

*Evaluación de la Actividad del Sistema de
Transporte de Electrones en Zooplancton en
Presencia o Ausencia de Sustratos Específicos*

Presentado
Por:
FEDERICO MALDONADO URIBE

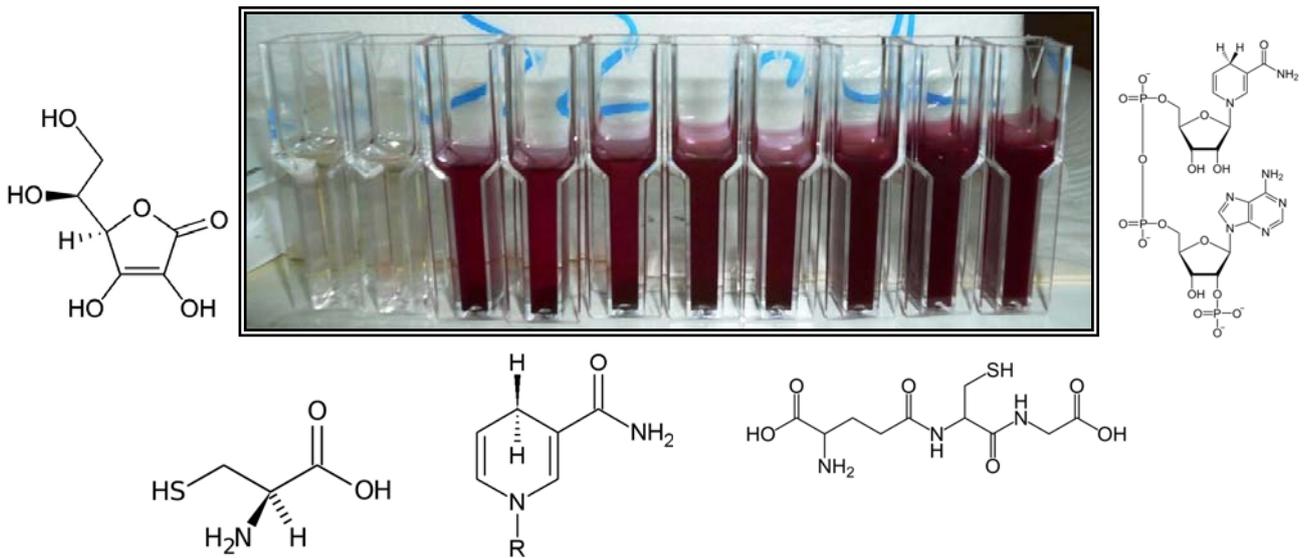
Trabajo para optar al título de suficiencia investigadora

Tutores:
María M. Gómez
Ted Packard

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Programa de Oceanografía Biológica
Las Palmas de Gran Canaria, España
2009

*Evaluación de la Actividad del Sistema de
Transporte de Electrones en Zooplancton en
Presencia o Ausencia de Sustratos Específicos*

Presentado
Por:
FEDERICO MALDONADO URIBE



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Programa de Oceanografía Biológica
Las Palmas de Gran Canaria, España
2009

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5. CONCLUSIONES.....	25
AGRADECIMIENTOS.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. INTRODUCCIÓN

El metabolismo es el proceso biológico en el cual se intercambia materia y energía, en donde, tanto los organismos son afectados por su entorno, como ellos moldean su ambiente incluso, a escalas planetarias (Brown *et al.*, 2004; Nelson & Cox, 2006).

La tasa de consumo de O₂ (respiración), es un indicativo del estado fisiológico de un organismo o de una comunidad, proporcionando datos de los flujos de carbono en las redes tróficas. Los organismos consumen energía en forma de lípidos, carbohidratos y proteínas, oxidando la materia orgánica en su metabolismo. El papel del sistema de transporte de electrones, es el de potenciar la producción de ATP, en el cual se consume un 90% del oxígeno a nivel celular en los organismos (Gómez *et al.*, 1996; Packard, 1985b; Nelson & Cox, 2006).

Las actividades enzimáticas han sido usadas para estudiar muchos procesos biológicos en los sistemas acuáticos. Los ensayos enzimáticos (Figura 1) se caracterizan, entre algunas cosas, por la especificidad que debe existir entre la enzima a probar y su sustrato y por que la velocidad decrece en el tiempo (Dixon & Weeb, 1979).

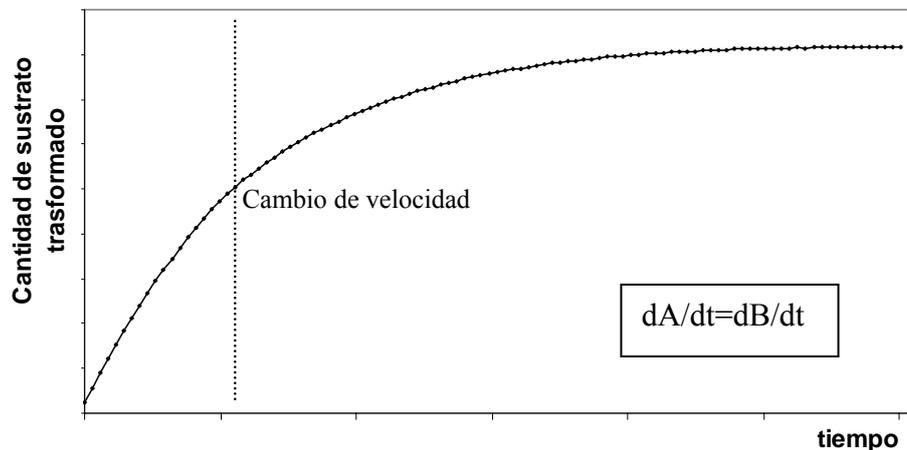


Figura 1. Curva de progresión de una reacción enzimática. Se suele tomar la velocidad inicial (previo al cambio de velocidad), para garantizar las mediciones enzimáticas. El recuadro se muestra la relación entre el sustrato original (A) y el producto (B).

Los primeros estudios en las bases enzimáticas de la respiración acuáticas, fueron reportados por Curl & Sandberg (1961), sugiriendo que el uso de succinato deshidrogenasa sirve para estimar las tasas respiratorias en el zooplancton, comprobado luego por Packard & Taylor (1968). Pearre (1964), demostró que la actividad de dicha enzima no es efectiva en la actividad respiratoria del fitoplancton, descartando esta enzima como mecanismo de medición de las tasas respiratorias del plancton, ya que es sensible solo a una fracción de este.

Es así como Packard (1971), sugiere que la medición de la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) se debe determinar midiendo la actividad enzimática que controla el consumo de oxígeno, no las deshidrogenasas. Proponiendo por primera vez el uso del cloruro de tetrazolium 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl (INT), para detectar la actividad oxidativa presente en las mitocondrias y microsomas de las células, donde un complejo sistema de citocromos, flavo-proteínas e iones metálicos, transportan los electrones de nutrientes procesados hacia al oxígeno (Figura 2). Para eso, se satura de sustratos específicos (NADH y succinato donadores de electrones en el ETS mitocondrial y NADPH donadores de electrones del ETS microsomal), para garantizar la especificidad (Dixon & Webb, 1979) de este proceso metabólico. El INT reducido (formazán), es un compuesto coloreado que se puede registrar espectrofotométricamente. La relación estequiométrica es: dos moles de formazán, equivalen a un mol de oxígeno consumido (Gómez *et al.*, 1996; Packard & Christensen, 2004).

En uno de los primeros estudios realizados con esta metodología (Hobbie *et al.*, 1972), se encuentra que este tiene buena relación con otras técnicas de respiración (respirometría y stocks permanentes de ATP), pero esta correspondencia solo se mantiene para comunidades que se encuentren por encima de los 200 metros en la columna de agua.

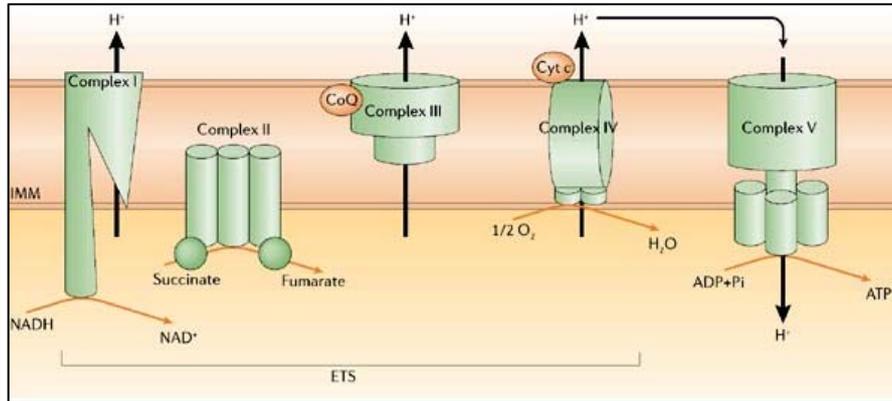


Figura 2. Diagrama esquemático del sistema de transporte de electrones mitocondrial (tomado de Abou-Sleiman et al., 2006), donde una molécula de NADH dona dos electrones al complejo I, y estos son transportados por la ubiquinona (CoQ) al complejo III, de donde el citocromo-C (Cyt c) toma un electrón que lleva al complejo IV, donde un átomo de oxígeno reacciona con dos electrones y dos protones, para producir dos moléculas de agua.

Owens & King (1975), realizan trabajos sobre zooplancton e introducen un primer cambio a la metodología, añadiendo Triton X-100, detergente no aniónico que mejora la solubilidad del formazán. Gómez *et al.* (1996), realizan mejoras al tratamiento de las muestras, ya que determina que pueden ser preservadas en nitrógeno líquido hasta al menos por dos meses y que durante el procesamiento de estas pueden estar hasta 90 minutos en baño de hielo, sin perder la actividad enzimática. También establecen que el uso de filtros en muestras de zooplancton no es necesario para la homogenización ya que su mismo exoesqueleto hace el papel de agente abrasivo.

Debido a que esta técnica comienza a cobrar adeptos, se desarrollan adaptaciones basadas en la propuesta original, generando una gran cantidad de información pero haciéndola poco comparativa, es por esto que Christensen & Packard (1979), comparan seis metodologías diferentes de ETS (Packard 1969, 1971; Devol, 1975; Kenner & Ahmed, 1975a; Owens & King, 1975 y Christensen & Packard, 1977), en donde obtienen diferentes relaciones entre ellas y concluyendo que el uso de Triton X-100 aumenta la señal de la actividad de él ETS.

Según Arístegui y Montero (1995), algunas de las ventajas de este método es la estimación inmediata de tasas de respiración y lo más importante eliminando los efectos del trabajo *in vitro*. Pero en detrimento de esta técnica, es que muestra un índice y no un valor cuantitativo; sin embargo se han encontrado buenas correlaciones del ETS y las tasas respiratorias *in vivo* (Båmstedt, 1980; Arístegui y Montero, 1995; Hernández-León y Gómez, 1996).

Båmstedt (2000), dio un giro total al concepto metodológico que se venía empleando para la estimación del ETS, ya que realiza el ensayo sin saturar el sistema con sustratos (NADH y NADPH). Este autor propone que sin añadir sustratos se esta obteniendo una medición real de la respiración de los organismo, teniendo como base las concentraciones naturales de sustratos de las muestras. Generando un debate, hasta hoy abierto sobre que metodología se ajusta más a los valores reales de la respiración en sistemas acuáticos.

El ETS ha sido usado para determinar la tasa potencial respiratorio en muchos organismos y comunidades como: microplancton (Packard, 1985; Arístegui & Montero, 1995, 2005; Choi *et al.*, 1999), bentos (Cammen *et al.*, 1990; Relaxans, 1996), fitoplancton (Kenner & Ahmed, 1975a,b), zooplancton (Hernández-León, 1988; Hernández-León & Gómez, 1996; Simcic & Brancelj, 2004; Minutoli & Guglielmo, 2009) entre otros.

Para establecer si la adición, por si sola de INT a muestras biológicas, puede registrar valores de respiración; se probara esta sal con diferentes compuestos a concentraciones intracelulares, para ver si esta sal se reduce al interaccionar con estos, de ser así la no adición de dichos sustratos estaría dando una señal no relacionada con las funciones respiratorias.

Lo anterior complementado con metodologías que se basan en la adición o no de dichos sustratos, contrastado con mediciones de consumo de oxigeno en condiciones controladas de laboratorio, darán resultados más concluyentes a los que se deben de enfrentar los trabajos de investigación que deseen estudiar

respiración a través de metodologías que contemplen el ETS, y así unificar los conceptos y poder realizar a mayor escalas diagnósticos más precisos de las diferentes problemáticas que aquejan los sistemas acuáticos como lo son la variabilidad espacial-temporal, cambio climático entre muchas otras.

2. OBJETIVOS

Objetivo:

Determinar si la no adición de sustratos (Båmsted, 2000), detecta la actividad del sistema de transporte de electrones.

Objetivos concretos e interés de los mismos

Objetivo 1) Establecer mediante la comparación de dos métodos para la medición del ETS (Båmstedt, 2000 y Owens & King, 1975), cual es el más eficaz y sensible, para detectar la actividad enzimática del ETS.

Objetivo 2) Determinar si hay reducción no enzimática del INT, por acción de algunos de los compuestos típicos intracelulares, ajenos al sistema de transporte de electrones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Comparación de dos métodos para la medición del ETS (Båmstedt, 2000 y Owens & King, 1975). Se quiere determinar cual método es el más eficaz y sensible, para detectar la actividad enzimática del ETS.

Los ensayos son realizados con machos adultos del crustáceo *Leptomysis lingvura*, colectados en diferentes oportunidades (17 y 28 de septiembre y 18 de octubre de 2009) en Risco Verde (Gran Canaria). Los organismos se mantienen bajo condiciones controladas ($\approx 24-26^{\circ}\text{C}$ y alimentados con *Artemia salina* enriquecida con Easy-DHA Selco®), por lo menos por dos días antes de cualquier análisis. Cada organismo es congelado en nitrógeno líquido para su posterior análisis de ETS y biomasa.

Comparación de métodos

Para determinar si la adición de sustratos al ETS es determinante, se emplean dos metodologías, la propuesta por Båmstedt (2000), en la cual no se utilizan sustratos y la metodología base con la que este autor compara (Owens & King, 1975), donde se usan el NADH y el NADPH como sustratos.

El método de detección del ETS según Båmstedt (2000)

Cada animal es homogenizado en 1.5ml de una solución única (hydroxymethyl aminomethan [Tris] 0.05M + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075mM + polivinilpirrolidona [PVP] 1.5 mg/ml + Triton X-100 2 ml/l + INT 2 mg/ml en solución de fosfato 0.01M; todo ajustado con HCl a pH: 8.5).

El homogenizado es transferido a un tubo graduado; se mide el volumen y se toman 200 μl de este para el posterior análisis de proteínas. El homogenizado

restante es incubado durante 1 hora a 40°C, al mismo tiempo se hace incubación del blanco (sin material biológico). La reacción se detiene con 0.2 ml/ml_{homogenizado} de solución Quench (formaldehído y H₃PO₄ 1M; 1:1), a continuación se añade un mililitro de medio de extracción (cloroformo y metanol; 2:1), se agita y centrifuga (3000 rpm durante dos minutos). El sobrenadante se elimina y se agrega metanol hasta alcanzar los 3ml, se mezcla y centrifuga (3000 rpm durante 2 minutos). Se lee en el espectrofotómetro a 475 nm (Figura 3).

El método de detección del ETS según Owens & King (1975)

La muestra, es homogenizada durante un minuto en 1.5ml de Solución ETS B (MgSO₄ 75µM + PVP 1.5 mg/ml y Triton X-100 0.2% (v.v); todos estos en 0.1M buffer fosfato y pH: 8.5). Se registra el volumen del homogenizado y se centrifuga a 2000 rpm durante dos minutos, manteniendo la temperatura 0-4°C. Se toman 0.5 ml del sobrenadante y es incubado con 1.5 ml Solución Sustrato (NADH 1.7 mM + NADPH 0.25mM y Triton X-100 2 ml/L) y 0.5ml de INT (2 g/L). Se pone en el espectrofotómetro (490 nm) modo cinético, durante 10 minutos (Figura 4).

Determinación de proteínas (biomasa)

Se prepara la solución Rutter (70mL de Na₂CO₃ 0.9M + NaOH 0.45N y Tartrato de NA-K 2% + 1.4mL de CuSO₄·5H₂O 1%) y de Folin (folin-ciocalteu's phenol; 1:1).

Se centrifugan las muestras, a 2000 rpm para Owens & King y 300 rpm para Båmstedt, durante 2 minutos y se colocan en baño de hielo. Se toman 100µL de sobrenadante y de ser necesario se realiza una dilución, con agua Milli-Q. Se toman 100µl de cada muestra y se añaden 0.5ml de reactivo Rutter, se esperan 10 minutos y se añade 50µL de reactivo Folin. Se mantienen en oscuridad durante 40 minutos, agitando cada cierto tiempo. Se realiza una lectura a 750nm (Lowry et al. (1951); Rutter (1967)).

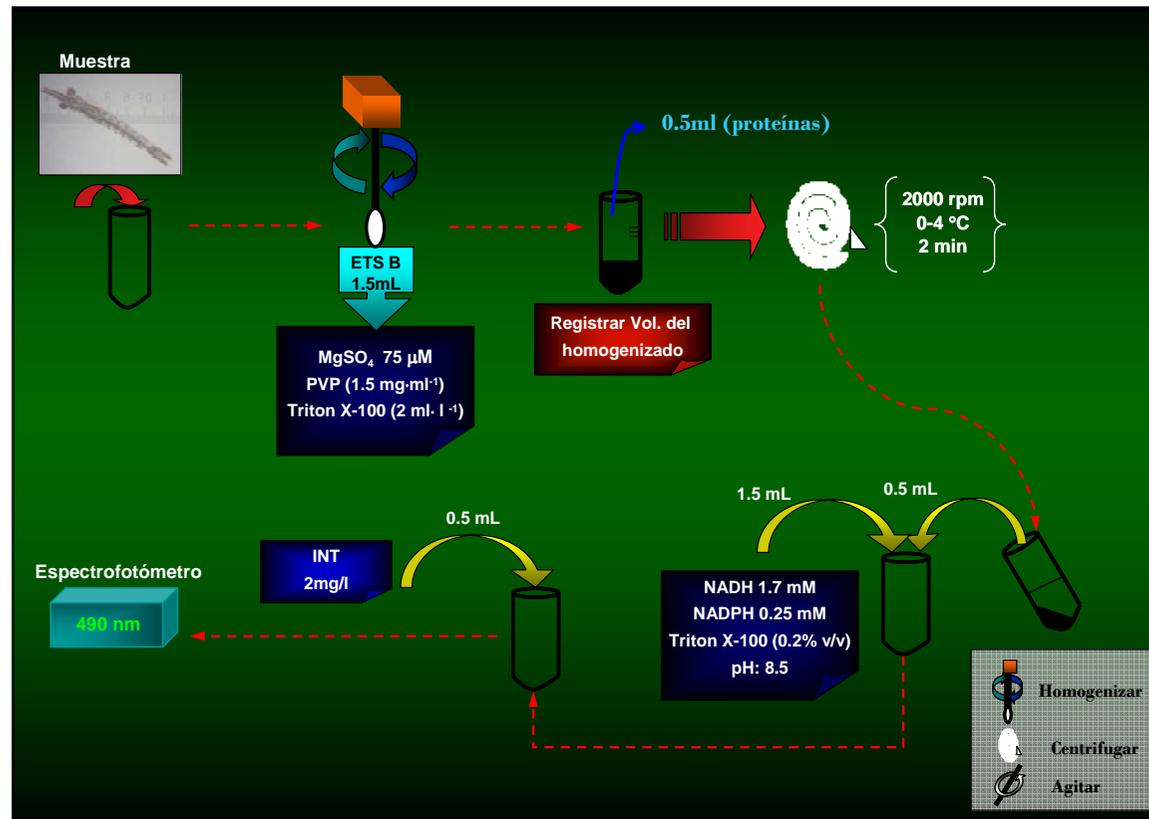


Figura 3. Esquema metodológico de los diferentes pasos empleada según Owens & King (1975).

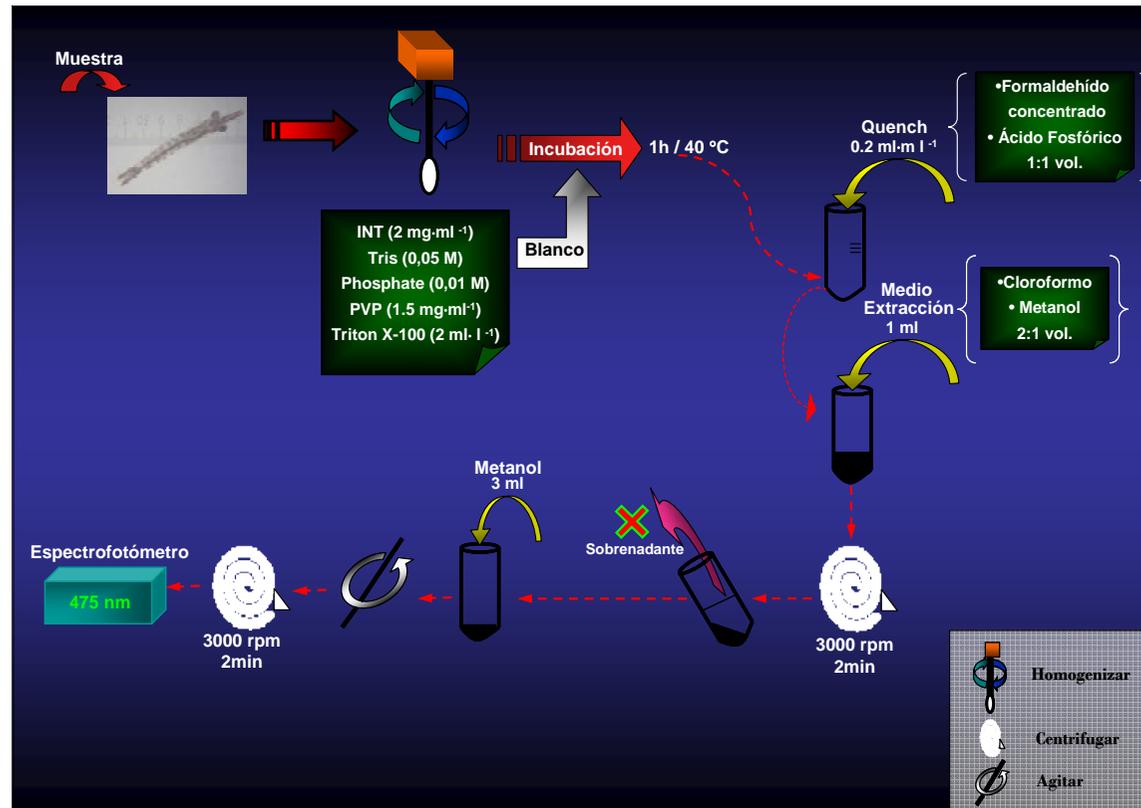


Figura 4. Esquema de los diferentes pasos en la metodología propuesta por Bámstedt (2000). Nótese que solo se usa un reactivo y no hay adición de ningún tipo de sustrato.

3.2. Estudio de la reducción no enzimática del INT. Se investiga la producción de formazán por acción de algunos compuestos intracelulares, ajenos al sistema de transporte de electrones.

Reducción del INT por algunas sustancias intracelulares

Debido a que el INT no es un compuesto desarrollado exclusivamente para ser reducido por el sistema de transporte de electrones, se teme que la no adición de sustratos puede causar que esta sal se reduzca por causa de compuestos celulares diferentes a este sistema. Para determinar si esto es posible, se prueban seis compuestos (Tabla 1). Estas sustancias son de conocida importancia y distribución entre los organismos, es por eso importante saber cual es su función y las posibles concentraciones de los compuestos en cuestión.

Tabla 1. Sustancias intracelulares probadas para ver su incidencia en la reducción de la INT.

Acido ascórbico	Panreac 131013.1208
Cisteína	Panreac Sintesis 15B512.1206
Fenol	Merck 8.22296.0100
Glucosa	Panreac 131341.1210
Glutati3n reducido	Merck 4090
Vitamina B ₁₂	Sigma-aldrich 117K1520

Cisteína

Esta se encuentra en el grupo de los aminoácidos denominados R-polar sin carga, lo que los hace más hidrosolubles. Ayuda a la degradación del acetyl Co-A y se oxida fácilmente a cistina (Nelson & Cox, 2006).

La cisteína es una fuente de tioles no proteicos y puede ser una primera línea de defensa contra oxidantes y metales pesados (Satoh *et al.*, 2002), ya que puede regular la actividad de metales traza en la célula (Rijstenbil & Wijnholds, 1996; Kosakowska *et al.*, 1988), así mismo Bidle & Falkowski (2004) determinan que es determinante en la muerte celular programada. (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de cisteína presentes en diferentes organismos. La determinación de Satoh et al (2002), es por la técnica del ácido nítrico, las demás por HPLC.

DIVISIÓN	ORGANISMO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
Prasinophyta	<i>Tetraselmis tetrathele</i>	2.23 ± 0.56 mM	Satoh et al., 2002
Rhodophyta	<i>Porphyridium purpureum</i>	12 ± 2.2 mM	
Chrysophyta	<i>Pavlova</i> sp.	1.3 ± 0.18 mM	
Haptophyta	<i>Pleurochrysis carterae</i>	0.66 ± 0.23 mM	
	<i>Isochrysis</i> sp.	4.43 ± 1.7 mM	Dupont et al., 2004
	<i>Emiliana Huxley</i>	-2-8 picomol/cell	
Bacillariophyta	<i>Talassiosira pseudonana</i>	-1.7-3.7 picomol/cell	Rijstenbil & Wijnholds, 1996
		0.015 mM	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.039 mM	
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.01 mM	

Glutación

Tripéptido proveniente de la glicina, glutamato y la cisteína, presente en todas las células eucarióticas y algunas procarióticas (Nelson & Cox, 2006; Newton et al., 1996). En algunas ocasiones puede ser de los pequeños péptidos y/o tioles intra-celulares el más abundante, alcanzando en algunos casos el 90% de los tioles no proteicos en algas (Dupont et al., 2004).

Una de sus más importantes funciones es la de protección contra especies reactivas de oxígeno, ayudar en la homeostasis, desintoxicación y resistencia contra metales pesados (Kawakami et al., 2006; Dupont et al., 2004; Ahner et al., 2002; Satoh et al., 2002), sumado a su capacidad ligante a metales pesados en algunas algas (Steffens, 1990; Rauser, 1995) (Tabla 3).

La vitamina B₁₂ (VB₁₂) o cianocobalamina

Es la más potente de las vitaminas y puede que la más compleja y estable (por ser la más grande), de estas bio-moléculas (Ellenbogen & Cooper, 1991). Algunos autores (e.g.: Ohwada et al., 1972; Menzel & Spaeth, 1962; Daisley, 1958;

Guillard & Cassie, 1963), han determinado la relación y dependencia de esta vitamina con el incremento de clorofila *a* de algunas algas. Esta vitamina puede evitar daños por contaminación por Cd en *Euglena gracilis* (Watanabe & Suzuki, 2001).

Tabla 3. Concentraciones de glutatión presentes en diferentes organismos. Los métodos fueron realizados por HPLC (excepto indicación).

DIVISIÓN	ORGANISMO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
Euglenophycota	<i>Euglena gracilis</i>	0.2 mM [*]	Coppellotti 1989
Prasinophyta	<i>Tetraselemis tetártele</i>	1.25 ± 0.37 mM [*]	Satoh <i>et al.</i> 2002 ^ˆ
Rhodophyta	<i>Porphyridium purpureum</i>	0.45 ± 0.07 mM [*]	
Chrysophyta	<i>Pavlova</i> sp.	0.34 ± 0.10 mM [*]	
Haptophyta	<i>Isochrysis</i> sp.	0.75 ± 0.07 mM [*]	
	<i>Pleurochrysis carterae</i>	0.13 ± 0.04 mM [*]	
Bacillariophyta	<i>Emiliana huxley</i>	-0.035-0.078 fmol/cell	Dupont <i>et al.</i> , 2004
		2.4 mM (0.5-2.4) [○]	Ahner <i>et al.</i> , 2002
	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	2.0 Mm (1.1-1.9) [○]	Ahner <i>et al.</i> , 2002
		- 0.045-0.24 fmol/cell	Dupont <i>et al.</i> , 2004
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1.9 mM (1.3-2.9) [○]	Ahner <i>et al.</i> , 2002
		1.022 ± 0.033 mM	Rijstenbil & Wijnholds, 1996
	<i>Ditylum brightwellii</i>	0.081 ± 0.003 mM	
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.452 ± 0.03 mM	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	3.105 ± 0.006 mM	
		0.78 mM (0.56-2.1) [○]	Ahner <i>et al.</i> , 2002
Chlorophyta	<i>Dunaliella</i> sp.	1.7 mM (1.1-2.2) [○]	Ahner <i>et al.</i> , 2002
Decapoda (orden)	<i>Sinopotamon yangtsekiense</i>	45.67 ± 0.917 mg/g proteína [*]	Wang <i>et al.</i> , 2008. [˜]
Aguas costeras		8 – 699 pM [‡]	Matrai & Vetter, 1988

[‡] Valores de glutatión particulado.

[˜] Kit comercial (Beyotime Institute of

Biotechnology).

^ˆ GSSG “recycling method”.

^{*} Concentraciones glutatión reducido (GSH).

[○] Rangos para algunos tratamientos expuestos a Cd y Cu.

Valores libres de VB₁₂ en aguas continentales, son mayores a 4pM (Kurata, 1986) y en ambientes marinos de 2 pM (Carlucci, 1970), sin embargo Croft *et al.* (2005), establecieron por cultivos, que estos valores deberían ser mayores (~7 pM) para poder mantenerla comunidad.

Debido a su importancia y a que pocos organismos la producen, se ha tratado de determinar las concentraciones en diferentes organismos (Tabla 4). La

variabilidad de resultados para determinar AA puede ser debido a las distintas metodologías empleadas (Marchie *et al.*, 1995).

Tabla 4. Concentraciones de vitamina VB₁₂ en algunos organismos. PS: peso seco.

DIVISIÓN	ORGANISMO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
Brachipoda	<i>Artemia franciscana</i>	3.5 ± 0.8 µg/g PS	Maeland <i>et al.</i> , 2000
Bacilloriphyta	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	8 µg/g PS	De Roeck-Holtzhauer, 1991
	<i>Skeletonema costatum</i>	117 µg/g PS	
Chrysophyta	<i>Pavlova lutheri</i>	1162 µg/g PS	
Haptophyta	<i>Isochrysis galbana</i>	89 µg/g PS	
Phaeophyta	<i>Sargassum muticum</i>	10 µg/g PS	
Prasinophyta	<i>Tetraselmis suecica</i>	9 µg/g PS	

El ácido ascórbico (AA)

Esta presente en muchas actividades químicas debido a su capacidad de donar uno o dos electrones, así mismos como en el metabolismo de nutrientes y en el funcionamiento de una gran variedad de enzimas (en algunos casos actuando como antioxidante). Su actividad depende de muchos factores como el pH (siendo más estable entre 4-6), temperatura y metales como el Cu. El AA nunca ha sido encontrado en levaduras y procariotas, exceptuando las cianobacterias la mayoría de organismos superiores no pueden producir esta vitamina, teniendo que adquirirla de sus diferentes fuentes alimenticias (De Roeck-Holtzhauer *et al.*, 1991) (Tabla 5).

Glucosa

Es una subunidad monomérica del almidón (usada para almacenamiento, transporte y una importante precursora molecular), posee cinco carbonos asimétricos pero biológicamente esta presente de una forma quiral, siendo el isómero D, el más abundante de los monosacáridos en la naturaleza (Nelson & Cox, 2005; Hasegawa *et al.*, 2005). Ittekkot *et al.* (1981), muestra que el almidón compromete más del 60% de la fracción combinada de carbohidratos disueltos y el 90% de los carbohidratos disueltos libres (Tabla 6).

Tabla 5. Concentraciones de ácido ascórbico en diferentes clases de organismos así como para muestras naturales. PS, peso seco.

DIVISIÓN	ESPECIE	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
Haptophyta	<i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO)	3806/1129* µg/g PS	Marchie <i>et al.</i> , 1995
Prasinophyta	<i>Tetraselmis suecica</i>	1090 µg/g PS	
Xanthophyta (no IT IS)	<i>Nannochloropsis oculata</i>	1510* µg/g PS	
Erotatoria	<i>Brachionus plicatilis</i> (L-strain)	130 ± 20 µg/g PS	
Bacillariophyta	<i>Skeletonema costatum</i>	5400 µg/g PS	Brown & Miller, 1992
		59 µg/g PS	
		38 x10 ⁻⁸ - 70x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Brown & Miller, 1990
	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	121 µg/g PS	De Roeck-Holtzhauer <i>et al.</i> , 1991
		4.4x10 ⁻⁸ - 3.6x10 ⁻⁸ µg/cell PS	
Chlorophyta	<i>Chaetoceros gracilis</i>	51 x10 ⁻⁸ - 15.8 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Brown & Miller, 1990
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	4.6 x10 ⁻⁸ - 2.1x10 ⁻⁸ µg/cell PS	
	<i>Dunaniella tertiolecta</i>	16.6 x10 ⁻⁸ - 31.6 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	
Chlorophyta	<i>Nannochloris utomus</i>	7.6 x10 ⁻⁸ - 9.1 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Marchie <i>et al.</i> 1995
	<i>Chlorella</i> sp.	3740 µg/g PS	
	<i>Pavlova lutheri</i>	837 µg/g PS	
Cryptophycophyta	<i>Chroomonas salina</i>	4x10 ⁻⁸ - 5.6 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Brown & Miller, 1990
		29.5x10 ⁻⁸ - 16.3 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	
Haptophyta	<i>Isochrysis</i> sp. (T.ISO)	7.6x10 ⁻⁸ - 6.7 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Marchie <i>et al.</i> 1995
		3806/1129* µg/g PS	
	<i>Isochrysis galbana</i>	772 µg/g PS	
Prasinophyta	<i>Tetraselmis suecica</i>	498 µg/g PS	Marchie <i>et al.</i> 1995
		53x10 ⁻⁸ - 43.5 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	
Xanthophyta (no ITIS)	<i>Nannochloropsis oculata</i>	6.1x10 ⁻⁸ - 0.94 x10 ⁻⁸ µg/cell PS	Brown & Miller, 1990
Phaeophyta	<i>Sargassum muticum</i>	560 µg/g PS	Marchie <i>et al.</i> 1995 [◊]
Brachiopoda	<i>Artemia franciscana</i>	692 ± 89 µg/g PS	Maeland <i>et al.</i> 2000 [◊]
	Zooplancton del medio	440 - 1020 µg/g PS	

[◊] HPLC

* Valores para: estado tardío crecimiento en inanición/en cultivo de levaduras

[◊] Fluorometría y HPLC

La concentración intracelular parece esta controlada por la concentración ambiental y en el caso del fitoplancton por la disponibilidad de nutrientes y la presencia de zooplancton (Ittekkot *et al.*, 1981; Wenquan *et al.*, 1993).

Tabla 6. Concentraciones ambientales de glucosa en diferentes formas presentes en el medio, carbohidratos combinados disueltos (CCD) y carbohidratos libres disueltos (CLD).

	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
CCD	≈ 108-216 μg /l	Ittekkot <i>et al.</i> , 1981
CLD	≈ 27-108 μg /l	

De cada una de las sustancias anteriormente descritas, se preparan diferentes concentraciones intracelulares (0.75, 1.5, 1.25, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 y 0.005mM), de cada uno de estos compuestos se preparo en un tampón fosfato 0.5M - pH: 8 (6.72g Na₂HPO₄ + 0.36g KH₂PO₄ + 18.5mg MgSO₄·7H₂O + 1,5g polivinil pyrrolidona + 2ml Triton X-100). Para el caso de la vitamina B₁₂, se procede con otras concentraciones (0.2625; 5.25x10⁻⁴ y 5.25x10⁻⁵mM), ya que a las concentraciones originalmente plateadas genera una fuerte tinción rojiza, enmascarando o interfiriendo en la lectura del formzán. En el caso del AA se disminuyen las concentraciones (1x10⁻⁴, 5x10⁻⁴, 1x10⁻³, 5x10⁻³, 0.01, 0.05 y 0.25mM), por lo agresivo de la reacción.

Para cada ensayo se añade 1 ml de cada concentración mas 0.5 ml de INT (2 mg/l), en una foto-celda de 1cm de diámetro, la medición se realiza en espectrofotómetro (Beckman DU[®] 650) a 490 nm, en modo cinético durante 20 minutos en orden de registrar la reacción completa (Figura 5).

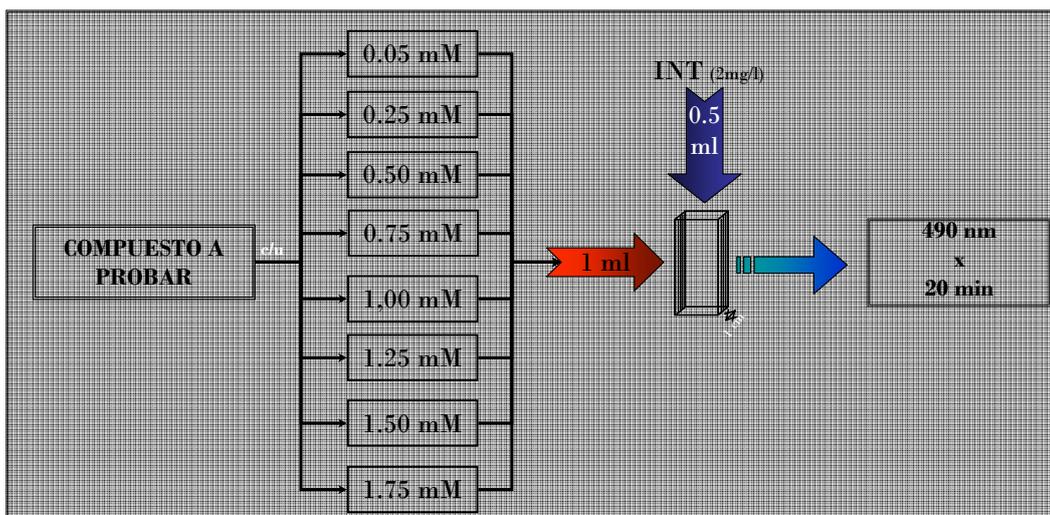


Figura 5. Esquema metodológico para la reducción de la sal INT por cada uno de los compuestos, a diferentes concentraciones (columna del medio).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación de métodos

La actividad de ETS para la metodología propuesta Owens & King (1975) (OK), muestra un comportamiento típico a las mostradas en diferentes estudios (Savenkoff *et al.*, 1995; Packard *et al.*, 1996; Packard & Gómez, 2008), donde se ve una clara actividad a la adición de sustratos reflejado en el aumento de formazán en el tiempo y en el caso contrario al no añadirlos (blanco) (Figura 6).

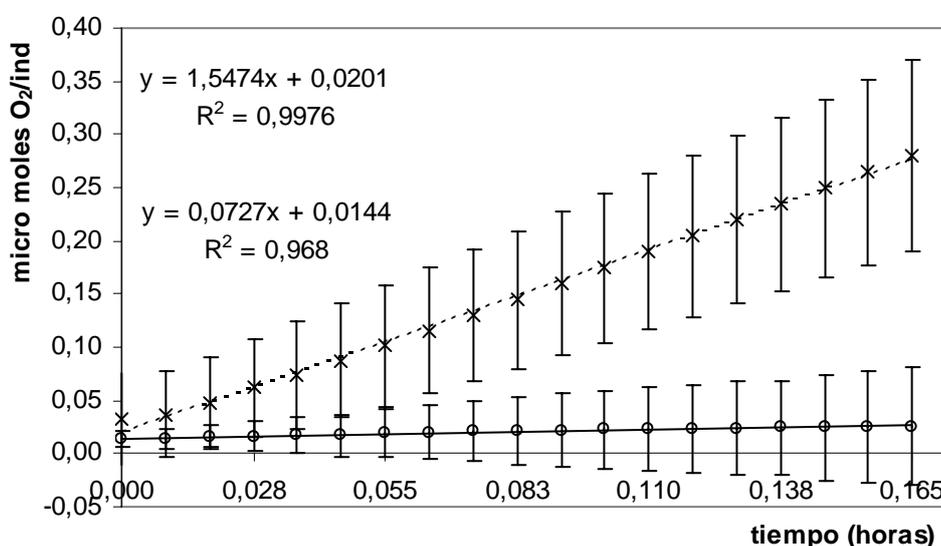


Figura 6. Promedio en cada fracción de tiempo de los equivalentes de oxígeno de la producción de formazán, de las muestras (x) con sustrato (o), registradas en la metodología de Owens & King (1975). Desviación estándar correspondientes a cada tiempo (n=48).

Aunque, no se puede comparar la producción de formazán a través del tiempo, ya que la metodología de Båmsted, detiene la reacción después de la incubación y realiza una serie de pasos de extracción, que impide hacer el seguimiento de la reducción del INT, al hacer la comparación del consumo de oxígeno obtenido por los métodos evaluados, con respecto a la biomasa, se denota una clara diferencia en la señal (Figura 7), que se hace mucho más evidente, al comparar la actividad de los blancos del método de OK con la actividad presentada por la de Båmsted (Figura 8).

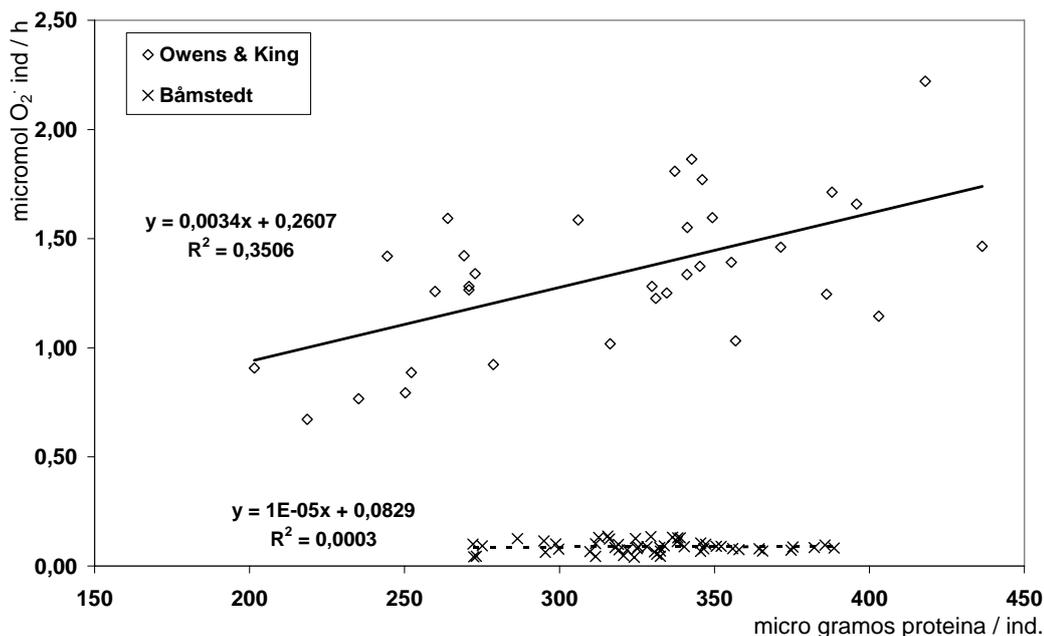


Figura 7. Comparación del consumo de equivalentes de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{individuo/hora}$), entre las metodologías probadas de Owens & King (n=35) y Båmstedt (n=55).

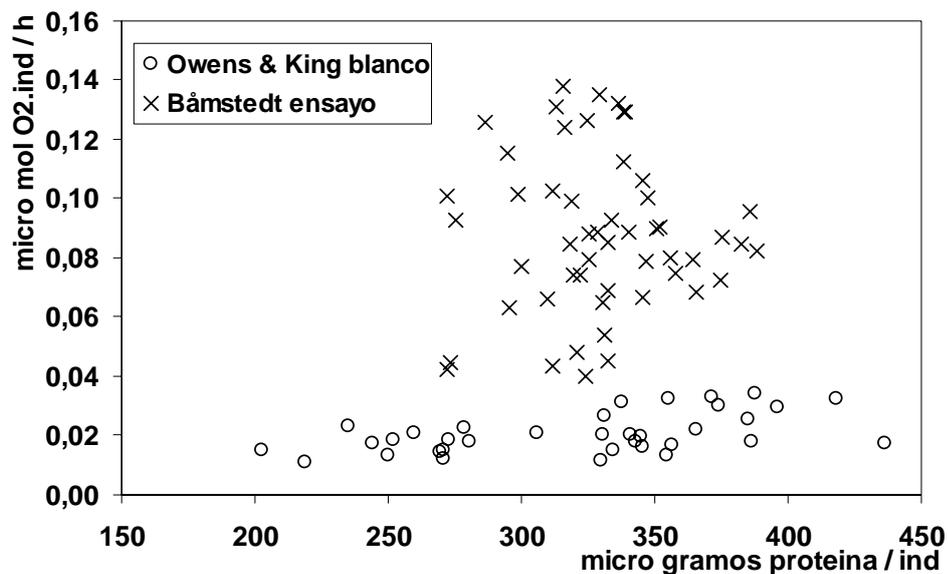


Figura 8. Comparación de equivalentes de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{individuo/hora}$) debido a la producción de formazán, entre los resultados obtenidos por la metodología descrita por Båmstedt (2000) (n=55) y el blanco de la metodología de Owens & King (1975) (n=35).

La variabilidad presente en los resultados puede deberse a factores como que los individuos proceden del medio natural, lo que los hace susceptibles a presentar diferentes actividades fisiológicas, en respuesta a las condiciones del entorno, sumado a que fueron colectados en tres fechas diferentes.

Los resultados obtenidos con la metodología de Båmstedt presentan una menor correlación entre los datos ($r^2=0.0031$), que se puede deber a lo anteriormente expuesto y a la no especificidad de la reacción, que se busca en los ensayos de tipo enzimático (Dixon & Webb, 1979).

4.2. Reducción de la INT por algunas sustancias intracelulares

El ácido ascórbico, presenta una reacción muy agresiva, agotando la máxima velocidad de reacción en 2 minutos aproximadamente, para todas las concentraciones. Se observa que el elemento limitante es el AA, ya que la reducción del INT esta condicionada por la concentración del AA, debido a que en concentraciones más altas, se consigue una mayor producción de formazán (Figura 9).

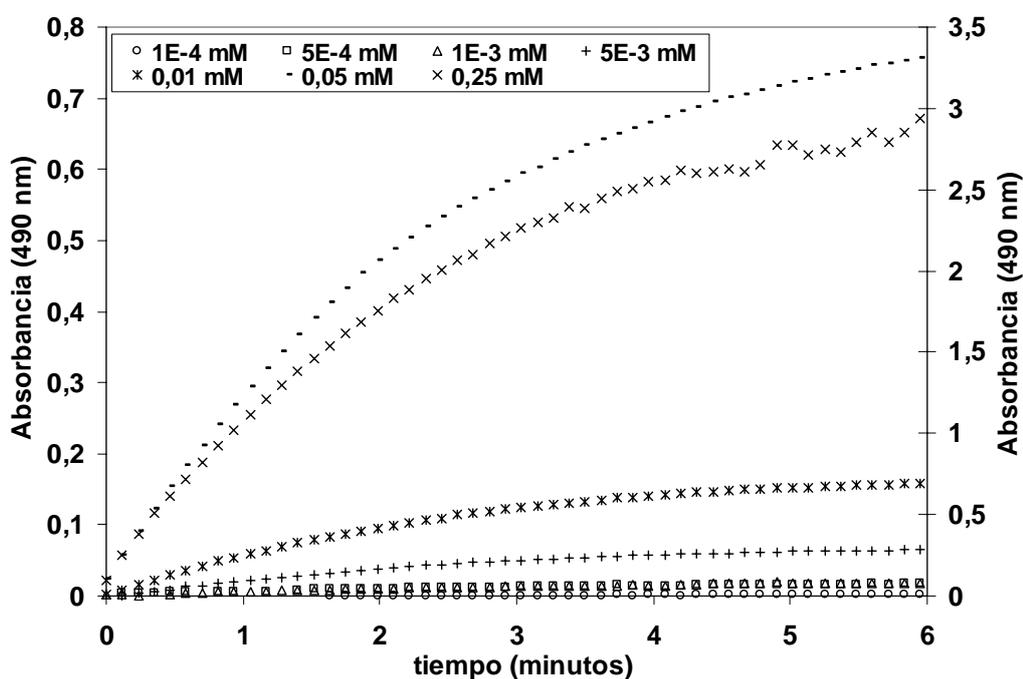


Figura 9. Producción de formazán en el tiempo, por la presencia de ácido ascórbico en concentraciones entre 0.0001 y 0.05mM (eje primario). El eje secundario corresponde a la medición de absorbancia de 0,25mM. Se muestran los seis primeros minutos, después de este tiempo no hay más reacción.

Esta alta velocidad de reacción es de esperar, ya que el AA esta involucrado en muchas reacciones de oxido-reducción. Este resultado se ve soportado por el estudio realizado por May (1999), en el cual el ascorbato (forma oxidada del AA), cataliza una sal similar (nitroazul de tetrazolio) a una velocidad dos veces mayor que con el NADH.

Con el glutatión y la cisteína, se observa una innegable producción de formazán. La diferencia con el AA, es que la reacción no es tan agresiva, inclusive, al término del tiempo establecido para la reacción (20 minutos), no se presento un descenso en la velocidad de reducción del INT (Figura 10, 11).

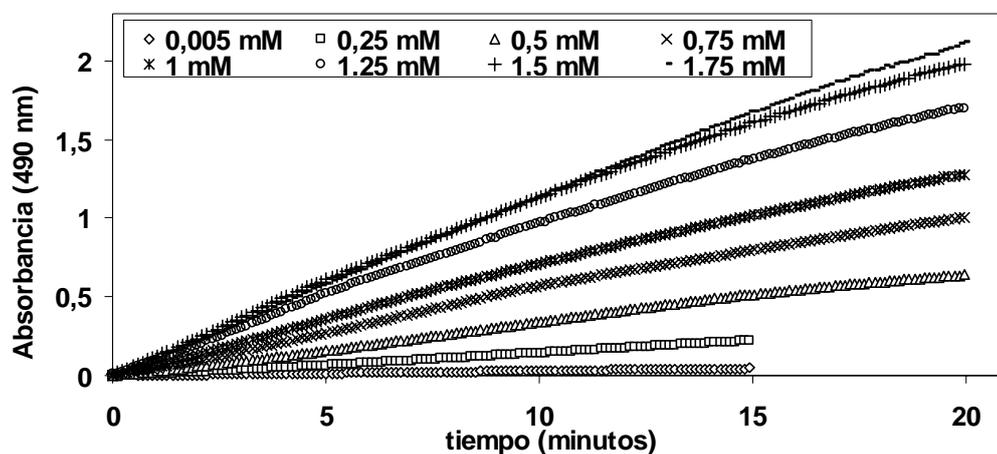


Figura 10. Reducción de INT en el tiempo, en presencia de cisteína. Se muestra la totalidad del tiempo establecido para la reacción. No se puede completar el registro para las concentraciones: 0.005 y 0.25 mM.

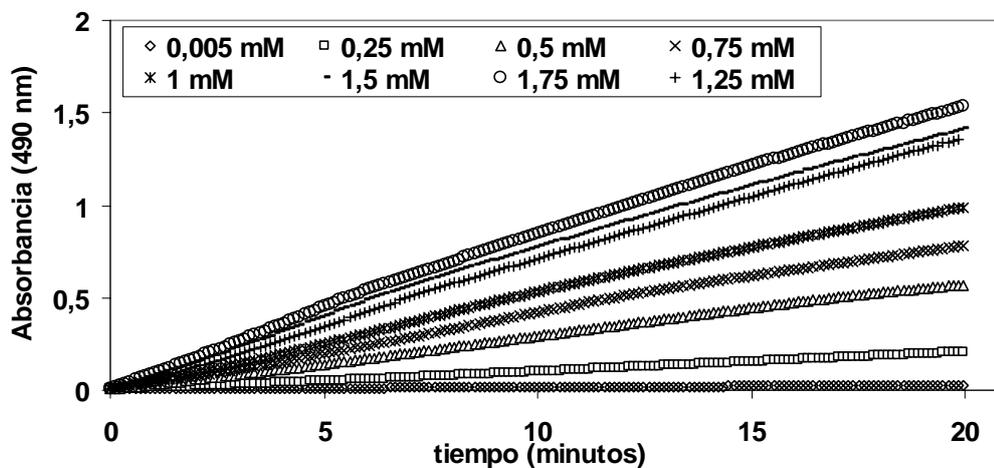


Figura 11. Producción de formazán en el tiempo, en presencia de glutatión. Se muestra la totalidad del tiempo establecido para la reacción.

Debido a que no se puede trabajar con VB₁₂, a las concentraciones de los demás experimentos, no se puede determinar la reducción del INT a estos niveles. Al realizar la extrapolación de los valores máximos de reducción del INT (Figura 12), a las concentraciones máximas de los otros experimentos (e.g. 0.25mM), encontraremos que la reducción de INT para VB₁₂ es la misma que para AA. Por ende la VB₁₂ tiene la misma capacidad de reducir el INT que el AA.

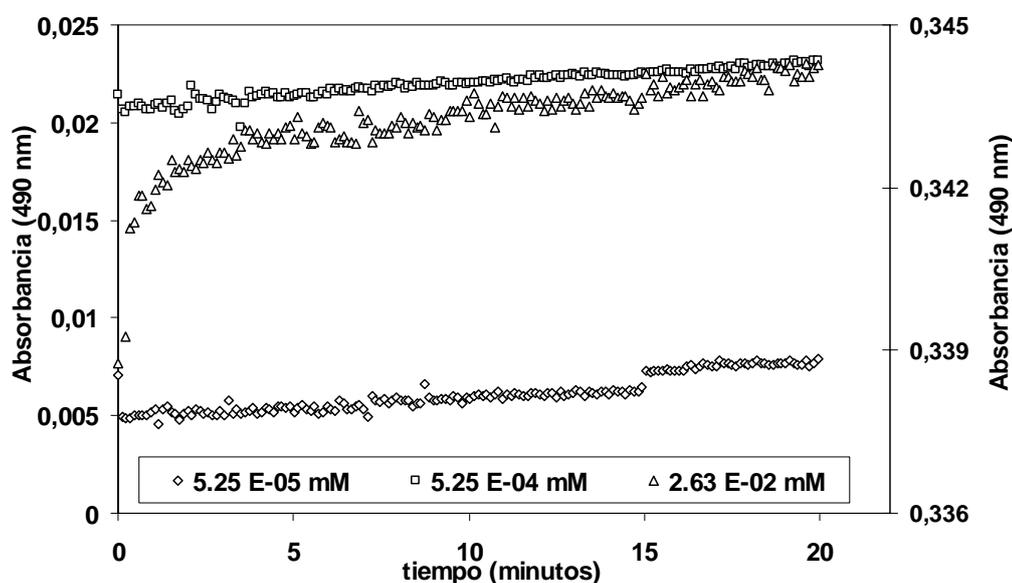


Figura 12. Reacción entre la VB₁₂ y el INT en el tiempo. La absorción de la máxima concentración, corresponden con el eje secundario.

Al comparar las pendientes de cada concentración en las sustancias capaces de reducir el INT, se observa, que hay una relación directa entre la concentración de la sustancias y la producción de formazán (Tabla 7, 8), siendo cada sustancia la marca la diferencia en la velocidad de de reacción, ya que a modo de ejemplo, en las concentraciones de AA presentan valores mayores de reducción que las a sustancias presenta velocidades mayores (Tabla 7).

Tabla 7. Tasas de producción de formazán (r^2) en 20 minutos de reacción, en presencia de diferentes elementos y concentraciones.

Concentración (mM)	Cisteína	Glutación
0.005	0.0032 (0.999)	0.0011 (0.995)
0.25	0.0153 (0.998)	0.0103(0.999)
0.5	0.034 (0.997)	0.0295 (0.999)
0.75	0.0518 (0.995)	0.0405 (0.997)
1.0	0.0653 (0.996)	0.0509 (0.998)
1.25	0.0862 (0.995)	0.0604 (0.999)
1.5	0.1002 (0.995)	0.0708 (0.997)
1.75	0.1081 (0.998)	0.0768 (0.997)

Tabla 8. Tasas de producción de formazán (r^2), en los dos primeros minutos por la acción del ácido ascórbico.

Concentración (μ M)	Ácido ascórbico
0.1	0.0012 (0.687)
0.5	0.0035 (0.958)
1	0.005 (0.979)
5	0.02 (0.99)
10	0,0462 (0.992)
50	0.2219 (0.992)
250	0.8047 (0.991)

Estas sustancias demuestran que el receptor artificial INT, puede reaccionar con algunas sustancias presentes en las diferentes células, lo que da sustento inequívoco que la adición de sustratos específicos al sistema de transporte de electrones es ineludible, para la determinación de las tasas de consumo de oxígeno.

De los seis compuestos probados, la glucosa (Figura 13) y el fenol (Figura 14), presentaron pendientes leves, que puede estar indicando algún tipo de reacción de estas sustancias con el INT. Aunque la tendencia es tener un pequeño aumento en el tiempo, las señales son tan bajas y al no presentan ninguna coherencia con respecto a la concentración que no se les puede deducir que estas tengan alguna incidencia en la producción de formazán en un homogenizado.

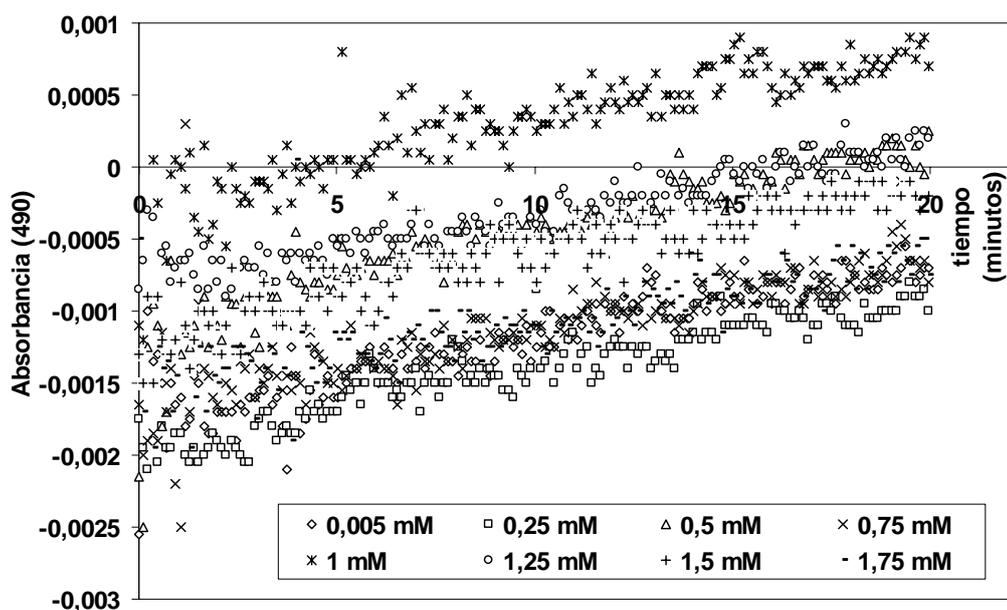


Figura 13. Relación en el tiempo entre la glucosa y el INT, donde existe una reacción débil. Nótese que las absorbancia es tres ordenes de magnitud, menor que en el AA (Figura 9).

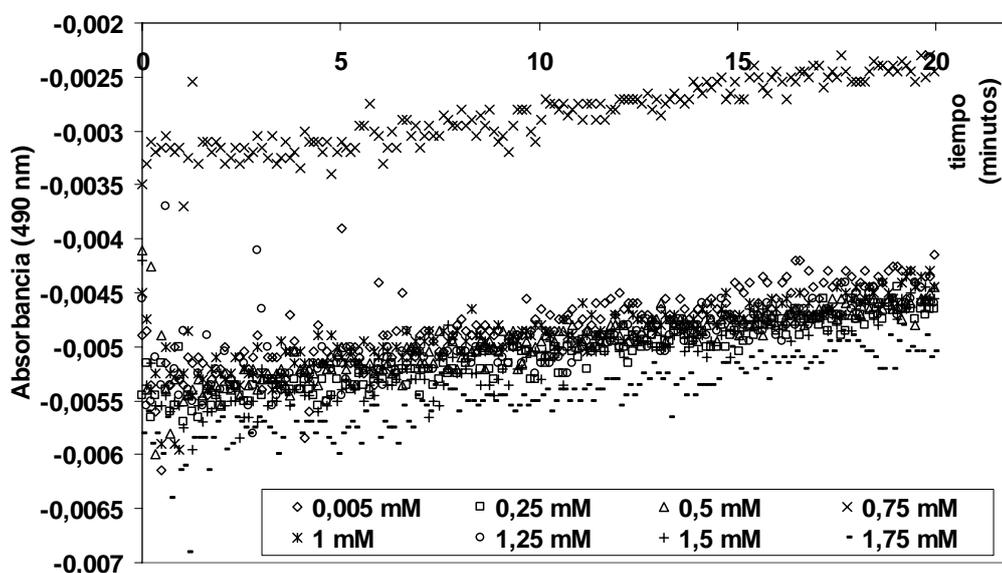


Figura 14. Relación en el tiempo entre el fenol y el INT, donde existe una reacción débil. Nótese que las absorbancia es tres ordenes de magnitud, menor que en el AA (Figura 9).

CONCLUSIONES

1. Tres de las seis sustancias intracelulares a probar (glutación, cisteína y ácido ascórbico), generaron una reducción del INT, en proporción directa a sus concentraciones.
2. La VB₁₂, potencialmente tiene la misma capacidad de reducción del INT, que el AA.
3. Existen diferencias de un orden de magnitud en la señal de reducción de INT, entre condiciones saturadas de sustratos (Owens & King, 1975) y las observadas con la no adición de estos (Båmstedt, 2000).
4. La no saturación de sustratos en el método planteado por Båmstedt (2000), induce a resultados correspondientes a la reducción del INT con sustancias ajenas y propias del ETS, debido a que no se favorece la especificidad enzima-sustrato del sistema de transporte de electrones.
5. Si se desea obtener resultados concernientes a las tasa de transporte de electrones, es necesario saturar este sistema con sustratos específicos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sentidos agradecimientos a Ted Packard, por sus inagotables aportes y paciencia. A May, por su tiempo y apoyo. A mi equipo de trabajo Alicia Herrera, Manuela Aristizbal e Ico Martínez por ser parte de la secta ETS. A Cynthia Voß, por su apoyo en el trabajo. A todos los miembros del B-201 (M.E.C; V.A.M; M.B.G; M.L.N.A; G.F.R; C.S.L; M.M.G; I.H.R; J.A), por aguantarme tanto tiempo.

Y sobre todo a Dios y mis Padres...

Este proyecto ha sido financiado con el proyecto EXOME
CTM2008-01616/MAR

BIBLIOGRAFÍA

- ABOU-SLEIMAN, P.M., MUQIT, M. & WOOD, N.W. 2006. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 7: 207-219
- AHNER, B.; WEI, L.; OLESON, J. & OGURA, N. 2002. Glutathione and Other Low Molecular Weight Thiols in Marine Phytoplankton Under Metal Stress. *Marine Ecology Progress Series*. 232: 93-103.
- ARÍSTEGUI, J. & MONTERO, M. 1995. The Relationship Between Community Respiration and ETS Activity in the Ocean. *Journal of Plankton Research*. 17: 1563-1571.
- ARÍSTEGUI, J. & M.F. MONTERO. 2005. Temporal and Spatial Changes in Microplankton Respiration and Biomass in the Canary Islands: the Effect of Vesoscale Variability. *Journal of Marine Systems*. 54: 65-82.
- BÅMSTEDT, U. 1980. ETS Activity as an Estimator of Respiratory Rate of Zooplankton Populations, the Significance of Variations in Environmental Factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 42 (2): 267-283.
- BÅMSTEDT, U. 2000. A New Method to Estimate Respiration Rate of Biological Material Based on the Reduction of Tetrazolium Violet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 251: 239-263.
- BIDLE, K. & FALKOWSKI, P. 2004. Cell Death in Planktonic, Photosynthetic Microorganisms. *Nature Reviews*. 2: 643-566.
- BROWN, J.H.; GILLOOLY, J.F.; ALLEN, A.P.; SAVAGE, V.M. & WEST, G.B. 2004. Toward a Metabolic Theory of Ecology. *Ecology*. 85 (7): 1771-1789.
- BROWN, M. & MILLER, K. 1992. The Ascorbic Acid Content of Eleven Species of Microalgae Used in Mariculture. *Journal of Applied Phycology*. 4 (3): 205-215.
- CAMMEN, L.; CORWIN, S. & CHRISTENSEN, J. 1990. Electron Transport System (ETS) Activity as a Measure of Benthic Macrofaunal Metabolism. *Marine Ecology Progress Series*. 65: 171-182.
- CHOI, J.; SHERR, B. & SHERR, E. 1999. Dead or Alive? A Large Fraction of ETS-inactive Marine Bacterioplankton Cells, as Assessed by Reduction of CTC, can Become ETS-active with Incubation and Substrate Addition. *Aquatic Microbial Ecology*. 18: 105-115.
- CHRISTENSEN, J.P. & PACKARD, T.T. 1977. Sediment Metabolism from the Northwest African Upwelling System. *Deep Sea Research*. 24: 331-343.
- CHRISTENSEN, J.P. & PACKARD, T.T. 1979. Respiratory Electron Transport Activities in Phytoplankton and Bacteria: comparison of methods. *Limnology and Oceanography*. 24: 576-583.
- COPPELLOTTI, O. 1989. Glutathione, Cysteine and Acid-soluble Thiol Levels in *Euglena gracilis* Cells Exposed to Copper and Cadmium. *Compositions in Biochemistry Physiology*. 94: 35-40.
- CROFT, M.; LAWRENCE, A.; RAUX-DEERY, E.; WARREN, M. & SMITH, A. 2005. Algae Acquire Vitamin B₁₂ Through a Symbiotic Relationship with Bacteria. *Nature*. 438: 90-93.
- CURL, H.C, Jr & SANDBERG, J. 1961. The Measurement of Dehydrogenase Activity in Marine Organisms. *Journal of Marine Research*. 19: 123-138.

DAISLEY, K. 1958. A Method for the Measurement of Vitamin B₁₂ Concentration in Sea Water. *Journal of the Marine Biological*. 37: 673-681.

DE ROECK-HOLTZHAUER, Y.; QUERE, I. & CLAIRE, C. 1991. Vitamin Analysis of Five Planktonic Microalgae and One Macroalga. *Journal of Applied Phycology*. 3 (3): 259-264.

DEVOL, A.H. 1975. Biological Oxidation in Oxic and Anoxic Marine Environments: rates and processes. Ph.D. Thesis, University of Washington, Seattle. 208p.

DIXON, M & WEBB, E.C.. 1979. *Enzymes*. Longman Group Limited. London. p: 231-271.

DUPONT, C.; GOEPFERT, T.; LO, P.; WEI, L. & AHNER, B. 2004. Diurnal Cycling of Glutathione in Marine Phytoplankton: field and culture studies. *Limnology and Oceanography*. 49: 991-996.

ELLENBOGEN, L. & COOPER, B.A. 1991. Vitamin B₁₂. *En: Hand Book of Vitamins* Machlin, L.J. (ed.). Marcel Dekker, Inc. E.E.U.U. pp: 196-224.

GÓMEZ, M.; TORRES, S. & HERNÁNDEZ-LEÓN, S. 1996. Modification of the Electron Transport System (ETS) Method for Routine Measurements of Respiratory Rates of Zooplankton. *South African Journal of Marine Science*. 17: 15-20.

GUILLARD, R. & CASSIE, V. 1963. Minimum Cyanocobalamin Requirements of some Marine Centric Diatoms. *Limnology and Oceanography*. 8(2): 161-165.

HASEGAWA, T.; FUKUDA, H. & KOIKE, I. 2005. Effects of Glutamate and Glucose on N Cycling and the Marine Plankton Community *Aquatic Microbial Ecology*. 41(2): 125-130.

HERNÁNDEZ-LEÓN, S. 1988. Gradients of Mesozooplankton Biomass and ETS Activity in the Wind-shear Area as Evidence of an Island Mass Effect in the Canary Island Waters. *Journal of Plankton Research*. 10: 1141-1154.

HERNÁNDEZ-LEÓN, S. & GÓMEZ, M. 1996. Factors Affecting the Respiration/ETS Ratio in Marine Zooplankton. *Journal of Plankton Research*. 18: 239-255.

HOBBIE, J.; HOLM-HANSEN, O.; PACKARD, T. T.; POMEROY, L.; SHELDON, R.; THOMAS, J. & WIEBE, W. 1972. A study of the Distribution and Activity of Microorganisms in Ocean Water. *Limnology and Oceanography*. 17: 544-555.

ITTEKKOT, V.; BROCKMANN, U.; MICHAELIS, W. & DEGENS, E. 1981. Dissolved Free and Combined Carbohydrates During a Phytoplankton Bloom in the Northern North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 4: 299-305.

KAWAKAMI, S.; GLEDHILL, M. & ACHTERBERG, E. 2006. Production of Phytochelatins and Glutathione by Marine Phytoplankton in Response to Metal Stress. *Journal of Phycology*. 42: 975-989.

KENNER, R. & AHMED, S. 1975a. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Marine Biology*. 33: 119-127.

KENNER, R. & AHMED, S. 1975b. Correlation Between Oxygen Utilization and Electron Transport Activity in Marine Phytoplankton. *Marine Biology*. 33: 129-133.

KOSAKOWSKA, A.; FALKOWSKI, L. & LEWANDOWSKA, J. 1988. Effect of Amino Acids on the Toxicity of Heavy Metals to Phytoplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 40: 532-538.

KURATA, A. 1986. Blooms of *Uroglena americana* in Relation to Concentrations of B Group Vitamins. En: Chrysophytes: aspects and problems. J. Kristiansen and R. A. Andersen (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. p: 185-196.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein Measurement With a Folin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

MAY, J.M. 1999. Is Ascorbic Acid an Antioxidant for the Plasma Membrane. *The FASEB Journal*. 13: 995-1006.

MENZEL, D. & SPAETH, J. 1962. Occurrence of Vitamin B₁₂ in the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography*, 7: 151-154.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; DHERT, P.; DEHASQUE, M.; NELIS, H.; DE LEENHEER, A. & SORGELOOS, P. 1995. Variation of Ascorbic Acid Content in Different Live Food Organisms. *Aquaculture*. 134 (3-4): 325-337.

MINUTOLI, R. & GUGLIELMO, L. 2009. Zooplankton respiratory Electron Transport System (ETS) Activity in the Mediterranean Sea: spatial and diel variability. *Marine Ecology Progress Series*. 381: 199-211.

NELSON, D.L. & COX, M.M. 2006. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1119p.

NEWTON, G.L.; ARNOLD, K., PRICE, M.S.; SHERRILL, C., DELCARDAYRE, S.B.; AHARONOWITZ, Y.; COHEN, G.; DAVIES, J.; FAHEY, R.C. & DAVIS, C. 1996. Distribution of Thiols in Microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. 178(7): 1990-1995.

OHWADA, K.; OTSUHATA, M. & TAGA, N. 1972. Seasonal Cycles of Vitamin B₁₂, Thiamine, and Biotin in the Surface Water of Lake Tsukui. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fishery*. 38: 817-823.

OWENS, T. & KING, F. 1975. The Measurement of Respiratory Electron Transport System Activity in Marine Zooplankton. *Marine Biology*. 30: 27-36.

PACKARD, T.T. 1969. The Estimation of the Oxygen Utilization Rate in Seawater from the Activity of the Respiratory Electron Transport System in Plankton. Ph.D. Thesis, University of Washington, Seattle. 115p.

PACKARD, T.T. 1971. The Measurement of Respiratory Electron Transport Activity in Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Research*. 29: 235-244.

PACKARD, T.T. 1985a. Measurement of Electron Transport Activity of Microplankton. *Advances in Aquatic Microbiology*. 3: 207-261.

PACKARD, T.T. 1985b. Oxygen consumption in the ocean: measuring and mapping with enzyme analysis. En: Mapping Strategies in Chemical Oceanography. American Chemical Society. Zirino, A. (ed.). pp: 177-209.

PACKARD, T.; BERDALET, E.; BLASCO, D.; ROY, S.; ST-AMAND, L.; LAGACÉ, B.; LEE, K. & GAGNO, J. 1996. Oxygen Consumption in the Marine Bacterium *Pseudomonas nautica* Predicted from ETS Activity and Bisubstrate Enzyme Kinetics. *Journal of Plankton Research*. 18: 1819-1835.

PACKARD, T. & GÓMEZ, M. 2008. Exploring a First Principles Based Model for Zooplankton Respiration. *ICES Journal of Marine Science*. 65: 371-378

PACKARD, T.T., & TAYLOR, P.B. 1968. The Relationship between Succinate Dehydrogenase Activity and Oxygen Consumption in the Brine Shrimp, *Artemia salina*. *Limnology and Oceanography*. 13: 552-555.

PACKARD, T.T. & WILLIAMS, P.J. LeB. 1981. Rates of Respiratory Oxygen Consumption and Electron Transport in Surface Waters from the Northwest Atlantic Ocean. *Oceanologica Acta*. 4(3):351-358.

PEARRE, S Jr. 1964. Metabolic Activity as an Indicator of Zooplankton Abundance. M.S. Thesis, Dalhousie University, Halifax. 98 pp.

MATRAI, P. & VETTER, R. 1988. Particulate Thiols in Coastal Waters: the effect of light and nutrients on their planktonic production. *Limnology and Oceanography*. 33(4): 624-631.

RAUSER, W. 1995. Phytochelatins and Related Peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology*. 109 (4): 1141-1149.

RELEXANS, J. 1996. Measurement of the Respiratory Electron Transport System (ETS) Activity in Marine Sediments: state of the art and interpretation. I. Methodology and review of literature data. *Marine Ecology Progress Series*. 136: 277-287.

RIJSTENBIL, J. & WIJNHOLDS, J. 1996. HPLC Analysis of Nonprotein Thiols in Planktonic Diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. *Marine Biology*. 127: 45-54.

RUTTER, W. 1967. Protein Determination in Embryos. En: *Methods in Developmental Biology*. Wilt, F.H. & Wessel, N.V. (eds.). Academic Press. London. pp: 671-684.

SAMEOTO, D; WIEBE, P; RUNGE, J; POSTEL; DUNN, J; MILLER, C. & COOMBS, S. 2000. Collecting Zooplankton. En: *Zooplankton Methodology Manual*. Harris, R.P; Wiebe, P; Lenz, J; Skjoldal, H.R. & Huntley, M (eds.). Elsevier. pp: 55-81.

SAVENKOFF, C; PACKARD, T.T; RODIER, M; GÉRINNO, M; LEFÈVRE, D & DENIS, M. 1995. Relative Contribution of Dehydrogenases to Overall Respiratory ETh activity in some Marine Organisms. *Journal of Plankton Research*. 17(8): 1593-1604.

SATOH, M.; HIRACHI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOBAYASHI, M. & OYAMA, Y. 2002. Determination of Cellular Levels of Nonprotein Thiols in Phytoplankton and Their Correlations with Susceptibility to Mercury. *Journal of Phycology*. 38: 983-990.

SIMCIC, T. & BRANCELJ, A. 2004. Respiratory Electron Transport System (ETS) Activity as an Estimator of the Thermal Tolerance of Two *Daphnia* Hybrids. *Journal of Plankton Research*. 26: 525-534.

STEFFENS, J. 1990. The Heavy Metal-binding Peptides of Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 41: 553-575.

WANG, L.; YAN, B.; LIU, N.; LI, Y. & WANG, Q. 2008. Effects of Cadmium on Glutathione Synthesis in Hepatopancreas of Freshwater Crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*. 74: 51-56.

WATANABE, M. & SUZUKI, T. 2001. Cadmium Induced Abnormality in Strains of *Euglena gracilis*: morphological alteration and its prevention by Zinc and Cyanocobalamine. 130: 29-39 .

WENQUAN, L.; XIAN, W. & YAOHUA, Z. 1993. Study on Kinetics of Glucose Uptake by Some Species of Plankton. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 11: 8-15