



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO: OCEANOGRAFÍA
(BIENIO 2005-2007)

***RELACIONES ENTRE BIOMASA, TASA DE
CRECIMIENTO, RESPIRACIÓN Y RESPIRACIÓN
POTENCIAL EN EL CRUSTÁCEO *Artemia salina****

Memoria de Investigación

Presentada por **Dña. Ico Martínez Sánchez**

Dirigida por la **Dra. Doña May Gómez Cabrera** y el **Dr. D. Theodore T. Packard**

20 Diciembre 2007

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES.....	24

RESUMEN

El metabolismo respiratorio y la biomasa del zooplancton son parámetros clave para el entendimiento del flujo de energía, abundancia de la población, estructura de la comunidad, así como otras variables de comunidades planctónicas marinas. La actividad respiratoria del transporte de electrones del zooplancton (ETS) mide la respiración potencial (Φ) y es una aproximación para el consumo de oxígeno en la respiración y la biomasa. No existe un buen entendimiento sobre la interpretación de las medidas de la respiración potencial y por ello se requiere su calibración experimental con el fin de encontrar los métodos y relaciones más adecuados, además de determinar los efectos que puedan tener las condiciones ambientales, el estado fisiológico y la edad en dichos parámetros. En este trabajo, utilizando cultivos controlados del crustáceo *Artemia salina*, investigamos las relaciones entre la biomasa, la respiración potencial, respiración y tasa de crecimiento.

Se encontró una relación significativa entre la respiración y la respiración potencial, así como entre la respiración potencial y la biomasa. Los valores observados de los parámetros de estudio se encontraron en el rango observado en la literatura por otros autores para experimentos en condiciones similares.

Palabras clave: *Artemia salina*, respiración, respiración potencial, actividad ETS, biomasa, tasa de crecimiento

INTRODUCCIÓN

Las variaciones espaciales y temporales, y la dinámica de los sistemas ecológicos son en gran parte consecuencia del metabolismo biológico. Dondequiera que ocurra, los organismos pueden transformar la energía para desarrollar sus propias actividades, convertir la materia en formas orgánicas y así crear un distintivo biológico, químico y físico. Por tanto, el metabolismo determina las demandas de los organismos, en el medio en el que se encuentran para todos los recursos y simultáneamente establece una intensa restricción sobre la distribución de estos. Las tasas de estos procesos (tasas metabólicas), establecen el ritmo de la vida de los organismos pues determinan las tasas de la mayoría de las actividades biológicas.

El metabolismo es únicamente un proceso biológico, pero obedece a los principios químicos y físicos que gobiernan las transformaciones de energía en materia. La mayor parte de la variación existente entre ecosistemas, incluyendo sus estructuras biológicas, composiciones químicas, flujos de energía y materia, etc... depende de las características metabólicas de los organismos que están presentes y las variaciones entre estos organismos, incluyendo su característico ciclo vital y el papel ecológico, están restringidas por su tamaño, temperatura y la composición química.

Por otro lado, el metabolismo es una red compleja de reacciones bioquímicas que están catalizadas por enzimas permitiendo regular las concentraciones de sustratos y productos y las tasas de las reacciones.

La mayoría de los organismos utilizan la misma bioquímica básica, pero las tasas de captación de recursos, transformación y distribución varían. Parte de la energía que captan los organismos y son capaces de transformar, se convierte en parte por la reacción de respiración en formas biológicamente útiles que se utilizan para desempeñar el trabajo de biosíntesis y transporte de membranas entre otros.

La tasa metabólica es la tasa biológica fundamental ya que determina la captación de energía, transformación y distribución. En base a esto, podemos decir que la respiración es un índice importante de la actividad fisiológica de una comunidad, ya que para organismos heterótrofos si hablamos de tasa metabólica es igual que hablar de tasa de respiración ya que estos adquieren energía oxidando compuestos de carbono como muestra la reacción



De esta manera, resulta muy acertado y práctico medir la tasa de consumo de oxígeno. El ensayo de estas tasas de respiración en zooplancton nos proporcionarán los requerimientos energéticos mínimos. Hay que tener en cuenta que los estudios oceanográficos necesitan de estudios previos realizados en el laboratorio para la calibración de los parámetros. En base a ello, el consumo de oxígeno ha sido estudiado en numerosas ocasiones (Ikeda et al. 2001, 2004 ; Varó et al. 1993, 2000; Irwin et al. 2007). Sin embargo, sus medidas son tediosas, de una intensa labor y consumen mucho tiempo. Como resultado, es bastante complicado obtener valores de respiración en la misma magnitud de adquisición de datos que para otras tasas de otros parámetros oceanográficos modernos. Por esta razón, Packard (1969) propone el uso de las actividades enzimáticas en las células como índice de respiración. Con estas aproximaciones además se pueden evitar los posibles problemas de estrés, inanición o crecimiento bacteriano que están asociados con las medidas de respiración basadas en incubaciones.

En este caso, como medida potencial de la respiración se ha tomado la actividad de las enzimas que actúan en el sistema de transporte de electrones (ETS), una medida bioquímica de la actividad potencial metabólica. La organización del ETS se puede describir como un sistema multienzimático compuesto por cuatro complejos

enzimáticos que se encuentran en la membrana interna mitocondrial. Estos cuatro complejos se disponen en un sistema redox bioquímico completo para el transporte de electrones a partir de las coenzimas NADH, NADPH y succinato, provenientes del ciclo de Krebs hacia el aceptor final de electrones, el oxígeno.

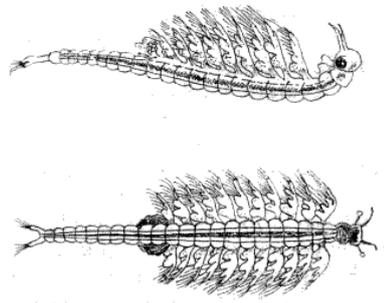
Este método ha sido mejorado progresivamente a lo largo de los años desde su creación. Preliminarmente Curl y Sandberg (1961) estudiaron la actividad enzimática debida a la succinato deshidrogenasa (SDH) utilizando el INT (sal de tetrazolium 2- (4-iodofenil) - 3 - (4 - nitrofenil) - 5 - cloruro de feniltetrazolium). Sin embargo fue Packard (1969), quien utilizando esta idea, extiende el método e incorpora al medio los sustratos NADH, NADPH y comienza a medir la actividad completa del sistema de transporte de electrones (ETS), con la idea de que puede ser un mejor índice para la respiración que midiendo únicamente la SDH.

El método ETS original se diseñó para medir la tasa de consumo de oxígeno en el agua de mar, causada por la suma de la respiración de las bacterias marinas, protozoos, zooplancton y fitoplancton en un rango de talla de 0.1 a 200 μm . La primera vez que este método se aplicó para zooplancton fue en 1967 (Packard, comunicación personal), con el conocimiento de que la actividad de la succinato deshidrogenasa y de la NADH deshidrogenasa pueden medir el consumo potencial de oxígeno del ETS respiratorio y la actividad de la NADPH deshidrogenasa puede medir el consumo de oxígeno del ETS microsomal. Más adelante, Packard (1969) y Packard et al. (1971) aplica esta metodología en Oceanografía por primera vez. Owens y King (1975) emplearon Triton X-100 que facilita la solubilidad de las enzimas y favorece la reducción del INT. Por otro lado, Kenner y Ahmed (1975) y Packard y Williams (1981) realizaron ensayos sobre el tiempo óptimo necesario para la reducción del INT y su determinación espectrofotométrica y Gómez et al. (1996) realizaron algunas modificaciones del método en relación al proceso de análisis y tratamiento de las muestras. El método ETS ha sido ampliamente estudiado en Oceanografía, siendo aplicado a diferentes tipos de organismos y comunidades (Finlay et al. 1983; Kenner y Ahmed 1975; Packard et al. 1981; Packard et al. 1974; King y Packard 1975; Alcaraz y Packard 1989; Hernández-León 1988; Hernández-León y Gómez 1996; Arístegui y Montero 1995; Ramírez et al. 2005 entre otros).

El ETS es un método cuantitativo, pero mide el transporte de electrones y no la respiración. La actividad del transporte de electrones es el potencial respiratorio. Para medir la respiración desde las mediciones de la actividad ETS se requiere la calibración mediante incubaciones experimentales en laboratorio y determinar los efectos de la edad de los organismos, su estado fisiológico, temperatura, etc... así como su relación con los índices bioquímicos (Arístegui y Montero, 1995; Owens y King, 1975) o se requiere del uso de un modelo cinético como en Packard et al. (1996).

Por otro lado, el estudio del crecimiento de organismos zooplanctónicos es indispensable en el conocimiento de la producción y de los flujos biogeoquímicos. La estimación del crecimiento es necesaria para observar la respuesta del zooplancton a cambios producidos en el medio o para desarrollar modelos de acoplamiento entre parámetros físicos y biológicos. Tanto la biomasa como la tasa de crecimiento han sido medidas por numerosos métodos. Una de las técnicas ampliamente utilizadas es la medida del peso corporal de los organismos, utilizándose más comúnmente el peso seco (Lovegrove, 1966). La variabilidad de la biomasa del zooplancton en el océano ha sido discutida por Huntley y López (1992) que enfatizaron el papel de nuevas tecnologías en resolver la forma de muestreo para estimar producciones. Por otro lado, las tasas de crecimiento son estimadas por la medida del cambio en el peso corporal con el tiempo, utilizando el método de la cohorte artificial (Kimmerer y McKinnon, 1987).

En este trabajo investigamos las relaciones entre la biomasa (como proteínas o como carbono), respiración potencial, respiración y tasa de crecimiento y su sensibilidad a la edad del cultivo. Todo ello desarrollado en cultivos controlados de *Artemia salina*, un organismo modelo en estudios de ecología y fisiología que también ha sido explotado como fuente comercial. *Artemia salina* presenta una alta adaptación fisiológica que le permite la supervivencia en un amplio rango tanto de salinidad (35-170‰) como de temperatura (6-40°C) y es la presa viva más adecuada para la alimentación de los estados postlarvarios de muchas especies de peces y crustáceos marinos.



Artemia salina

MATERIAL Y MÉTODOS

Los parámetros peso seco individual, contenido proteico, tasa de respiración y actividad de las enzimas del Sistema de Transporte de Electrones (respiración potencial, Φ) de *Artemia salina* se determinaron mediante dos experiencias diferentes (experimento 1 y experimento 2), manteniendo un cultivo de estos organismos en condiciones controladas de temperatura y alimentación (Tabla 1). Cada uno de estos dos experimentos consistió a su vez en otras dos experiencias independientes con estudios de todos estos parámetros sobre el cultivo de *Artemia salina*, obteniendo triplicados para cada muestra.

	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	
Periodo de incubación (días)	15	30	
Tª incubación (°C)	25	22	
Alimento suministrado	<i>Nanoclorosis sp.</i> (5000 céls·ind ⁻¹)	<i>Dunaliella salina</i> (1000 céls·ind ⁻¹)	
Biomasa ($\mu\text{gC} / \text{ind}$)	2,06 ± 4,64 (0,51 - 20,04)	3,73 ± 5,83 (0,57 - 20,59)	
Biomasa ($\mu\text{g prot/ind}$)	2,49 ± 7,04 (0,15 - 29,76)	4,79 ± 8,6 (0,05 - 34,24)	
Tasa crecimiento (d ⁻¹)	0,28 ± 0,42 (-0,52 - 1,16)	0,26 ± 0,56 (-0,93 - 1,6)	0,33 ± 0,72 ** (-1,20 - 2,07)
Tasa de respiración ($\mu\text{IO}_2\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,17 ± 0,15 (0,08 - 0,75)	0,04 ± 0,06 (0,03 - 0,19)	0,05 ± 0,075 ** (0,004 - 0,24)
Tasa de respiración potencial ($\mu\text{IO}_2\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,156 ± 0,057 (0,09 - 0,29)	0,055 ± 0,060 (0,017 - 0,19)	0,065 ± 0,075 ** (0,02 - 0,24)

** Datos corregidos mediante la ecuación de Arrhenius a 25°C

Tabla 1. Parámetros medidos en los experimentos

1. Cultivos y tratamiento antes de las medidas

Para llevar a cabo estas experiencias, se utilizaron quistes procedentes de Metaframe (San Francisco Bay Division Newark, California) proporcionados por el Instituto Canario de Ciencias Marinas, que se eclosionaron manteniéndolos en agua de mar filtrada a temperatura constante y en suspensión por aireación. En un periodo de aproximadamente 24 horas, se recogieron los nauplios eclosionados mediante decantación de los huevos sobrantes y por sifonamiento, colocándolos posteriormente en acuarios con agua de mar filtrada a temperatura controlada de 25 y 22°C. Los organismos se mantuvieron a una densidad de 10000 y 20000 nauplios por litro. El agua se renovó constantemente y se les suministraba como alimento *Nanoclorosis sp.* y *Dunaliella salina* a razón de 5000 y 1000 céls·ind⁻¹ respectivamente.

Para la toma de muestras se recogía un determinado número de organismos que eran filtrados a través de una malla de 100 μm . Estos organismos recolectados se procesaron de distinta manera en función de su posterior aplicación. Las recogidas para la determinación del peso seco eran congeladas inmediatamente a -20°C. En el caso de la respiración, se recogían submuestras para su incubación y posterior medidas de la respiración en continuo o como punto final. Posteriormente las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido (-196 °C) y conservadas a -80°C hasta su posterior análisis de la actividad ETS y de la biomasa como proteínas.

2. Respiración potencial

La medida de la actividad de las enzimas de la cadena de transporte de electrones (ETS) se determinó según Gómez et al. (1996), con ligeras modificaciones entre los experimentos en el proceso de homogeneización y adición de reactivos.

Experimento 1:

Se homogeneizó la muestra en teflón-cristal a 1500 rpm con 3 ml de tampón de homogeneizado, durante 2 minutos en un baño de hielo. El tampón de homogeneizado contenía 75 μ M MgSO₄, 0.2% (v/v) de Tritón X-100, 0.15% (p/v) de PVP (polyvinyl pyrrolidone), 50 mM de tampón fosfato sódico pH 8.0 y 2 mM de NaCN en agua bidestilada Milli-Q.

Experimento 2:

Las muestras se homogeneizaron, en un volumen conocido de agua bidestilada Milli-Q, durante 45 segundos con un sonicador (Ultrasonic Processor; Cole Parmer).

Después de la posterior centrifugación (0°C, 10min, 4000 rpm), se tomó una alícuota del sobrenadante de entre 50 y 500 μ l en función de la biomasa que presentaba la muestra, que se diluyó en agua Milli-Q. De esta dilución, se toma una alícuota que se introduce en el medio que contiene los sustratos (solución sustrato conteniendo 0.2% (v/v) de Tritón X-100, 50mM de tampón fosfato sódico pH 8.0, 0.133 M de succinato disódico, 0.835 mM de NADH y 0.24 mM de NADPH) añadiéndole una solución INT 4mM. Inmediatamente fue incubada en oscuridad a 18°C durante 20 minutos, tiempo tras el cual la reducción del INT se detuvo con una solución Quench formada por una parte de ácido fosfórico 0.1M y otra de formaldehído al 36%. De igual manera se realizó un ensayo blanco para cada muestra.

En el experimento 2 se introdujo un sistema automático de pretratamiento de muestras con inyección en línea (ASPEC- Gilson 221/222), el cual se encarga de llevar a cabo el ensayo añadiendo las muestras y los reactivos así como el ensayo blanco. En este caso las muestras permanecerán siempre tapadas para que la reacción tenga lugar en la oscuridad y en frío a 18°C.

Tras el periodo de reacción se procede a la lectura de la absorbancia a 490nm y 750nm como línea base para corregir la turbidez.

El cálculo de las actividades se realizó empleando la expresión:

$$ETS = 60 * H * AS * COD / (INT * T * L * F) \quad (\text{Ec. 1})$$

siendo H el volumen de homogeneizado (ml), AS el volumen de reacción de la muestra (ml), INT es el factor de estandarización del INT (1,42), T es el tiempo de incubación en minutos, L es el ancho de la cubeta del espectrofotómetro (1 cm), F es el volumen de homogeneizado que se introduce en el ensayo y COD es una expresión que relaciona las absorbancias obtenidas tanto para las muestras como para los blancos con los volúmenes de reacción de los mismos.

$$COD = [(AOD * AS) - (BOD * BS) - (FOD * FS)] / AS \quad (\text{Ec. 2})$$

3. Determinación de la biomasa

La determinación del peso seco individual se llevó a cabo según lo descrito por Lovegrove (1966); se realizaron 3 replicados de cada muestra del cultivo. Los organismos congelados previamente se transfirieron a unas minicápsulas de aluminio prepesadas y se mantuvieron en una estufa a 60°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo, se pesaron de nuevo las minicápsulas con la muestra en una microbalanza (Sartorius 4504 MPS) y con la diferencia entre las dos medidas se obtuvo el peso seco. Para obtener la biomasa en unidades de carbono, se asumió que la cantidad de carbono representa el 40% del peso seco del organismo, o lo que es lo mismo, asumiendo un factor de 0.4 (Omori e Ikeda 1984, Parsons et al. 1984, Båmstedt 1986).

La biomasa expresada como contenido en proteínas se determinó según el método de Lowry et al. (1951) modificado por Rutter (1967). Tras centrifugar las muestras (0°C, 10min, 4000 rpm), se tomó una alícuota de 100 µl del sobrenadante, a los cuales se les aplican diferentes diluciones. Una vez diluidos, se toma otra alícuota de 100 µl y se añaden 0.5 ml de reactivo Rutter (formado por una solución A que contiene 20g de Na₂CO₃ 0.90M, 4g de NaOH 0.45N, 0.2g tartatro de Na-K 2% en 1l de agua y una solución B que contiene 0.5g de CuSO₄ · 5H₂O en 100ml de agua), y tras 10 minutos se añaden 50 µl de reactivo Folin a temperatura ambiente. Previamente a este tratamiento, se requiere realizar una curva de calibrado con agua Milli-Q y Bovin Serum Albumin (BSA) como estándar (con valores comprendidos entre 5 y 500 µgproteínas · ml⁻¹).

Finalmente, se relacionaron ambas variables (peso seco y proteínas) y obtuvimos una buena relación entre ellas (Fig. 1), de forma que a partir de datos de proteínas pudimos obtener datos de peso seco en aquellos experimentos en los que no se midió directamente.

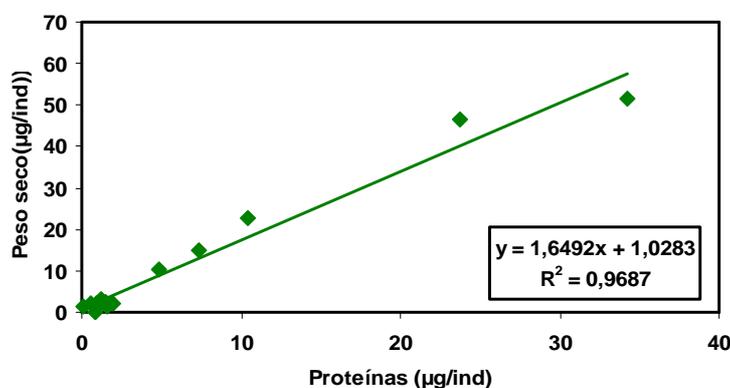


Fig. 1 Relación lineal entre las variables peso seco y proteínas. Ecuación obtenida $PS = 1.6492 \text{ proteínas} + 1.0283$ ($R^2 = 0.97$)

4. Tasa de crecimiento

Siguiendo lo establecido por Kimmerer y McKinnon (1987), se consideró que el crecimiento experimentado por los organismos se ajusta a una función de tipo exponencial (basado en la biomasa individual medida en contenido proteico):

$$B_t = B_0 \cdot e^{\mu t} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde B_t es la biomasa medida en el tiempo t , B_0 la biomasa en el tiempo cero, t es el tiempo transcurrido en días y μ es la tasa instantánea de crecimiento (d^{-1}). Si normalizamos la ecuación obtendremos que:

$$\ln B_t = \ln B_0 + \mu t \quad (\text{Ec. 3})$$

las transformadas logarítmicas de la biomasa siguen un incremento lineal con el tiempo, siendo la pendiente de esta recta (μ) la tasa instantánea de crecimiento. De esta forma, la expresión final que utilizamos para obtener la tasa de crecimiento es:

$$\mu = [(\ln prot_2 - \ln prot_1) / \Delta T] \quad (\text{Ec. 4})$$

5. Respiración

Experimento 1:

Las medidas de respiración se determinaron a partir de la concentración de oxígeno obtenida según la versión del método de Winkler descrita en Parsons et al. (1984), que consiste en llevar a cabo una valoración añadiendo a la muestra una solución de manganeso divalente seguido de una fuerte alcalinización. El oxígeno disuelto oxida rápidamente a una cantidad equivalente de manganeso. Cuando la reacción se acidifica en presencia de iones de yodo, el precipitado de hidróxido de manganeso se dispersa y la cantidad de iones yodo, equivalente a la cantidad original de oxígeno disuelto en agua, se libera. Este yodo liberado es valorado con una solución estandarizada de tiosulfato, utilizando almidón para facilitar la detección del punto final.

Para obtener una mayor sensibilidad en esta metodología, se utilizó la técnica recomendada por Bryan, Riley y Williams (1976) de forma que se valoró el contenido completo de las botellas para impedir la volatilización del yodo. Esta tecnología introduce la utilización de una microbureta digital con capacidad de dispensar 0.1 μ l de tiosulfato y un detector de punto final de valoración por fotometría, incrementando considerablemente la precisión del método.

Los organismos se mantuvieron en incubación durante un periodo entre 6 y 24 horas, en oscuridad y a temperatura controlada de 25°C y, a su vez, también se realizaron experimentos control conteniendo sólo agua de mar filtrada. El contenido de oxígeno se determinó sobre la muestra de agua resultante, después de separar los organismos para el resto de medidas. La diferencia de oxígeno entre los controles y los recipientes del experimento proporcionó los valores de respiración.

Experimento 2:

Las tasas de consumo de oxígeno se midieron a través de un oxímetro (Strathkelvin 928 6-Channels Oxygen System). Los organismos se recolectaron directamente de los acuarios y se colocaron en cámaras de incubación, con un volumen conocido y se mantuvieron a temperatura constante de 22°C y en oscuridad durante un periodo de aproximadamente una hora y media. Los organismos se incubaron con alimento por lo que se realizó un ensayo en blanco a base de agua del medio sin organismos para corregir los valores obtenidos de las tasas de respiración.

La concentración de oxígeno estuvo medida en continuo durante el periodo establecido por medio de electrodos.

6. Corrección de temperatura

La temperatura es uno de los factores que más modifican las tasas metabólicas. Desde el punto de vista termodinámico y en rasgos generales, cuanto más alta es la temperatura, más rápidamente ocurren las reacciones químicas y por tanto, más alta será la tasa característica de dicha reacción.

La relación entre la tasa de una reacción y su temperatura es determinada por la ecuación de Arrhenius (Ec. 5), una fórmula simple pero exacta.

$$k = A \cdot e^{(-E_a/RgT)} \quad \text{(Ec.5)}$$

donde k es la constante de velocidad (una tasa) y A el factor de frecuencia, E_a es la energía de activación (≈ 62.7 KJ/mol-K o 15 Kcal/mol-K (Packard et al., 1971;1975)), R_g la constante de los gases (en nuestro caso tomada como 8.31 J/mol-K o 1.987 cal/mol-K) y T la temperatura absoluta ($^{\circ}$ K).

Conocida la E_a podemos predecir el valor de la constante k_2 a la temperatura T_2 a partir de otro valor k_1 a otra temperatura T_1 . Realizando los cálculos pertinentes y desarrollando la ecuación, llegamos a la ecuación final que utilizaremos en nuestros cálculos:

$$k_2 = k_1 \cdot e^{[E_a(1/T_1 - 1/T_2)/R]} \quad \text{(Ec. 6)}$$

De esta manera, los valores obtenidos para el experimento 2 y los encontrados en la literatura se corrigieron mediante esta ecuación a una temperatura de 25°C, para estandarizar todos los datos a una misma temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Crecimiento y biomasa

La medida de la biomasa individual en unidades de carbono indica que los organismos han desarrollado un crecimiento exponencial durante el periodo de incubación, comportamiento que era de esperar. En los primeros estadios del ciclo de vida sufren un crecimiento lento, con pequeñas variaciones, hasta que llegan a la fase exponencial donde sufren un cambio brusco y aumentan considerablemente en biomasa. Este desarrollo termina en una fase de estabilización, pero en nuestros experimentos los organismos no completaron su ciclo de vida, no pudiendo observar esta fase del crecimiento (Fig. 2).

Se puede ver que en el experimento 1 llegan a la fase exponencial días antes que en el experimento 2, lo que puede ser debido a la diferencia de condiciones ambientales entre ellos. La temperatura más adecuada para un óptimo crecimiento de *Artemia salina* está en torno a los 26-30°C, pudiendo alcanzar la madurez en 2-3 semanas (Amat, 1985). Por tanto, al encontrarnos con 22°C en el experimento 2, es razonable que aparezca un crecimiento tardío al encontrarse bastante por debajo de esta temperatura óptima, tardando más tiempo en desarrollar su ciclo vital y por tanto en alcanzar la madurez.

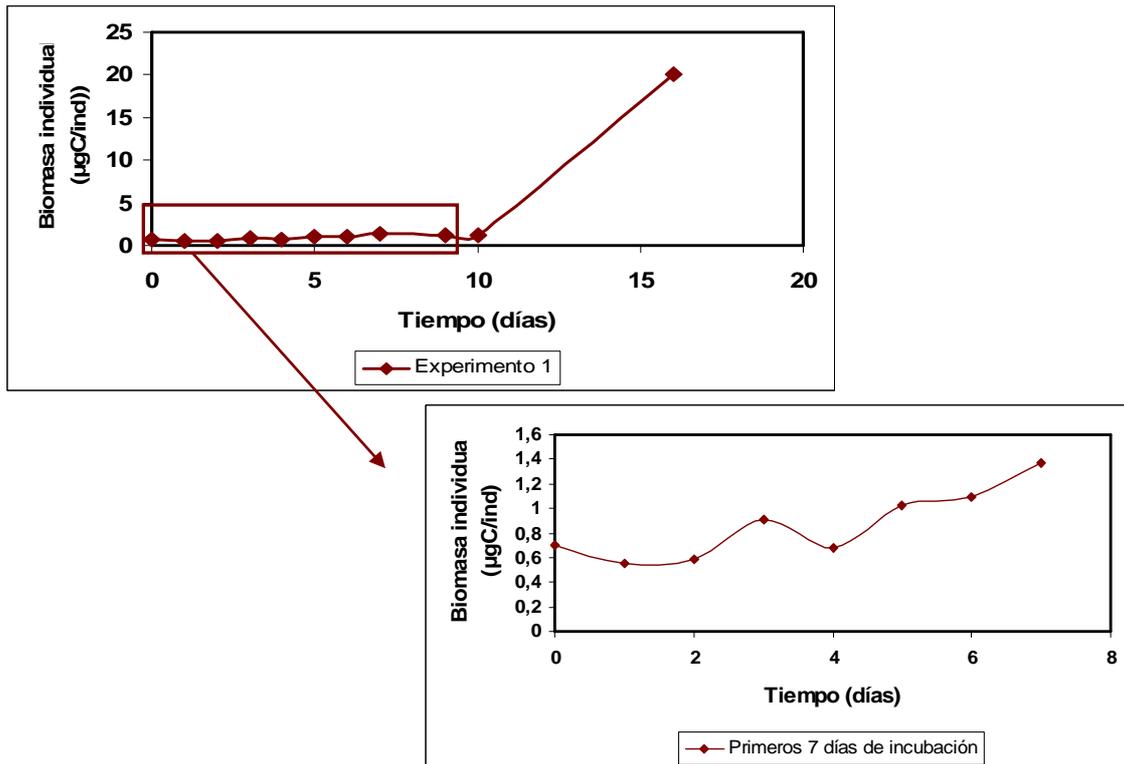
Por otro lado, también habría que recalcar que existe una diferencia en la alimentación entre los dos experimentos y es muy probable, a la vista de los datos relatados, que en el experimento 2 los organismos hayan estado por debajo de la concentración mínima de alimento para su máximo desarrollo.

Berges et al. (1990) estudiaron el crecimiento en *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones de alimento (*Dunaliella salina*), estableciendo tres niveles: 2000 cels·ml⁻¹ (concentración baja), 10000 cels·ml⁻¹ (concentración media) y 50000 cels·ml⁻¹ (concentración alta). En el experimento 2 la concentración media dada fue de 7155 cels·ml⁻¹, valor que se encontraría entre las concentraciones baja y media. De esta forma se obtuvo una tasa de crecimiento de $0,33 \pm 0,72$ (corregida a 25°C), similar al valor $0,28 \pm 0,2$ que encuentra Berges et al. (1990) para el nivel de baja concentración. Esto podría ser un indicativo de que nuestro experimento ha estado por debajo de las condiciones óptimas para su alimentación.

Por otro lado, en el experimento 1 se suministró una densidad de 50000 cels·ml⁻¹, obteniéndose una tasa de crecimiento de $0,28 \pm 0,42$ que coincide con la obtenida para el nivel de baja concentración y no para el nivel de alta concentración ($0,83 \pm 0,04$), que sería lo de esperar al ser la misma cantidad de cels·ml⁻¹. Esto puede ser debido al hecho de que en el experimento 1 se suministró otra especie de microalga (*Nanoclorosis sp.*), no siendo, probablemente, la más adecuada para el crecimiento de *Artemia salina*. En este sentido otros autores, Evjemo y Olsen (1999) y Lora-Vilchis et al. (2004) también encuentran tasas de crecimiento menor a concentraciones altas de otras especies de microalgas (Tabla 2).

Esto podría corroborar que dos de los factores que influyen en el crecimiento de los organismos son tanto la cantidad como la calidad del alimento.

(a)



(b)

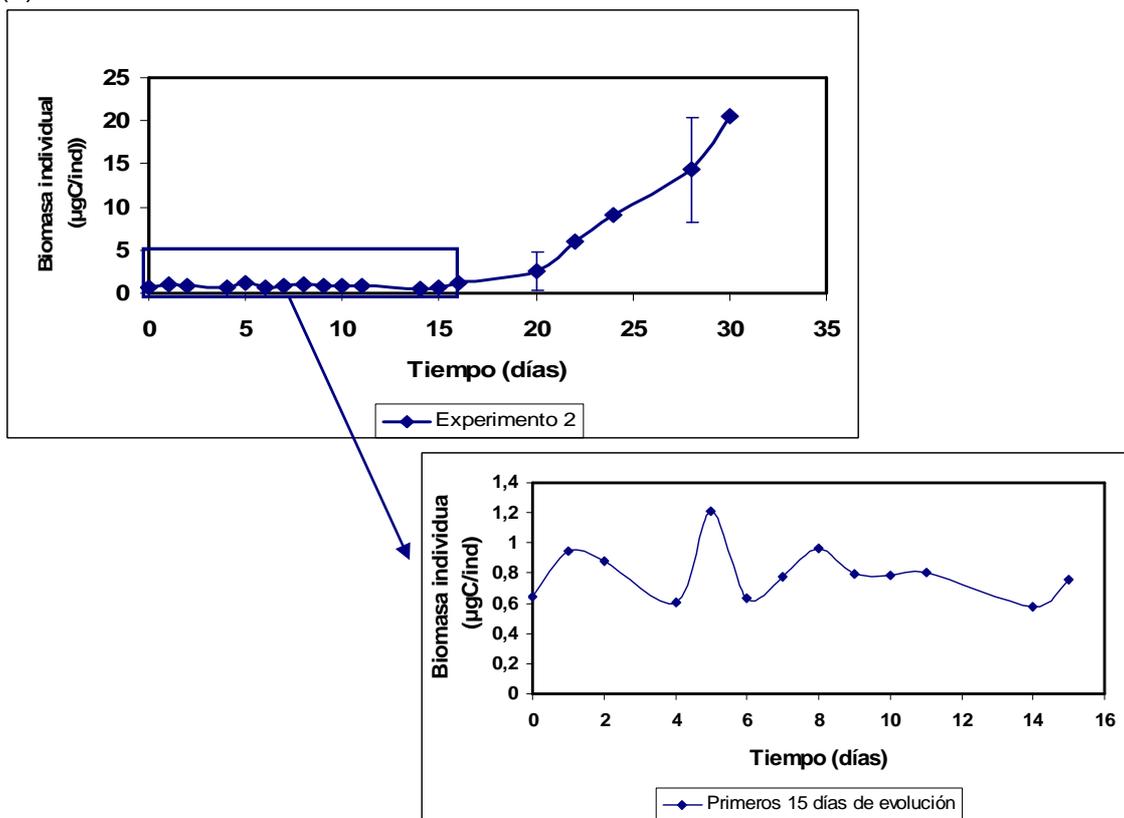


Fig. 2 Desarrollo de la biomasa individual de los experimentos a lo largo del periodo de incubación, junto con un zoom de los primeros días del ciclo de vida (a) Datos del experimento 1 (b) Representación del experimento 2.

En cuanto a la tasa de crecimiento (μ), se representaron todos los datos en conjunto (Fig. 3) dado que el promedio de ambos experimentos no son muy diferentes. Se puede observar que mantiene una tendencia bastante estable con algunas variaciones al principio del ciclo de vida de los organismos, pero estabilizándose a partir del día en que los organismos comienzan su crecimiento exponencial.

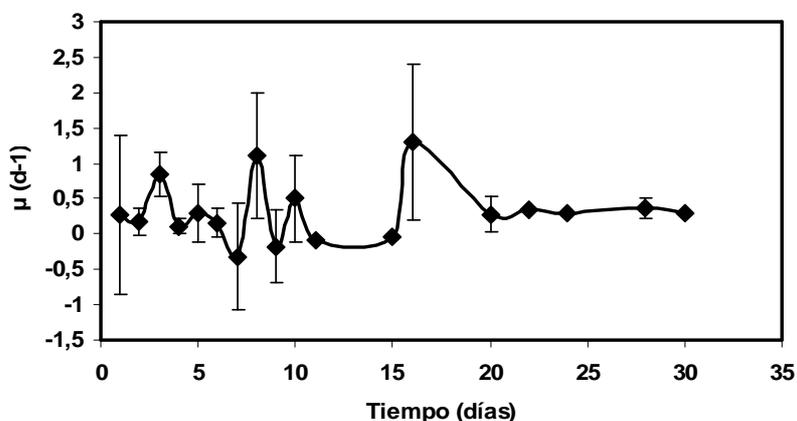


Fig. 3 Datos promedio de las tasas de crecimiento de ambos experimentos, corregidos a la temperatura de 25°C

Los valores obtenidos para la tasa de crecimiento se encuentran dentro del rango observado en la literatura (Tabla 2).

Referencias	Tasa de crecimiento μ (d^{-1})		Tª de incubación	Alimento
Experimento 1	0,28 ± 0,42 (-0,52 - 1,16)		25	<i>Nanoclorosis sp.</i> (50000 cels·ml ⁻¹)
Experimento 2	0,26 ± 0,56 (-0,93 - 1,6)	0,33 ± 0,72 ** (-1,20 - 2,07)	22	<i>Dunaliella salina</i> (7155 cels·ml ⁻¹)
Sapienza y Mague (1979)	0,64 ± 0,87 (0,025-1,25)	1,54 ± 2,09 ** (0,06-3,01)	15	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (0-100000 cels·ml ⁻¹)
Berges et al. (1990)	0,28 ± 0,2 (0,077-0,482)		25	<i>Dunaliella salina</i> (2000 cels·ml ⁻¹)
	0,48 ± 0,16 (0,363-0,595)			<i>Dunaliella salina</i> (10000 cels·ml ⁻¹)
	0,83 ± 0,04 (0,802-0,850)			<i>Dunaliella salina</i> (50000 cels·ml ⁻¹)
Evjemo y Olsen (1999)	0,23 ± 0,19 (0,04-0,43)	0,20 ± 0,23 ** (0,03-0,36)	27	<i>Isochrysis galbana</i> (130000 cels·ml ⁻¹)
Lora-Vilchis et al. (2004)	0,58 ± 0,11 (0,32-0,84)	0,49 ± 0,31 ** (0,27-0,71)	27	<i>Isochrysis sp.</i> (130000 cels·ml ⁻¹)

Tabla 2. Relación de datos sobre tasas de crecimiento encontradas en la literatura. Los datos marcados con ** están corregidos mediante la ecuación de Arrhenius a 25°C

2. Respiración

Estudiamos la evolución de las tasas de respiración durante el periodo de incubación y las posibles diferencias existentes entre la temperatura y la alimentación de los organismos. En la Fig. 4 se puede observar que los valores se mantienen relativamente estables hasta aumentar a medida que el organismo crece y coincidiendo con el momento en el que los organismos llegan a su fase exponencial de crecimiento. La evolución de la respiración representada como tasas por individuo sigue el patrón de comportamiento esperado, pues a medida que el individuo va creciendo va aumentando su consumo de oxígeno.

En la Fig. 4a se pueden apreciar las diferencias existentes entre los valores del experimento 1 y del experimento 2, siendo estos últimos mucho menores que los del primero. Para paliar estas diferencias, eliminamos una de las variables que pueden afectar a la respiración, la temperatura. De esta manera representamos todos los valores medidos a 25°C (Fig. 4b) utilizando la ecuación de Arrhenius (Ec. 6), sin embargo los valores no difieren significativamente, lo que nos puede llevar a pensar que las diferencias existentes entre ambos experimentos se deben a la diferencia en el tipo y concentración de alimento suministrado.

Por otro lado, las tasas de respiración específicas por peso seco obtenidas en los experimentos se encuentran dentro del rango de valores encontrados en la literatura (Tabla 3).

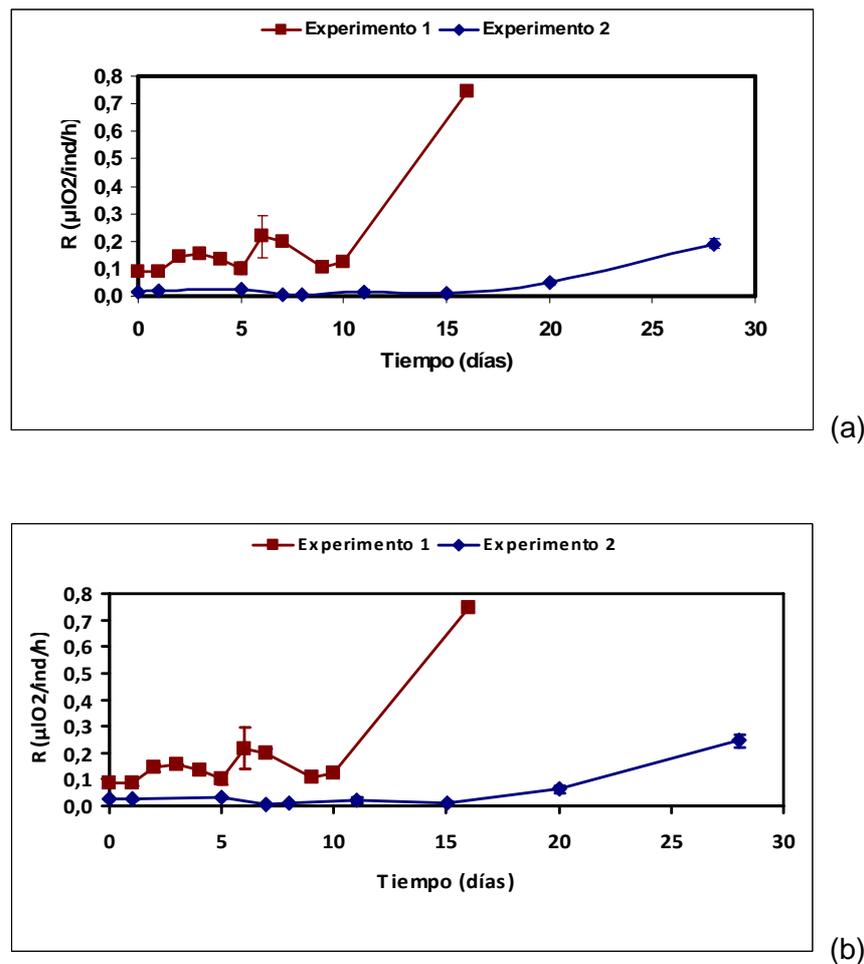


Fig. 4 Evolución de la respiración específica medida en $\mu\text{lO}_2/\text{ind}/\text{h}$ (a) Valores de los experimentos a la temperatura de incubación (b) Con los valores del experimento 2 corregidos a 25°C

Referencias	Respiration rate ($\mu\text{O}_2\text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)		Tª de incubación (°C)	Tipo de alimento
Experimento 1	53,19 ± 23,50 (14,90 - 94,92)		25	<i>Nanoclorosis sp.</i>
Experimento 2	9,03 ± 5,94 (3,56 - 23,59)	11,35 ± 7,79 ** (3,56 - 13,15)	22	<i>Dunaliella salina</i>
King y Packard (1975) [<i>Calanus pacificus</i>]	13,32 ± 4,71 (9,99 - 16,65)	32,1 ± 11,35 ** (24,07 - 40,12)	15	Fitoplancton del medio
Varó et al. (1993)	7,05 ± 6,81 (2,24 - 11,87)		25	Reservas del huevo
Simčič y Brancelj (1997) [<i>Daphnia sp.</i>]	15 ± 7,07 (10-20)	23,11 ± 10,89 ** (15,41 - 30,81)	20	<i>Scenedesmus sp.</i> Levaduras
Varó et al. (2000)	3,55 ± 2,89 (1,5 - 5,6)	3,87 ± 3,16 ** (1,63 - 6,09)	24	<i>Dunaliella sp.</i>
Ikeda et al. (2001) [<i>Acartia tonsa</i>]	7,99 ± 1,82 (6,71 - 9,28)	10,35 ± 2,35 ** (8,69 - 12,01)	22	Fitoplancton del medio
Ikeda et al. (2004) [<i>Neocalanus cristatus</i>]	0,38 ± 0,06 (0,34 - 0,42)	3,16 ± 0,47 ** (2,83 - 3,49)	2	Fitoplancton del medio
Simčič y Barncelj (2004) [<i>Daphnia sp.</i>]	8,25 - 9,54 (1,5 - 15)	12,71 ± 14,71 ** (2,31 - 23,11)	20	<i>Scenedesmus quadricauda</i> Levaduras
Irwin et al. (2007)	10,41 ± 4,28 (7,39 - 13,44)		25	Reservas del huevo

Tabla 3. Tasas de respiración específica encontradas en la literatura. Los valores señalados con ** están corregidos a la temperatura de 25°C

3. Respiración Potencial

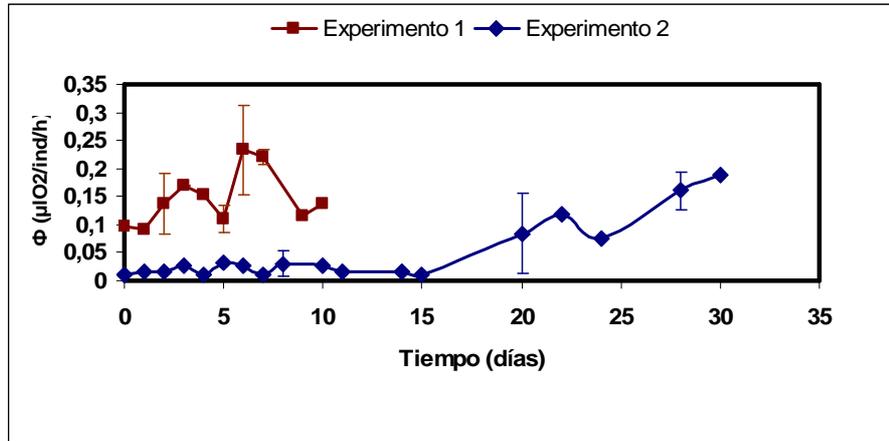
La actividad de las enzimas del Sistema de Transporte de Electrones (ETS) se ha tomado como un índice directo para la medida de la respiración en los organismos, por lo que cabría esperar que siga los mismos patrones de comportamiento que la respiración.

Como podemos comprobar, al representar los valores de respiración potencial respecto al tiempo de incubación (Fig. 5a, Fig. 5b) también se observa que experimenta un aumento a partir del momento en el que *Artemia salina* entra en su fase exponencial del crecimiento. Por tanto, la respiración potencial aumenta a medida que los individuos experimentan el crecimiento de forma significativa. Mientras se encuentran en los primeros estadios del ciclo de vida la actividad de las enzimas no sufre demasiada variación, puesto que los individuos tampoco experimentan cambios metabólicos significativos.

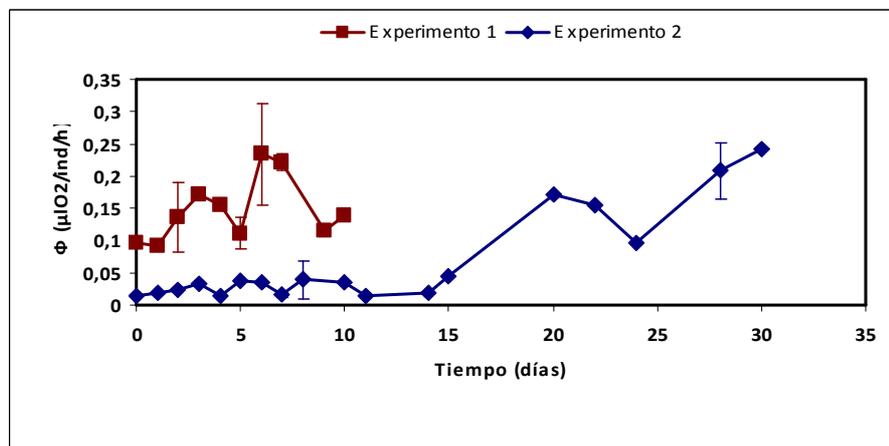
Exactamente igual que para la respiración, se representaron todos los valores a la misma temperatura (25°C), de forma que eliminamos esta variable como posible factor de las diferencias entre ambos experimentos. Se comprobó que los datos corregidos (Fig. 5b) tampoco variaron mucho respecto de los iniciales, por lo que seguimos con la hipótesis de la variación debida a las condiciones de alimentación.

Por otro lado, se representaron todos los datos obtenidos a 25°C de manera conjunta observándose una ligera tendencia a aumentar con el tiempo, lo que concuerda con lo esperado (Fig. 6). Las fuertes desviaciones que se aprecian pueden

ser debidas a las diferencias existentes entre los valores obtenidos en ambos experimentos.



(a)



(b)

Fig. 5 Evolución de la respiración potencial en unidades de $\mu\text{lO}_2/\text{ind}/\text{h}$ (a) Valores de ambos experimentos a la temperatura de incubación (b) Datos corregidos con la ecuación de Arrhenius a 25°C

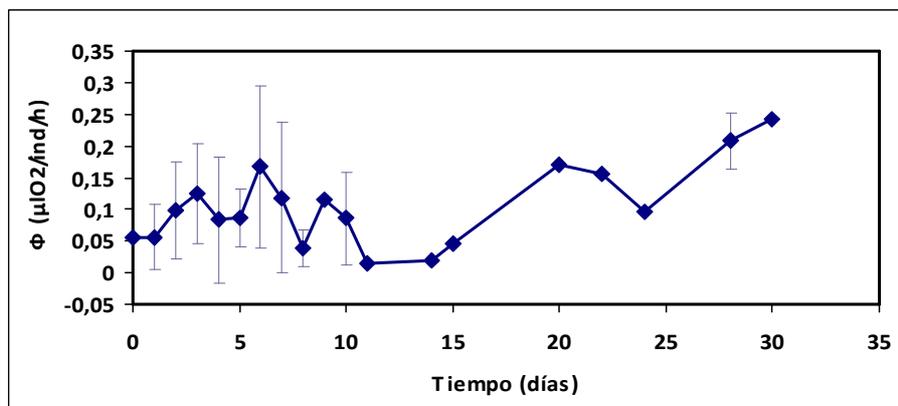


Fig. 6 Evolución del conjunto de datos de ambos experimentos (25°C)

Los datos obtenidos, establecidos como actividad específica por peso seco, concuerdan con los rangos encontrados en la literatura (Tabla 4).

Referencias	Tasa de respiración potencial ($\mu\text{O}_2\text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-1}$)		T ^a de incubación (°C)	Tipo de alimento
Experimento 1	70,45 ± 31,71 (35,13 - 134,89)		25	<i>Nanoclorosis sp.</i>
Experimento 2	8,85 ± 4,72 (2,48 - 17,63)	11,14 ± 5,82 ** (3,10 - 22,61)	22	<i>Dunaliella salina</i>
King y Packard (1975) [<i>Calanus pacificus</i>]	9,99 ± 1,41 (8,91 - 10,89)	24,07 ± 3,41 ** (21,66 - 26,48)	15	Fitoplancton del medio
Båmstedt (1980) [<i>Acartia tonsa</i>]	10 ± 3,53 (7,5 - 12,5)	14,08 ± 7,23 ** (8,9 - 19,26)	23	Muestras de fitoplancton (laboratorio)
Simčič y Brancelj (1997) [<i>Daphnia sp.</i>]	22,5 ± 17,68 (10-35)	34,67 ± 27,23 ** (15,41 - 53,93)	20	<i>Scenedesmus sp.</i> Levaduras
Simčič y Brancelj (2004) [<i>Daphnia sp.</i>]	10,75 ± 13,08 (1,5 - 20)	16,56 ± 20,16 ** (2,31 - 30,81)	20	<i>Scenedesmus quadricauda</i> Levaduras

Tabla 4. Referencias bibliográficas sobre la respiración potencial. Los valores marcados con ** están corregidos con la ecuación de Arrhenius a 25°C

4. Estudio de las relaciones entre los distintos parámetros

Una vez estudiada la evolución de cada uno de los parámetros individualmente, se procedió a estudiar y comparar las relaciones existentes entre ellos. De esta manera se estudió la evolución de los ratios R/biomasa y R/ Φ , así como la relación entre la respiración, respiración potencial y biomasa mediante regresiones lineales.

4.1 Relación entre respiración y respiración potencial

Hemos encontrado una muy buena relación entre las medidas de ambos parámetros. Se enfrentaron los valores de respiración frente a los valores de respiración potencial (ambos en valores específicos por individuo), obteniendo la recta de regresión $R = 1.687 \Phi - 0.0049$ con una bondad de ajuste de $R^2 = 0.961$ (Fig. 7). Esto nos puede llevar a la afirmación de que efectivamente la respiración potencial es un buen índice de la respiración.

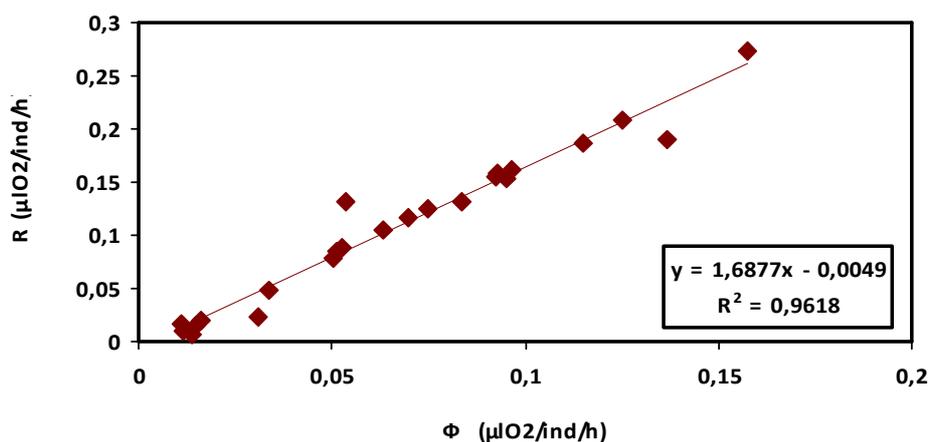


Fig. 7 Relación existente entre respiración y respiración potencial medidos en $\mu\text{O}_2\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$ durante el periodo de incubación de los organismos. La ecuación resultante es $R = 1.687 \Phi - 0.0049$ ($R^2 = 0.961$)

Por otro lado, también se estudió el ratio R/Φ , cociente que refleja la fracción de la capacidad respiratoria utilizada por los organismos. En su evolución durante el periodo de incubación (Fig. 8) se observa una tendencia que se podría considerar relativamente estable alrededor del valor de 1.5, lo que nos puede verificar el hecho de que tanto la respiración como la respiración potencial siguen patrones muy parecidos en su comportamiento y con una relación significativa entre sus valores, ya que ambas tasas presentan valores promedios muy parecidos (Tabla 1).

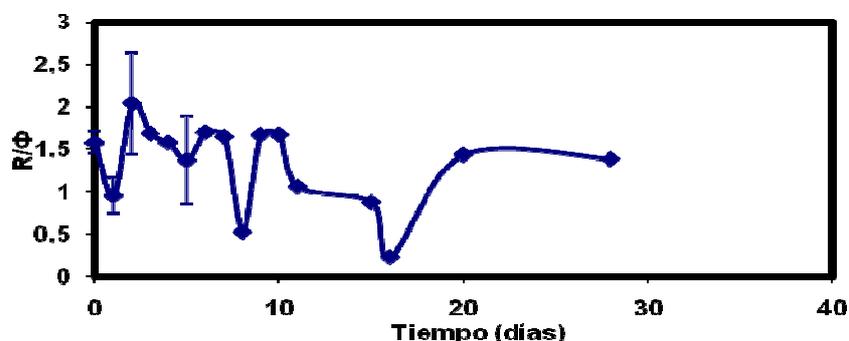


Fig. 8 Evolución temporal del ratio R/Φ . Ambos parámetros en unidades de $\mu\text{O}_2/\text{ind}/\text{h}$

La variación en el cociente R/Φ se ve afectada por diferentes parámetros y después de numerosos estudios se ha visto que este ratio es altamente variable (Tabla 5). Hernández-León y Gómez (1996) estudiaron los factores que podrían causar esta variabilidad, observando que los factores que principalmente parecían influir en este parámetro son la temperatura, la alimentación, el estado fisiológico y la edad de los organismos. En este sentido Hernández-León y Gómez (1996) encuentran que el cociente R/Φ mostró los valores promedios más altos en las clases de talla menores (100-200 μm), encontrando valores cercanos o superiores a 1 en distintas áreas geográficas objeto de estudio. En nuestros experimentos obtuvimos un valor promedio de 1.49 ± 0.39 . Teniendo en cuenta que la mayor parte de valores obtenidos para *Artemia salina* se corresponden con los primeros estadios de vida, podríamos comparar este valor promedio encontrado con el rango obtenido para las tallas entre 100-200 μm por Hernández-León y Gómez (1996).

Referencias	Muestra	R/Φ	Localización
Experimentos (todos los datos)	<i>Artemia salina</i>	1.49 ± 0.39 (n=33)	Incubaciones de Laboratorio
King y Packard (1975)	<i>Calanus pacificus</i> (NI)	0.59 ± 0.19 (n=2)	Atlántico Norte (Este) Pacífico Norte (Este tropical)
King y Packard (1975)	Copépodos	0.71 ± 0.40 (n=6)	Atlántico Norte (Este) Pacífico Norte (Este tropical)
King y Packard (1975)	Zooplankton	0.50 ± 0.17 (n=146)	Atlántico Norte (Este) Pacífico Norte (Este tropical)
Båmstedt (1979)	Copépodos	1.39 ± 0.66 (n=84)	Suecia (Costa Oeste)
Båmstedt (1980)	<i>Acartia tonsa</i>	0.47 ± 0.08 (n=13)	Florida (Miami)
Ikeda y Skjoldal (1980)	<i>Acartia australis</i>	0.16 ± 0.02 (n=4)	Australia (Townsville)
Hernández-León y Gómez (1996)	Zooplankton (100-200 µm)	0.94 ± 0.47 (n=13)	Mar Báltico (BALTEX)
		2.55 ± 0.86 (n=56)	Islas Canarias (EMIAc 9006)
		1.59 ± 0.88 (n=2)	Islas Canarias (EMIAc 9103)
		0.95 ± 0.98 (n=10)	Gran Canaria (Aguas costeras)

Tabla 5. Variabilidad de los valores del ratio R/Φ encontrados en la literatura

4.2 Relación con la biomasa

Hemos representado tanto la respiración como la respiración potencial frente a su biomasa en la forma logarítmica de una ecuación alométrica (Kleiber, 1961), estableciendo la relación entre dichos parámetros (Fig. 9, Fig. 10).

Las relaciones entre los procesos de las tasas metabólicas y la biomasa están generalmente descritas por una ecuación alométrica de la forma:

$$Y = aM^b \quad (\text{Ec. 7})$$

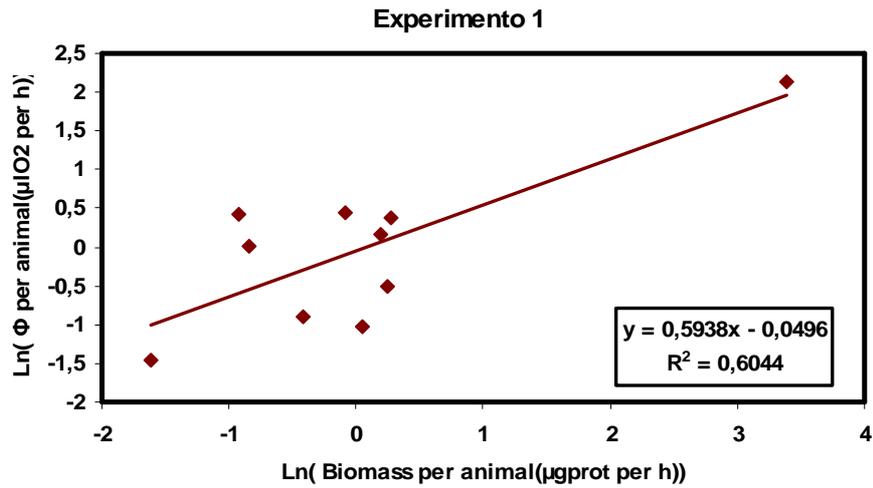
o en una transformada logarítmica

$$\ln(Y) = \ln(a) + b \cdot \ln(M) \quad (\text{Ec. 8})$$

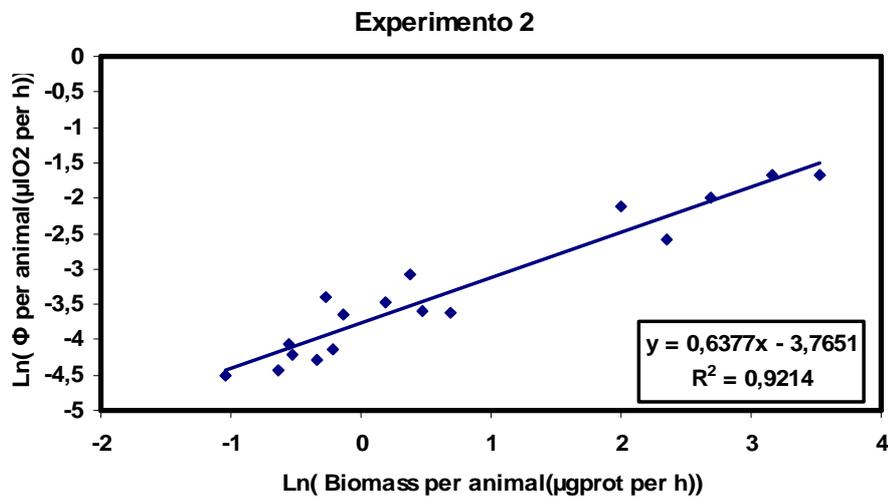
Aquí Y es el proceso de la tasa medida, M es la biomasa y 'a' y 'b' son constantes empíricamente obtenidas. La ley de Kleiber (Kleiber, 1961) establece que para la enorme mayoría de los organismos, la tasa metabólica se corresponde con la masa corporal elevada a la potencia $\frac{3}{4}$, de manera que la ecuación quedaría:

$$Y = M^{3/4} \quad (\text{Ec. 9})$$

Esta ley es una consecuencia de la física y geometría de los sistemas circulatorios de los animales (West y Brown, 2005). Los organismos jóvenes (pequeños) respiran más por unidad de peso que los adultos (grandes) de una misma especie debido al elevado coste del crecimiento, algo que se puede ver reflejado en este trabajo en la evolución del ratio R/biomasa (Fig. 11), que experimenta una disminución a lo largo del periodo de incubación.

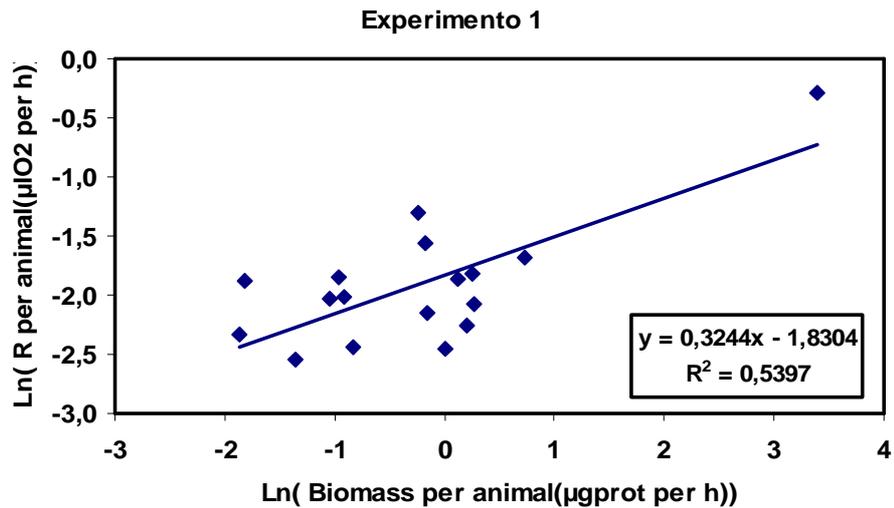


(a)

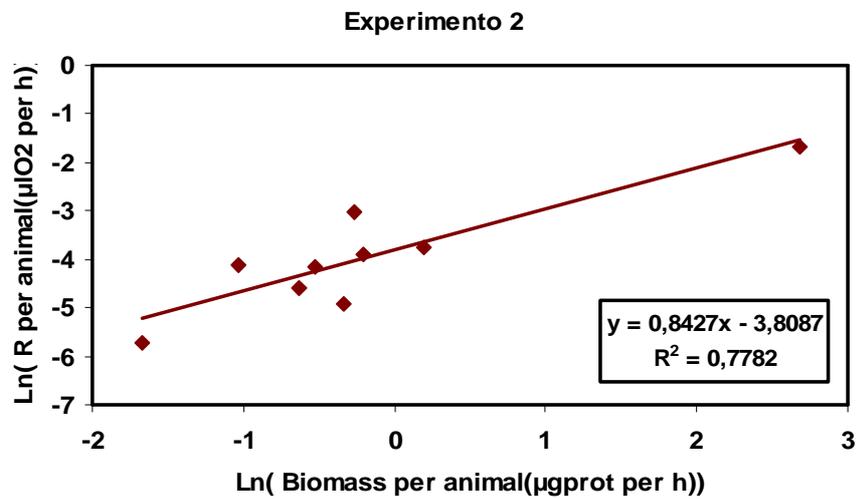


(b)

Fig. 9 Representación del logaritmo de la respiración potencial (Φ) frente al logaritmo de la biomasa (proteínas) por individuo (a) Datos representados del experimento 1 y la ecuación resultante es $\text{Ln } \Phi = 0.59\text{Ln biomasa} - 0.05$ ($R^2 = 0.6044$) (b) En el experimento 2 la ecuación resultante es $\text{Ln } \Phi = 0.64\text{Ln biomasa} - 3.76$ ($R^2 = 0.92$)



(a)



(b)

Fig. 10 Representación del logaritmo de la respiración (R) frente al logaritmo de la biomasa (proteínas) por individuo (a) Datos representados del experimento 1 y la ecuación resultante es $\text{Ln } R = 0.32\text{Ln biomasa} - 1.83$ ($R^2 = 0.54$) (b) En el experimento 2 la ecuación resultante es $\text{Ln } R = 0.84\text{Ln biomasa} - 3,81$ ($R^2 = 0.78$)

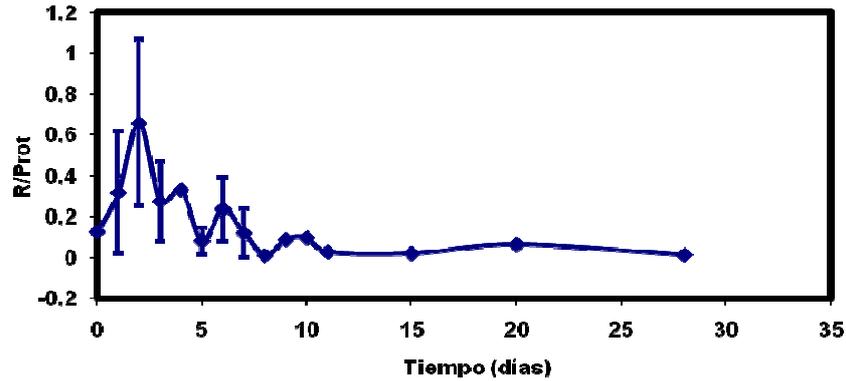


Fig. 11 Evolución temporal del ratio entre la respiración y la biomasa medida como contenido en proteínas. Se encontró un valor promedio de 0.19 ± 0.22

Diferentes estudios han corroborado que el exponente general para los organismos es 0.75 [3/4] (King y Packard 1975; Whitfield 2006; Savage et al. 2004; Brown et al 2007) en contraste con el 0.67 sugerido en la década de los '80.

En nuestros experimentos se puede observar que la pendiente diverge bastante de estos valores establecidos. Respecto al experimento 2, encontramos unas pendientes de 0.64 en relación a la respiración potencial y de 0.84 en relación a la respiración, valores que podríamos asumir dentro del rango de valores encontrados por Savage et al. (2004), en un intervalo de confianza del 95%, midiendo el metabolismo basal, "de campo" (metabolismo de un organismo que vive libre en la naturaleza) y el metabolismo máximo. En el caso del experimento 1, los valores obtenidos están muy por debajo de los esperados, 0.59 para la respiración potencial y 0.32 para la respiración, variaciones que pudieran ser debidas a posibles errores experimentales o a la climatización y adaptación a las diferentes condiciones del medio entre otros (Brown et al. 2007).

Por tanto, se requeriría de un mayor estudio para comprobar los posibles factores que han hecho que la pendiente en nuestros experimentos sea diferente de la esperada, ya que el valor de 0.75 parece ser el más concluyente. Por otro lado, se ha obtenido una relación significativa entre la respiración potencial y la biomasa ($R^2=0.60$ y $R^2=0.92$), lo que parece confirmar la idea de que la respiración potencial podría ser utilizada como un buen índice de la biomasa viva.

CONCLUSIONES

1. Los datos obtenidos se encontraron en el rango de valores encontrados en la literatura
2. Tanto la cantidad como la calidad del alimento juegan un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento de *Artemia salina*
3. Se obtuvo una relación significativa entre la respiración y la respiración potencial, por lo que se puede decir que efectivamente la respiración potencial es una medida directa de la respiración ($R=1.687\Phi - 0.0049$, $R^2=0.961$)
4. Se encontró una relación significativa entre la respiración potencial y la biomasa, por lo que la respiración potencial podría ser un buen índice para medir la biomasa viva ($\ln \Phi = 0.64 \ln \text{biomasa} - 3.76$, $R^2 = 0.92$)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a la Dra. Dña. May Gómez Cabrera por haberme acogido bajo su tutela y por todas sus directrices y dedicación a lo largo del desarrollo de este trabajo. Al Dr. Don Theodore T. Packard por su inestimable ayuda y consejos. A mis compañeros de laboratorio, mi familia y amigos por sus ánimos y apoyo. Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria a través de la beca INNOVA concedida por la Fundación Universitaria de Las Palmas, respaldado por el proyecto "ConAfrica: La Conexión Africana en la Corriente de Canarias" (CTM2004-02319/MAR).

BIBLIOGRAFÍA

1. Amat F. (1985) Utilización de *Artemia* en acuicultura. *Inf. Tecn. Invest. Pes.* 128-129, 37pp
2. Alcaraz M. y Packard T.T. (1989) Zooplankton ETS activity and respiration in the Catalan Sea (Western Mediterranean). In: Topics in Marine Biology. Ros J.D. (Ed) *Scient. Mar.* 53(2-3):247-251
3. Arístegui J. y Montero M.F. (1995) The relationship between community respiration and ETS activity in the ocean. *J. Plankton Res.* 17(7): 1563-1571
4. Båmstedt U. (1979) Seasonal variation in the respiratory rate and ETS activity of deep-water zooplankton from the Swedish west Coast. In Naylor E.D. and Hartnoll R.G. (eds), *Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals*. Pergamon Press, pp267-274
5. Båmstedt 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, 267-283
6. Båmstedt U. (1986) Chemical composition and energy content. In: Corner EDS, O'Hara SCM (eds) *The biological chemistry of marine copepods*. Clarendon Press, Oxford pp1-58
7. Berges J.A., Roff J.C. y Ballantyne J.S. (1990) Relationship between body size, growth rate and maximal enzyme activities in Brine Shrimp *Artemia franciscana*. *Biol. Bull.* Vol 179: 287-296
8. Brown J.H., Allen A.P. y Gillooly J.F. (2007) The metabolic theory of ecology and the role of body size in marine and freshwater ecosystems. In: *Body Size: The structure and Function of Aquatic Ecosystems*. Hildrew A.G., Raffaelli D.G. and Edmonds-Brown (eds). Chapter One.
9. Bryan J.R., Riley J.P. y Williams P.J. le B. (1976) A winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentration for productivity and related studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol 21: 191-197
10. Curl H.J. y Sandberg J. (1961) The measurement of dehydrogenase activity in marine organisms. *J. Mar. Res.* Vol 19: 123-138
11. Evjemo J.O. y Olsen Y. (1999) Effect of food concentration on the growth and production rate of *Artemia franciscana* feeding on algae T.iso. *J. Exp. Mar. Bio and Ecol.* Vol 242: 273-296
12. Finlay B.J., Span A. y Ochsnein-Gattlen C. (1983) Influence of physiological state on indices of respiration rate in protozoa. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol 74(2): 211-219

13. Gómez M., Torres S. y Hernández-León S. (1996) Modification of the electron transport system (ETS) method routine measurements of respiratory rates of zooplankton. *S.Afr.Mar.Sci.* vol 17: 15-20
14. 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. *J. Plankton Res.* Vol 10(6): 1141-1154
15. Hernández-León S. y Gómez M. (1996) Factors affecting the respiration/ETS ratio in marine zooplankton. *J. Plankton Res.* Vol 18(2): 239-255
16. Huntley M. y López M.D.G. (1992) Temperature dependent production of marine copepods: a global synthesis. *American Naturalist* **140**: 201-242
17. Ikeda T. y Skjoldal H.R. (1980) The effect of laboratory conditions on the extrapolation of experimental measurements to the ecology of marine zooplankton. *Mar. Biol.* Vol 58: 285-293
18. Ikeda T., Kanno Y., Ozaki K. y Shinada A. (2001) Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Marine Biology* vol 139: 587-596
19. Ikeda T., Sano F. y Yamaguchi A. (2004) Metabolism and body composition of a copepod (*Neocalanus cristatus*: Crustacea) from the Oyashio region, western subarctic Pacific. *Marine Biology* vol 145: 1181-1190
20. Irwin S., Wall V. y Davenport J. (2007) Measurement of temperature and salinity effects on oxygen consumption of *Artemia franciscana* K., measured using fibre-optic oxygen microsensors. *Hydrobiologia* vol 575:109-115
21. Kenner R.A. y Ahmed S.I. (1975a) Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* Vol 33:119-127
22. Kenner R.A. y Ahmed S.I. (1975b) Correlation between oxygen utilization and electron transport activity in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* Vol 33:129-133
23. Kimmerer W.J. y McKinnon A.D. (1987) Growth, mortality and secondary production of the copepod *Acartia tranteri* in Westerpoint Bay, Australia. *Limnol. Oceanogr.* Vol 32: 14-28
24. King F.D. y Packard T.T. (1975) Respiration and the activity of respiratory electron transport system in marine zooplankton. *Limnology and Oceanography* vol 20(5): 849-854
25. Kleiber M. (1961) The fire of life: an introduction to animal energetics. John Wiley and sons Inc. New York 454 pp
26. Lora-Vilchis M.C., Cordero-Esquivel B. y Voltolina D. (2004) Growth of *Artemia franciscana* fed *Isochrysis* sp. and *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture Research* vol 35: 1086-1091
27. Lovegrove T. (1966) The determination of the dry weight of plankton and effect of various factors on the values obtained. In: *Some contemporary studies in marine science.* (H. Barnes ed.) George Allen and Unwin Ltd., London pp 429-467
28. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with a Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* Vol 193: 265-275
29. Omori M. e Ikeda T. (1984) Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley and sons Inc. New York.
30. Owens T.G. y King F.D. (1975) The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* Vol 30: 27-36
31. 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, Univ. Washington, Seattle 115pp
32. Packard T.T., Healey M.L. y Richards F.A. (1971) The vertical distribution of the activity of the electron transport system in plankton. *Limnology and Oceanography* vol 16(1): 60-70
33. Packard T.T. (1971) The measurement of respiratory electron transport activity in marine phytoplankton. *J.Mar.Res* vol 29: 235-244

34. Packard T.T., Harmon D. y Boucher J. (1974) Respiratory electron transport activity in plankton from upwelled waters. *I.H.I.H.T.S.* vol 6(1): 213-222
35. Packard T.T., Devol A.H. y King F.D. (1975) The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton. *Deep Sea Research* vol 22: 237-249
36. Packard T.T. y Williams P.L. (1981) Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawaters from the northwest Atlantic. *Oceanologica Acta* vol 4(3): 351-358
37. Packard T.T., Berdalet E., Blasco D., Roy S.O., St-Amand L., Lagacé B., Lee K. y Gagné J.P. (1996) Oxygen consumption in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* predicted from ETS activity and bisubstrate enzyme kinetics. *J. Plankton Res.* Vol 18(10): 1819-1835
38. Parsons T.R., Takahashi M. y Hargrave B. (1984) Biological oceanographic processes. Pergamon Press, New York
39. Ramírez T., Liger E., Cortés D., Mercado J., Vargas M., Sebastián M., Bautista B. y Reul A. (2005) Electron transport system activity in an upwelling area of the NW Alboran Sea. *Geophys. Res. Abstract* vol 7, 03069
40. Rutter W.J. (1967) Protein determinations in embryos. In: Wilt F.H. and Wessels N.V. (eds) *Methods in developmental biology*. Academic Press, London pp671-684
41. Sapienza C. y Mague T.H. (1979) DNA polymerase activity and growth rates in *Artemia salina* nauplii. *Limnology and Oceanography* vol 24(3): 572-576
42. Savage V.M., Gillooly J.F., Woodruff W.H., West G.B., Allen A.P., Enquist B.J. y Brown H.J. (2004) The predominance of quarter-power scaling in biology. *Functional Ecology* vol 18: 257-282
43. Simčič T. y Brancelj A. (1997) Electron transport system (ETS) activity and respiration rate in five *Daphnia* species at different temperatures. *Hydrobiologia* vol 360: 117-125
44. Simčič T. y Brancelj A. (2004) Respiratory electron transport system (ETS) activity as an estimator of the thermal tolerance of two *Daphnia* hybrids. *J. Plankton Res.* Vol 26 (5): 525-534
45. Varó I., Taylor A.C. y Amat F. (1993) Comparative study of the effects of temperature, salinity and oxygen tension on the rates of oxygen consumption on nauplii of different strains of *Artemia*. *Mar. Biol.* vol 117: 623-628
46. Varó I., Taylor A.C., Navarro J.C. y Amat F. (2000) Effect of parasitism on respiration rates of adults of different *Artemia* strains from Spain. *Parasitol Res.* Vol86: 772-774
47. West G.B. y Brown J.H. (2005) The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *The Journal of Experimental Biology.* Vol 208: 1575-1592
48. Whitfield J. (2006) In the beat of a heart: Life, Energy, and the unity of Nature. Joseph Henry Press 261pp