International Council for the Exploration of the Sea, pp. 1–187.
- Ikeda, T., Motoda, S., 1978. Estimated zooplankton production and their ammonia excretion in the Kuroshio and adjacent seas. *Fish. Bull.* 76 (2), 357–367.
- Ikeda, T., Skjoldal, H.R., 1989. Metabolism and elemental composition of zooplankton from the Barents Sea during early Arctic summer. *Mar. Biol.* 100, 173–183.
- Irigoin, X., 2005. Phytoplankton blooms: a “loophole” in microzooplankton grazing impact? *J. Plankton Res.* 27 (4), 313–321.
- Isla, J.A., Anadón, R., 2004. Meso-zooplankton size-fractionated metabolism and feeding off NW Spain during summer: effects of a poleward current. *ICES J. Mar. Sci.* 61 (4), 526–534.
- Isla, J.A., Ceballos, S., Anadón, R., 2004. Meso-zooplankton metabolism and feeding in the NW Iberian upwelling. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61 (1), 151–160.
- King, F.D., 1984. Vertical distribution of zooplankton glutamate dehydrogenase in relation to chlorophyll in the vicinity of the Nantucket Shoals. *Mar. Biol.* 79, 249–256.
- King, F.D., Packard, T.T., 1975. Respiration and the activity of the respiratory electron transport system in marine zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 20 (5), 849–854.
- Kjørboe, T., Møhlenberg, F., Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26, 85–97.
- Koppelman, R., Bottger-Schnack, R., Mobius, J., Weikert, H., 2009. Trophic relationships of zooplankton in the eastern Mediterranean based on stable isotope measurements. *J. Plankton Res.* 31 (6), 669–686.
- Loick, N., Ekau, W., Verheye, H.M., 2005. Water-body preferences of dominant calanoid copepod species in the Angola–Benguela frontal zone. *Afr. J. Mar. Sci.* 27 (3), 597–608.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Maldonado, F., Packard, T.T., Gómez, M., 2012. Understanding tetrazolium reduction and the importance of substrates in measuring respiratory electron transport activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 434–435, 110–118.
- Margalef, R., 1982. *Ecología*. Omega, Barcelona, (951 pp.).
- Mayzaud, P., Conover, R.J., 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45, 289–302.
- Mohrholz, V., Eggert, A., Junkers, T., Nausch, G., Ohde, T., Schmidt, M., 2014. Cross shelf hydrographic and hydrochemical conditions and its short term variability at the northern Benguela during a normal upwelling season. *J. Mar. Syst.* 140, 20–38.
- Møller, L.F., Riisgård, H.U., 2007. Respiration in the scyphozoan jellyfish *Aurelia aurita* and two hydromedusae (*Sarsia tubulosa* and *Aequorea victoria*): effect of size, temperature and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 330, 149–154.
- Moloney, C.L., 1992. Simulation studies of trophic flows and nutrient cycles in Benguela upwelling foodwebs. *Afr. J. Mar. Sci.* 12 (1), 457–476.
- Montoya, J.P., 2008. Nitrogen stable isotopes in marine environments. In: Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Carpenter, E.J. (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, London, pp. 1277–1302.
- Nausch, M., Nausch, G., 2014. Phosphorus speciation and transformation along transects in the Benguela upwelling region. *J. Mar. Syst.* 140, 39–50.
- Olivar, M.P., Barangé, M., 1990. Zooplankton of the northern Benguela region in a quiescent upwelling period. *J. Plankton Res.* 12 (5), 1023–1044.
- Otori, M., Ikeda, T., 1984. *Methods in Marine Zooplankton Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd., New York, (332 pp.).
- O'Reilly, C.M., Hecky, R.E., Cohen, A.S., Plisnier, P.D., 2002. Interpreting stable isotopes in food webs: recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnol. Oceanogr.* 47 (1), 306–309.
- Osma, N., Fernández-Urruzola, I., Packard, T.T., Postel, L., Gómez, M., Pollehe, F., 2014. Short-term patterns of vertical particle flux in northern Benguela: a comparison between sinking POC and respiratory carbon consumption. *J. Mar. Syst.* 140, 150–162.
- Owens, T., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30 (1), 27–36.
- Packard, T.T., 1979. Respiration and respiratory electron transport activity in plankton from the Northwest African upwelling area. *J. Mar. Res.* 37 (4), 711–742.
- Packard, T.T., 1985. Oxygen consumption in the ocean: measuring and mapping with enzyme analysis. In: Zirino, A. (Ed.), *Mapping Strategies in Chemical Oceanography*. American Chemical Society, Washington D.C., pp. 177–209.
- Packard, T.T., Harmon, D., Boucher, D., 1974. Respiratory electron transport activity in plankton from upwelled waters. *Tethys* 6 (1–2), 213–222.
- Packard, T.T., Devol, A., King, F.D., 1975. The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton. *Deep-Sea Res.* 22 (4), 237–249.
- Park, Y.C., Carpenter, E.J., Falkowski, P.G., 1986. Ammonium excretion and glutamate dehydrogenase activity of zooplankton in Great South Bay New York. *J. Plankton Res.* 8 (3), 489–503.
- Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. *Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, New York, (173 pp.).
- Pérez-Aragón, M., Fernández, C., Escribano, R., 2011. Nitrogen excretion by mesozooplankton in a coastal upwelling area: seasonal trends and implications for biological production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 406 (1–2), 116–124.
- Postel, L., 1995. Rostock zooplankton studies off West Africa. *Helgoländer Meeresun.* 49, 829–857.
- Postel, L., Fock, H., Hagen, W., Skjoldal, H.R., Huntley, M., 2000. Biomass and abundance. In: Harris, R.P., Wiebe, P.H., Lenz, J., Skjoldal, H.R., Huntley, M. (Eds.), *Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, San Diego, pp. 83–192.
- Postel, L., da Silva, A.J., Mohrholz, V., Lass, H.U., 2007. Zooplankton biomass variability off Angola and Namibia investigated by a lowered ADCP and net sampling. *J. Mar. Syst.* 68 (1–2), 143–166.
- Probyn, T.A., 1987. Ammonium regeneration by microplankton in an upwelling environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37, 53–64.
- Richardson, K., 1991. Comparison of ^{14}C primary production determinations made by different laboratories. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72, 189–201.
- Richardson, A.J., Verheye, H.M., 1999. Growth rates of copepods in the southern Benguela upwelling system: the interplay between body size and food. *Limnol. Oceanogr.* 44 (2), 382–392.
- Ricker, W.E., 1973. Linear regressions in fishery research. *J. Fish. Res. Board Can.* 30 (3), 409–434.
- Riedl, R., 1983. *Flora und fauna des mittelmeeeres*. Paul Parey, Hamburg und Berlin, (836 pp.).
- Rutter, W.J., 1967. Protein determination in Embryos. In: Wilt, F.H., Wessels, N.V. (Eds.), *Methods in Developmental Biology*. Academic Press, London, pp. 671–684.
- Saupe, S.M., Schell, D.M., Griffiths, W.B., 1989. Carbon-isotope ratio gradients in western arctic zooplankton. *Mar. Biol.* 103 (4), 427–432.
- Schlüter, L., Havskum, H., 1997. Phytoplankton pigments in relation to carbon content in phytoplankton communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 155, 55–65.
- Schukat, A., Teuber, L., Hagen, W., Wasmund, N., Auel, H., 2013. Energetics and carbon budgets of dominant calanoid copepods in the northern Benguela upwelling system. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 442, 1–9.
- Schukat, A., Auel, H., Teuber, L., Lahajnar, N., Hagen, W., 2014. Complex trophic interactions of calanoid copepods in the Benguela upwelling system. *J. Sea Res.* 85, 186–196.
- Segel, I.H., 1993. *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, Inc., New York, (996 pp.).
- Shannon, L.V., 2001. Benguela Current. In: Steele, J.H., Thorpe, S.A., Turekian, K.K. (Eds.), *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Academic Press, Amsterdam, pp. 255–267.
- Shannon, L.V., Nelson, G., 1996. The Benguela: large scale features and processes and system variability. In: Wefer, G., Berger, W.H., Siedler, G., Webb, D.J. (Eds.), *The South Atlantic: Present and Past Circulation*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 163–210.
- Shannon, L.V., Pillar, S.C., 1986. The Benguela ecosystem part III. *Plankton. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 24, 65–170.
- Smetacek, V., Hendrikson, P., 1979. Composition of particulate organic matter in Kiel Bight in relation to phytoplankton succession. *Oceanol. Acta* 2 (3), 287–298.
- Solorzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 14 (5), 799–801.
- Timonin, A.G., 1997. Diurnal vertical migrations of zooplankton in the upwelling area off the western coast of South Africa. *Oceanology* 37 (1), 83–88.
- Timonin, A.G., Arashkevich, E.G., Drits, A.V., Semenov, T.N., 1992. Zooplankton dynamics in the northern Benguela ecosystem, with special reference to the copepod *Calanoides carinatus*. *Afr. J. Mar. Sci.* 12 (1), 545–560.
- Trégouboff, G., Rose, M., 1978. *Manuel de planctonologie méditerranéenne*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, (587 pp.).
- Van Guelpen, L., Markle, D.F., Duggan, D.J., 1982. An evaluation of accuracy, precision, and speed of several zooplankton subsampling techniques. *J. Conseil.* 40 (3), 226–236.
- Verheye, H.M., Hutchings, L., 1988. Horizontal and vertical distribution of zooplankton biomass in the southern Benguela, May 1983. *Afr. J. Mar. Sci.* 6 (1), 255–265.
- Verheye, H.M., Hutchings, L., Huggett, J.A., Painting, S.J., 1992. Meso-zooplankton dynamics in the Benguela ecosystem, with emphasis on the herbivorous copepods. *Afr. J. Mar. Sci.* 12 (1), 561–584.
- Verheye, H.M., Richardson, A.J., Hutchings, L., Marska, G., Gianakouras, D., 1998. Long-term trends in the abundance and community structure of coastal zooplankton in the southern Benguela system, 1951–1996. *Afr. J. Mar. Sci.* 19 (1), 317–332.
- Verheye, H.M., Rogers, C., Maritz, B., Hashoongo, V., Arendse, L.M., Gianakouras, D., Giddey, C.J., Herbert, V., Jones, S., Kemp, A.D., C. R., 2001. Variability of zooplankton in the region of the Angola–Benguela Front during winter 1999. *S. Afr. J. Sci.* 97, 257–258.
- Vinogradov, M.E., Shushkina, E.A., 1978. Some development patterns of plankton communities in the upwelling areas of the Pacific ocean. *Mar. Biol.* 48, 357–366.
- Vinogradov, M.E., Metshunkin, V.V., Shushkina, E.A., 1972. On mathematical simulation of a pelagic ecosystem in tropical waters of the ocean. *Mar. Biol.* 16, 261–268.

Declaration

I herewith declare that I have produced this work without the prohibited assistance of third parties and without making use of aids other than those specified; notions taken over directly or indirectly from other sources have been identified as such. This work has not previously been presented in identical or similar form to any examination board.

The dissertation work was conducted from 2010 to 2015 under the supervision of María M. Gómez Cabrera and Theodore Train Packard at the University of Las Palmas de Gran Canaria.

Las Palmas de Gran Canaria,

This dissertation was finished writing in Las Palmas de Gran Canaria on
2nd November, 2015

