

**TESINA DE GRADO DE LA LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROFUNDIZACIÓN ECOLOGÍA.**

**Influencia de la salinidad en el crecimiento de los distintos estadios de
desarrollo del copépodo *Acartia tonsa*.**



Gabriela Morales Méndez.

ORIENTADOR: Dr. Danilo Calliari.

Facultad de Ciencias y CURE - Rocha, UdelaR.

DICIEMBRE 2020

Agradecimientos:

A Irene Machado por su ayuda en el laboratorio de Microscopía.

A Laura Rodríguez-Graña, por su colaboración, por estar siempre dispuesta a ayudar y sobre todo por ofrecer su ayuda.

A Danilo Calliari, por todo lo que me enseñó, por su sencillez, su generosidad y su infinita paciencia.

A mi familia y amigos por su colaboración y motivación.

Indice General

Contenido:	N.º página
Resumen	5
Introducción	5
Hipótesis	8
Objetivos	8
Métodos	8
T=0 (comienzo de la incubación)	13
48h (fin de la incubación)	13
Análisis de las muestras	14
Análisis de datos	14
Resultados	16
Descripción cuantitativa	20
Análisis de crecimiento absoluto	24
Análisis de crecimiento específico	25
Discusión	25
Bibliografía	28
Anexo	30

Indice de Figuras

Figura	N.º página
Figura 1 Instrumento para control de salinidad	9
Figura 2 Recipientes con las cohortes de <i>Acartia tonsa</i>	13
Figura 3 Incubadoras y disposición de los cultivos	14
Figura 4 Individuos a salinidad 2 y 5	17
Figura 5 Huevos e individuos adultos a salinidad 10	18
Figura 6 Individuos a salinidad 20 y 30	19
Figura 7 Crecimiento diario estadio Nauplio	21
Figura 8 Crecimiento diario estadio Copepodito	22
Figura 9 Crecimiento diario estadio Adulto	23

Indice de Tablas

Tabla	N.º página
Tabla 1: Cronograma aclimatación a salinidad experimental	10
Tabla 2: Protocolo de aclimatación a salinidad experimental	11
Tabla 3: Descripción cualitativa poblaciones experimentales	16
Tabla 4: Análisis de varianza efecto salinidad	24
Tabla 5: Análisis de varianza efecto salinidad y estadío	25

RESUMEN:

El siguiente trabajo surge de la importancia de generar información sobre los efectos de la salinidad en los distintos estadios del copépodo *Acartia tonsa*, en individuos adaptados desde toda su ontogenia. En él se describen los resultados obtenidos de experimentos de crecimiento de los estadios nauplio, juvenil y adulto, a cinco niveles de salinidad (2, 5, 10, 20 y 30). Los individuos experimentales fueron adaptados en el largo plazo a la salinidad experimental (durante toda su ontogenia) y fueron alimentados *ad libitum*. Se observó el efecto de la salinidad dentro de cada estadio y también entre los estadios. Para el caso de los adultos, se observaron resultados semejantes a los ya existentes en cuanto al incremento de la producción de huevos de menor a mayor salinidad, para los tratamientos comprendidos entre 10 y 30, con la excepción de salinidad 20, donde se dio la menor producción 4,88 huevos.h⁻¹.d⁻¹ y 30 donde se observó el máximo de 14.7 huevos.h⁻¹.d⁻¹. Para salinidades 2 y 5 los resultados fueron menores a los registrados en la bibliografía. Se observó un crecimiento diferencial en todos los estadios, sin embargo en todos los casos se registró el mayor crecimiento tanto absoluto como específico a salinidades del entorno de 10, lo cual concuerda con la bibliografía. También se observó en todos los casos el menor crecimiento a salinidad 2. Para todas las salinidades el estadio que evidenció un mayor crecimiento específico fue el de copepoditos.

Palabras clave: crecimiento, crecimiento biomasa - específico, adaptación salina, experimentación.

INTRODUCCIÓN:

El zooplancton tiene una gran importancia ecológica por su papel en las redes tróficas marinas. En ecosistemas pelágicos su abundancia presenta una alta variabilidad espacial y temporal (Benfield *et al.*, 2007). Los organismos que forman la comunidad zooplanctónica tienen en general períodos de vida cortos y en muchos casos resulta accesible trabajar con ellos en el laboratorio. Por sus atributos ecológicos pueden ser indicadores de calidad ambiental y variabilidad climática (Beagrand *et al.*, 2002).

Los copépodos son los metazoarios de mayor abundancia en el medio acuático. Tienen un largo corporal que va desde 0.5 a varios mm. Muchos de ellos son omnívoros (Paffenhöfer & Strickland 1970, Ohman & Runge 1994, Mauchline 1998), bajo condiciones naturales están expuestos a alimento de un amplio valor nutricional, incluyendo fitoplancton, microzooplancton y detritos. Los copépodos que tienen un modo de alimentación herbívoro-omnívoro vinculan tróficamente el fitoplancton con una gran diversidad de invertebrados pelágicos y peces, como sardina, anchoítas, etc. También son el extremo inferior del espectro de alimentación de las ballenas barbadas; por ejemplo *Baleanoptera borealis*, la ballena boreal o de Groenlandia, la ballena Franca y el rorcual común consumen grandes cantidades de copépodos (Gaskin, 1982).

Los copépodos realizan migraciones nictemerales, con ascenso nocturno a las capas superficiales donde se localiza el fitoplancton para alimentarse y descenso diurno a aguas profundas para defecar (hasta 200 pellets per cápita/día). Ello los convierte en un elemento clave en el ciclado de nutrientes y para el funcionamiento de la bomba biológica de carbono (Jaume et al., 2004).

En los copépodos las hembras adultas no crecen apreciablemente en tamaño corporal y los huevos son su única forma de producción secundaria. Sekiguchi et al. (1980) examinando *Acartia clausi* (*A. hudsonica*), sugirió que la tasa de producción de huevos era predecible a partir de la tasa de crecimiento. La relación inversa, es decir la predicción de la tasa de crecimiento de diversos estadios de desarrollo a partir de la tasa de producción de huevos de las hembras adultas, es de valor práctico en estudios de campo para una rápida estimación de la tasa de crecimiento y producción secundaria poblacional en condiciones naturales (McLaren and Leonard, 1995; Hay, 1995; Poulet et al., 1995).

La salinidad es una variable central en la regulación de la estructura y funcionamiento en los ecosistemas marinos costeros. Las adaptaciones a diferentes rangos de sal, así como su variabilidad determinan la tolerancia fisiológica y las tasas biológicas que pueden desarrollar diferentes especies en regiones marinas costeras. En copépodos la salinidad tiene efectos en el crecimiento y en el desarrollo de las especies estuarinas -donde la salinidad es en general más variable- y a su vez interactúa con la temperatura. Nagaraj (1988) encontró que nauplios de *Eurytemora velox* toleraban mejor bajas salinidades a altas temperaturas y altas salinidades a bajas temperaturas.

Acartia tonsa es una especie marina costera de amplia distribución cuya capacidad eurihalina

destaca aún entre aquellas que frecuentemente ocurren en zonas costeras y estuarios. *A. tonsa* tolera durante períodos acotados salinidades desde 1 hasta 72 unidades (Lance 1963, 1965, Cervetto et al 1999). En zonas favorables esta especie puede presentar una fuerte dominancia, con una representación de entre 55 y 90% del zooplancton. Por ejemplo, en zonas oligohalinas de estuarios es ocasionalmente la única especie presente (Calliari et al. 2004, Paul & Calliari 2017). Es una especie que se puede mantener fácilmente en cultivos de laboratorios, por lo cual es también muy utilizada como modelo experimental (Mauchline 1998; Stottrup 2000). Estudios previos evaluaron la tolerancia de *A. tonsa* a la salinidad y se enfocaron en aspectos como la osmorregulación (Lance 1963, 1965), la sobrevivencia y el balance energético, tasas de consumo, producción secundaria y éxito reproductivo en salinidades variables (Cervetto et al. 1999, Castro-Longoria 2001, Calliari et al 2006, Calliari et al. 2008).

De los trabajos anteriores también surge que la fracción de la energía metabólica representada por la respiración no aumenta significativamente con la disminución de la salinidad, sugiriendo que la osmorregulación representaría una fracción muy pequeña del costo energético, como se observa en otros crustáceos (0.4 y 1.3% en *Astacus* y *Eriochir*, respectivamente; Potts 1954, Schmidt-Nielsen 1991).

El rango óptimo de salinidad para el éxito reproductivo de *A. tonsa* se ha sugerido que iría desde 10 hasta 33, con una producción media de 15 a 19 nauplios. ind.⁻¹. d⁻¹ (a 18°C y alimento en condiciones de sub-saturación), mientras que para salinidades de 5 y 2, la producción es de 12,1 y 10,7 nauplios. ind.⁻¹. d⁻¹, respectivamente (Calliari et al 2006). El éxito en la eclosión de los huevos es menor a salinidades más bajas y la diferencia de tamaño de los huevos a distintas salinidades indica que la superficie del huevo es permeable y por lo tanto los embriones están expuestos a diferentes presiones osmóticas (Calliari et al 2006). La reducida tolerancia ambiental durante los primeros estadios es un patrón común en los copépodos (Tester & Turner 1991, Chinnery & Williams 2004, Devreker et al 2004).

El análisis comparativo sugiere que las respuestas de sobrevivencia de *A. tonsa* en un amplio gradiente de salinidad es muy similar en poblaciones aclimatadas por períodos relativamente cortos a la salinidad experimental (horas, pocos días), respecto a poblaciones sujetas a cambios bruscos (i.e., shocks osmóticos) (Calliari et al., 2006, 2008). Esto afirma la capacidad de tolerar variaciones de salinidad, e indicaría que la tolerancia a estas variaciones en *A. tonsa* son en gran medida independientes del tiempo de adaptación a la condición salina

evaluada. En tanto, resultados similares serían esperables en poblaciones aclimatadas por períodos prolongados, es decir expuestas a la salinidad experimental durante todo el desarrollo ontogénico. Sin embargo, ello no se ha evaluado explícitamente hasta el momento.

HIPÓTESIS:

En copépodos eurihalinos como *A. tonsa* las tasas de crecimiento bajo diferentes condiciones salinas son independientes del período de adaptación de los individuos. Esto implica que en un amplio rango de salinidades las respuestas por parte de individuos aclimatados durante un período prolongado a la condición experimental (i.e., toda la ontogenia) siguen el patrón observado por parte de individuos aclimatados por períodos cortos (horas).

OBJETIVOS:

General:

Evaluar el crecimiento de diferentes estadios de *Acartia tonsa* en un amplio rango de salinidades utilizando poblaciones adaptadas a la salinidad experimental durante largo plazo.

Específicos:

- 1.- Generar en el laboratorio poblaciones de *A. tonsa* aclimatadas a diferentes condiciones de salinidad (2, 5, 10, 20 y 30) desde la etapa embrionaria.
- 2.- Comparar la tasa de crecimiento absoluta y biomasa-específica de nauplios, juveniles y adultos aclimatados a cada condición salina.

MÉTODOS:

Los trabajos experimentales se realizaron en los laboratorios del Centro Universitario Regional del Este, sede Rocha (CURE-Rocha). El experimento consistió en un diseño factorial completo, con los factores {salinidad} y {estadio}. El factor {salinidad} tuvo los niveles 2, 5, 10, 20 y 30, mientras que {estadio} tuvo los niveles de nauplio, juvenil y adulto. Los niveles de salinidad propuestos fueron elegidos en función de las respuestas observadas para esta misma especie en trabajos previos (Calliari et al 2006, 2008). La aproximación consistió en medir el crecimiento somático promedio en cohortes de individuos en estadios

larval (nauplios) y juvenil (copepoditos) durante un período corto (48 h), y la producción de huevos para el caso de las hembras adultas.

En los experimentos se utilizó agua de mar artificial, preparada a partir de la sal marina comercial de alta calidad (Tropic Marin, Alemania). La salinidad se cuantificó a partir de la conductividad utilizando un conductímetro de laboratorio (Oaklton Salt 6+, figura 1), por lo que las medidas se expresan en la escala práctica, sin unidades.

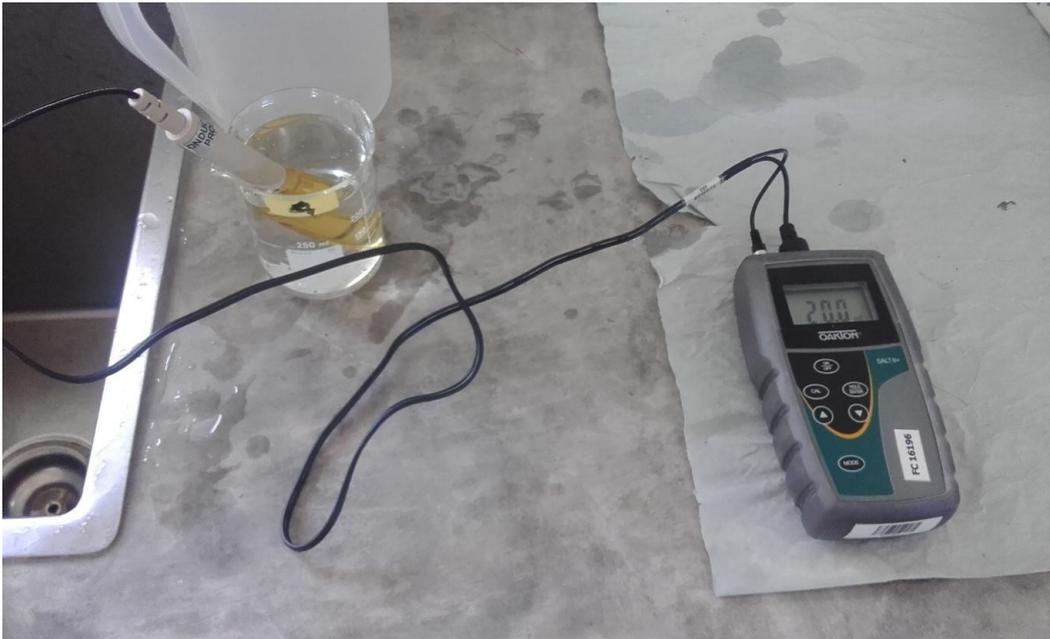


Fig. 1: Conductímetro Oaklton Salt 6+ para control de salinidad durante los experimentos

Para obtener el agua a diferentes salinidades en primer lugar se preparó una solución de agua de mar artificial con salinidad $S = 30$. Luego, a partir de ésta se prepararon diferentes diluciones para ser usadas en la aclimatación de los individuos y en el experimento propiamente dicho mezclando cantidades apropiadas de la dilución inicial ($S = 30$) con agua corriente de clorada por un tiempo mayor a 24 h.

La manipulación de los copéodos tendiente a generar las poblaciones experimentales se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento y cronograma como se muestra en la Tabla 1 (por mayores detalles, ver anexo).

Tabla 1. Cronograma que detalla los tiempos de aclimatación utilizados para la generación de poblaciones adaptadas a los niveles experimentales de salinidad. La incubación para determinación de la respuesta de crecimiento se inició en el tiempo T = 0. Los tiempos están indicados en días (por ej., T 2 significa dos días después de iniciada la incubación experimental)

Día	T -10	T -9	T -7	T -2	T 0	T 2
Actividad	A	B	C	D	E, F, G	H, I

A: preparación del agua.

B: aclimatación de adultos para la obtención de huevos. C: colecta de huevos para la obtención de juveniles.

D: colecta de huevos para la obtención de nauplios. E: colecta de los individuos en botellas.

F: colecta y fijación de las muestras iniciales. G: inicio de la incubación

H: fin del experimento.

I: colecta y fijación de muestras finales.

Los copépodos utilizados en los experimentos se obtuvieron de un cultivo que se mantiene a una salinidad de aprox. 15 en los laboratorios del CURE-Rocha (cultivo madre), originado a partir de la población de *A. tonsa* de la Laguna de Rocha. Durante la etapa de aclimatación todas las poblaciones fueron mantenidas a una temperatura constante de 18°C. La estrategia de aclimatación de las poblaciones experimentales a las condiciones de salinidad a evaluar consistió en:

1.- someter un número de organismos adultos extraídos del cultivo madre a las salinidades experimentales (2, 5, 10, 20 y 30). Para llevar cada una de las poblaciones desde la salinidad inicial en el cultivo madre (15) a la salinidad experimental correspondiente, se realizaron cambios en pasos de un máximo de 5 unidades de salinidad cada 8 horas, como mínimo.

2.- Luego de 48 h de que todas las poblaciones hubieran alcanzado su salinidad final, se colectaron los huevos producidos a cada una de dichas salinidades y se colocaron en vasos de Bohemia de 1L conteniendo agua de la misma salinidad en la que fueron producidos. A partir de estos huevos se generaron nuevas poblaciones de edad sincronizada.

3.- Las poblaciones de edad sincronizada fueron mantenidas a salinidad constante durante la ontogenia, hasta el momento en que la mayoría de los individuos debería haber alcanzado el estadio de copepodito 1-2 (5 días y ½ después), cuando se colocaron en tanques de 10 L. Este procedimiento se repitió para una segunda cohorte generada a partir de una nueva tanda de huevos, con la diferencia que en este caso los organismos fueron mantenidos en vasos de bohemia de 1 L hasta el estadio de nauplios 2-3 (figura 2). Los copepoditos 1-2 y los nauplios 2-3 así obtenido fueron los organismos efectivamente utilizados para estimar las respuestas

de crecimiento durante el experimento. En el caso de la primer cohorte no se obtuvieron individuos en estadio juvenil (copepoditos) para la salinidad 30 (ver más adelante). Este procedimiento permitió asegurar que los individuos experimentales eran de la misma edad (dentro de cada categoría de desarrollo) y que estuvieron sometidos durante toda su vida (de hecho, desde la formación del huevo) a las mismas condiciones de salinidad. Los tiempos de desarrollo definidos para el presente trabajo se definieron en función del comportamiento conocido para la especie y las condiciones de alimento y temperatura utilizadas en nuestro experimento (Leandro et al. 2006, Rodríguez-Graña et al. 2008, Martínez et al. 2020). Los desvíos respecto al comportamiento esperado son atribuidos al efecto global de la salinidad durante el desarrollo. En la tabla 2, se muestran los diferentes pasos que se realizaron para la obtención de las poblaciones adaptadas.

Una vez alcanzada la edad y estadios requeridos se colectó una muestra de organismos de cada salinidad para determinar la condición inicial (i.e., tamaño, aproximadamente 50 individuos por salinidad en el caso de los nauplios, y de 30 en el caso de juveniles). Este se consideró el inicio del experimento propiamente dicho ($T = 0$). Las muestras fueron fijadas con tres gotas de lugol al 2%, etiquetadas y reservadas para su posterior análisis en el laboratorio de microscopía.

Tabla 2: Protocolo de aclimatación de largo plazo de las poblaciones experimentales a diferentes niveles de salinidad. La columna a la izquierda indica la etapa (correlativa) de cada actividad, la segunda columna indica el tiempo en relación al inicio de las incubaciones experimentales para estimar tasas de crecimiento (considerado $T=0$), la tercera columna incluye una descripción cualitativa de la actividad realizada y/o el resultado alcanzado.

Etapa	Tiempo	Actividades
1	-10	Se prepararon 60 L de agua a salinidad 30.
2	-9	Obtención de adultos a partir del cultivo madre (salinidad 15) mediante tamizado por 100 μ m. Los individuos se reservaron en un tanque de 10L a salinidad 15. Preparación de agua de mar con las salinidades objetivo: 2, 5, 10, 20 y 25 (15 L de cada tipo).
	+ 8 h	Se tamizó la totalidad del tanque salinidad 15; 2/5 partes se colocaron en el tanque salinidad 20 y las 3/5 partes restantes se colocaron en el tanque salinidad 10. Se agregó 300cc de alimento y un aireador a cada tanque.

3	-9	Se tamizó por 63 μm 7.5L del tanque salinidad 20 y se colocaron en salinidad 25. Se tamizó por 63 μm 10L del tanque salinidad 10 y se colocó en salinidad 5. Se agregaron 175 mL de alimento.
	+ 8 h	Se filtró la totalidad de salinidad 25 y se pasó a salinidad 30. Se filtró 7.5 L de salinidad 5 y se colocó en salinidad 2. Se agregó 170 mL de alimento a cada tanque. Todos los individuos quedaron en la salinidad objetivo.
4	-7	Se tamizó por 63 μm el fondo de cada tanque, para la obtención de huevos. Bajo lupa, se contabilizó una parte de la muestra, de aquí surgió un estimativo del total de huevos para cada salinidad. Se colocaron los huevos en vasos de Bohemia de 1 L a cada una de las salinidades objetivo. Se agregó alimento: 150 mL a los tanques y 10 mL a los vasos.
5	-4	Se verificó la existencia de nauplios bajo la lupa, en cada uno de los vasos, a partir de una pequeña muestra de cada salinidad. Se agregaron 5 mL de alimento a cada vaso.
6	-3	Se tamizó la totalidad de cada vaso y se realizó una observación cualitativa. Se agregó alimento, 5cc a los vasos y 150cc a los tanques.
7	-2	Se filtró el fondo de los tanques y se separaron los huevos para el cultivo de nauplios. Los huevos fueron colocados en vasos de Bohemia de 1 L y se les agregó 3 mL de alimento.
8	-1	Se colocaron tanques nuevos con 10 L de agua a cada una de las salinidades objetivo. Se tamizó por 63 μm cada uno de los vasos de Bohemia para obtención de juveniles, se observó bajo la lupa (se descarta muestra salinidad 30). Estos individuos se colocaron en los tanques nuevos, etiquetados "Juveniles". Se les agregó 116 mL de alimento. Se prepararon botellas (500 mL) y vasos de Bohemia a ser usados en la incubación (3 réplicas por salinidad) y se colocaron en las incubadoras a 20°C.
9	T0	Se cuantificó la concentración de <i>Rhodomonas</i> en los cultivos de algas y se agregó una cantidad equivalente a 500 $\mu\text{g C L}^{-1}$ a cada botella o vaso. Inicio del experimento.
10	Tfinal=T 2	Fin del experimento. Se colectaron los individuos de todos los recipientes experimentales preservando las muestras para su posterior análisis.



Fig. 2 Cohortes para la obtención de Copepoditos y Nauplios.

En T = 0, para las incubaciones se buscó colocar aproximadamente 25 individuos de cada salinidad (estadio copepodito) o 50 individuos (estadio nauplios) en botellas tipo Schott de 0.5L de capacidad, las cuales fueron mantenidas en cámaras de temperatura controlada a 20°C y sin luz (figura 3). En algunos casos los números de individuos incubados fueron menores debido a la insuficiencia de organismos disponibles. Se consideraron tres réplicas por condición experimental (estadio/ salinidad). En todos los casos el agua fue filtrada por 63 μm . Para la obtención de las hembras adultas, éstas se colectaron por tamizado (190 μm) de las poblaciones ya adaptadas a las salinidades experimentales. Para cada salinidad se obtuvieron 5 hembras las cuales fueron dispuestas en vasos de Bohemia de 1L cubiertos con papel de aluminio y colocadas en las mismas cámaras de cultivo. Durante todo el período los organismos experimentales fueron alimentados con el alga *Cryptophyta Rhodomonas sp. ad libitum*.

Luego de 48 h, se recuperaron los individuos en las botellas y vasos experimentales tamizando el contenido por una malla de 65 μm . Se determinó el estado vital (vivo/ muerto) de los individuos, y aquellos vivos fueron colocados en recipientes pequeños con tapa y fijados con tres gotas de lugol al 2%. Estas muestras fueron almacenadas en el laboratorio de microscopía, para su posterior análisis (fotografía y medición). Las muestras de salinidad 30 (Nauplios), presentaron aglomerados que se removieron en su mayoría, antes de la fijación.

Análisis de muestras:

En el laboratorio de microscopía, se observaron todas las muestras fijadas (iniciales y finales) bajo la lupa, se midió el largo (largo total en nauplios y prosoma en juveniles y adultos), y en el caso de las hembras adultas, se tomó la medida del diámetro de los huevos producidos. Se fotografió y se contabilizó la cantidad de individuos. Para este análisis de imágenes se utilizó el software libre Image J (Image J 1:51h, Wayne Rasband 2012). De aquí surgió la información necesaria para los distintos cálculos que se realizaron y para la obtención de los resultados.



Fig. 3 Incubadoras en las que se realizó el experimento y distribución de las muestras, dentro de las mismas.

Análisis de datos:

La biomasa inicial de nauplios y copepoditos (como microgramos de Carbono orgánico) se estimó a partir de las siguientes ecuaciones empíricas (Berggreen et al.1988)

$$B \mu\text{g C} = 10^{(3,319 \cdot \text{LOG}_{10}(\text{largo en } \mu\text{m}) - 8,519)} \text{ para nauplios, y}$$

$$B \mu\text{g C} = 10^{(2,919 \cdot \text{LOG}_{10}(\text{largo en } \mu\text{m}) - 7,953)}; \text{ para copepoditos,}$$

donde el largo se obtuvo de la medición en pixeles del largo de cada individuo y de su posterior conversión a μm de acuerdo a la calibración realizada. Para cada una de las salinidades se calculó la biomasa inicial (B_i) y final (B_f) promedio para cada réplica, las cuales fueron utilizadas para el cálculo del incremento de Biomasa absoluta y específica, y la tasa de crecimiento, G ($\mu\text{g C. d}^{-1}$) como $(B_f - B_i)/2$, donde 2 representa el período en días, sobre el cual se estimó el crecimiento.

El cálculo del incremento específico de B_{esp} (crecimiento específico) se obtuvo como G/B_i. Luego de obtenidos estos valores (estimaciones por réplica), se realizaron los promedios tanto del incremento de B, como del de B_{esp} para cada una de las salinidades (promedio de las réplicas).

En el caso de los adultos el incremento de biomasa se calculó como la suma de la biomasa de los huevos producidos, siendo la fórmula $B \mu\text{g C} = 0,114 \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot 10^{-6}$ donde r representa el radio de los huevos (Berggreen et al. 1988).

El crecimiento absoluto entre salinidades fue comparado mediante análisis de varianza simple (ANOVA), para cada estadio de desarrollo separadamente. El crecimiento biomasa-específico entre estadios y salinidades fue comparado mediante ANOVA de dos vías.

RESULTADOS

En la Tabla 3 se sintetizan las observaciones cualitativas acerca del crecimiento y desarrollo de los individuos en las diferentes poblaciones experimentales.

Tabla 3: Descripción cualitativa de las poblaciones experimentales, para los distintos estadios y salinidades. T 0 = muestra inicial al momento de la colecta. T final = muestra final, luego de 48h de incubación.

SAL	TIEMPO	NAUPLIOS	JUVENILES	ADULTOS
2	T0	Individuos pequeños y transparentes.	Individuos pequeños, activos y con comportamiento normal al escape.	Sin observaciones particulares.
	Tfinal	Igual condición que en T0, presencia de algunos huevos.	Igual a T0.(figura 4A)	Se observó presencia de huevos y algunos nauplios.
5	T0	Individuos de mayor tamaño que en [2] y con presencia de alimento.	Nauplios y muy pocos juveniles. Mayor movilidad que los de [2].	Sin observaciones particulares.
	Tfinal	Nauplios pequeños, pero algunos de tamaño muy superior.	Copepoditos (algunos de gran tamaño) y nauplios. (figura 4B)	Se observaron nauplios y huevos.
10	T0	Sin observaciones particulares.	Nauplios y algún juvenil.	Sin observaciones particulares.
	Tfinal	Nauplios y algún copepodito.	Mayoritariamente copepoditos y algún nauplio.	Nauplios y huevos (figuras 5 A y B)
20	T0	Sin observaciones particulares.	Amplia mayoría de nauplios y muy pocos copepoditos.	Sin observaciones particulares.
	Tfinal	Sin observaciones particulares.(figura 6 A)	Muchos copepoditos y algún nauplio.	Presencia de huevos y muy pocos nauplios.
30	T0	Sin observaciones particulares.	No se pudieron obtener individuos, ya que no maduraron al estadio y la colecta de huevos fue muy inferior a la de las otras salinidades.	Sin observaciones particulares.
	Tfinal	Nauplios en su totalidad. Presentaron una diferencia importante en el tamaño. (figura 6 B)		Se observaron nauplios y huevos. (se observaron aglomerados por réplica)

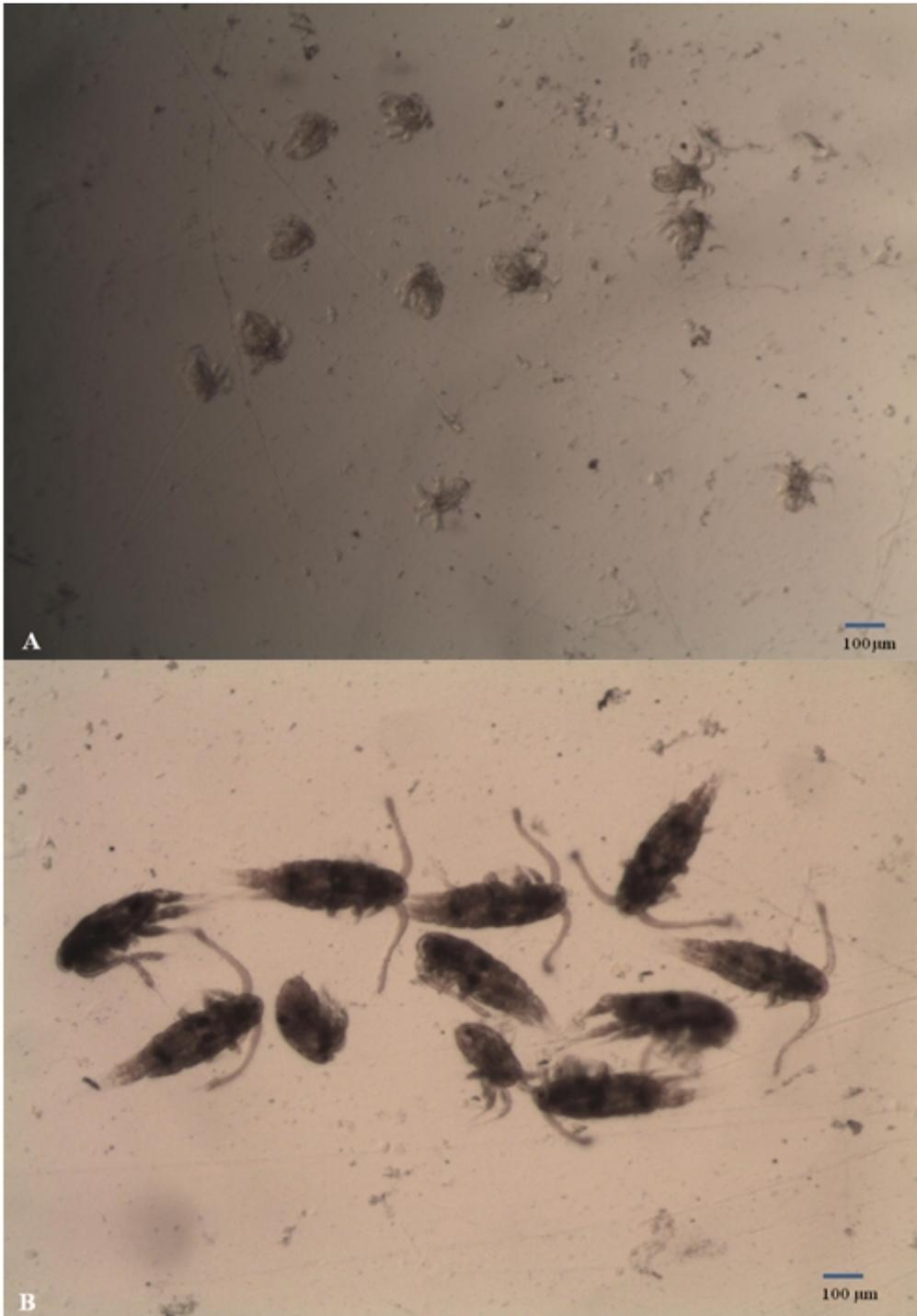


Fig. 4. Individuos de 9 días de edad utilizados en el experimento. **(A)** individuos correspondientes al tratamiento de salinidad 2 que no alcanzaron al estadio copepodito. **(B)** individuos correspondientes al tratamiento de salinidad 5 (mayoritariamente en estadio de copepodito). Aumento 5X.

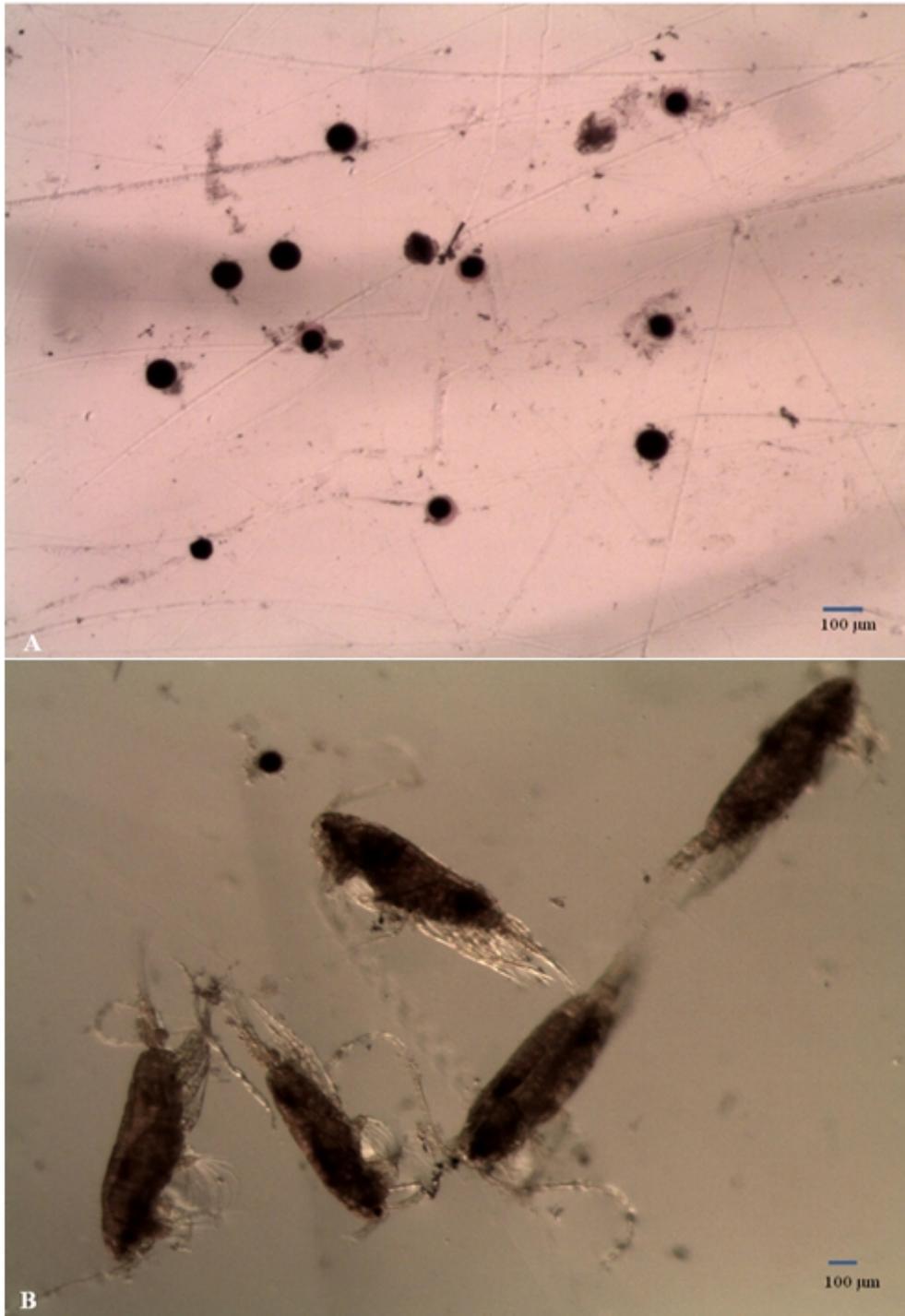


Fig. 5 Distintos estadios utilizados en el experimento correspondientes al tratamiento de salinidad 10. **(A)** huevos (aumento 5X), **(B)** adultos (aumento (4X)).

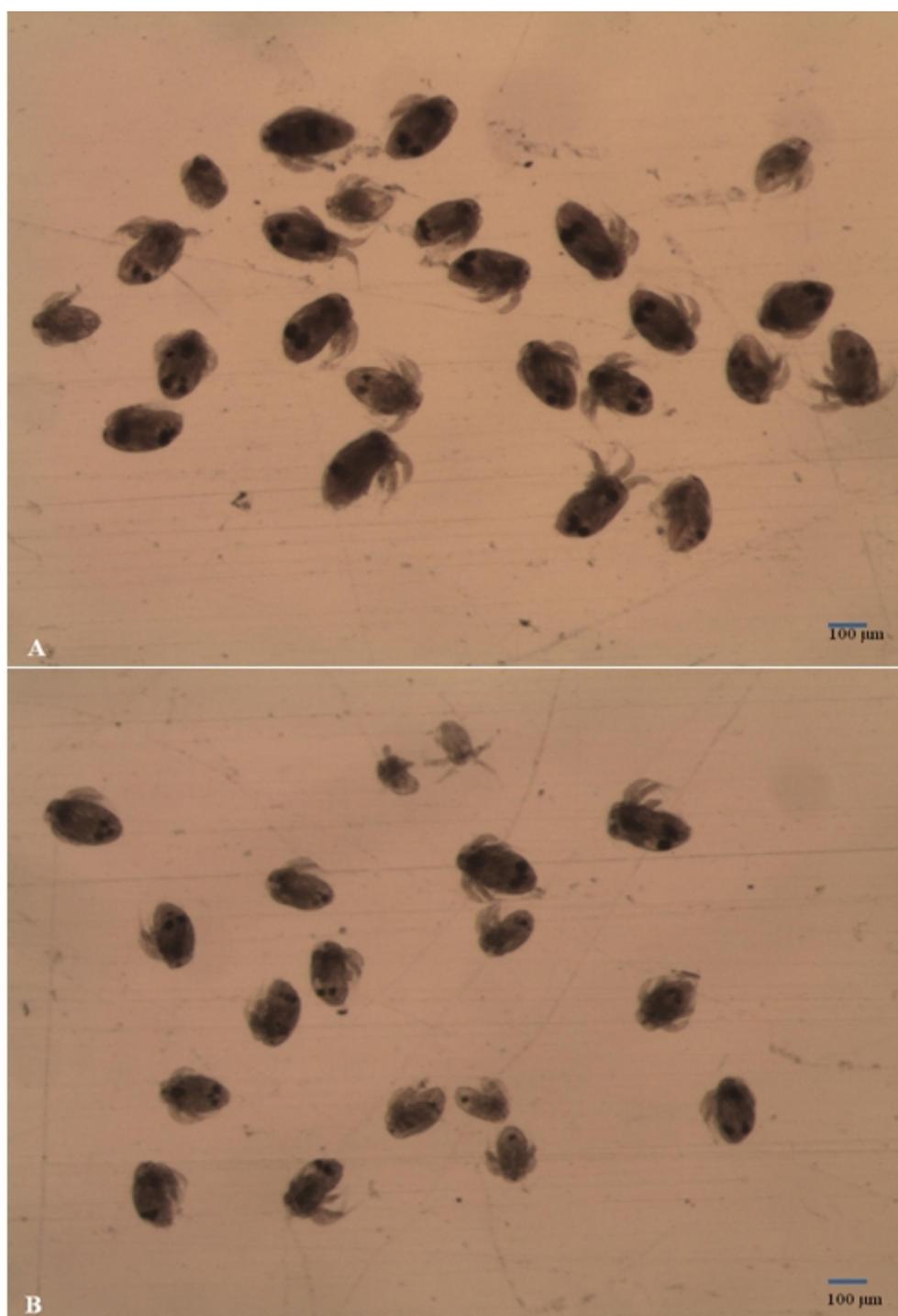


Fig.6 Individuos de 4 días de edad utilizados en el experimento. (A) individuos correspondientes al tratamiento de salinidad 20, en estadio nauplio. (B) individuos correspondientes al tratamiento de salinidad 30, en estadio nauplio. Aumento 5X.

Descripción cuantitativa de los resultados alcanzados:

Nauplios y copepoditos, mantuvieron cada uno de ellos patrones semejantes para el incremento del largo, biomasa y biomasa específica. En el caso de nauplios el incremento en el largo fue menor para salinidad 2 (promedio= $4.34 \mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$, $ds=1.094$) aumentando para 5, alcanzando su máximo en 10 ($38.75\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$, $ds= 5.098$), disminuyendo para los valores de 20 y 30 (figura 7A). En el caso del incremento de biomasa, se repite el mismo patrón, pero aquí el aumento para salinidad 2 fue mínimo ($0.003\mu\text{gC}\cdot\text{d}^{-1}$, $ds=0.0008$), aumentando hasta llegar a un máximo en 10 ($0.068\mu\text{gC}\cdot\text{d}^{-1}$, $ds=0.014$), volviendo a bajar en 20 y disminuyendo un poco más para el valor de salinidad 30 (figura 7B). En el caso del incremento de la biomasa específica, la gráfica sigue el mismo patrón descrito, pero con una leve modificación. El valor menor se dio para salinidad 2 (0.12d^{-1} , $ds=0.037$), aumentó en 5 y en 10 se dio el máximo (1.38d^{-1} , $ds=0.28$) pero disminuyó en 20 y luego se produjo un pequeño aumento en 30 y no una disminución como sucedió en las gráficas anteriores (figura 7C).

En copepoditos los incrementos en largo, biomasa y biomasa específica se dieron de menor a mayor salinidad (excepto para el tratamiento de salinidad 30, debido a lo expresado anteriormente). El largo incrementó entre 6.95 ($ds=3.17$) y $91.7\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$, ($ds=10.16$), mientras que el incremento de biomasa se dio entre 0.0028 ($ds=0.0015$) y $0.178 \mu\text{gC}\cdot\text{d}^{-1}$, ($ds=0.033$). Para el caso de biomasa específica el incremento fue de 0.15 ($ds=0.081$) a 2.39d^{-1} ($ds=0.302$), siempre entre las salinidades 2 y 20 respectivamente (figura 8 A, B y C).

Los adultos tuvieron un patrón similar para la producción de huevos, el incremento de biomasa y el de biomasa específica. El mismo consistió en un aumento desde el tratamiento de salinidad 2 a la 10, con una disminución a salinidad 20 (valores mayores al mínimo; pero menores al de las otras salinidades) y un máximo a salinidad 30. La producción de huevos tuvo un valor mínimo de 2.75 ($ds=0.544$) y un máximo de 14.7 huevos. $\text{h}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($ds=3.401$), mientras que los valores de biomasa fueron de 0.08 ($ds=0.015$) a $0.37\mu\text{gC}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($ds=0.088$) y los de biomasa específica fueron 0.037 ($ds=0.011$) a 0.177d^{-1} ($ds=0.02$) (mínimos y máximos, respectivamente; figura 9 A, B y C). Se registró una mortalidad en los adultos de 20% para el tratamiento con salinidad 2, también de 20% para salinidad 5, para la salinidad 10 fue de 33.3%, para 20 fue de 13.3% y no se registró mortalidad para la salinidad 30.

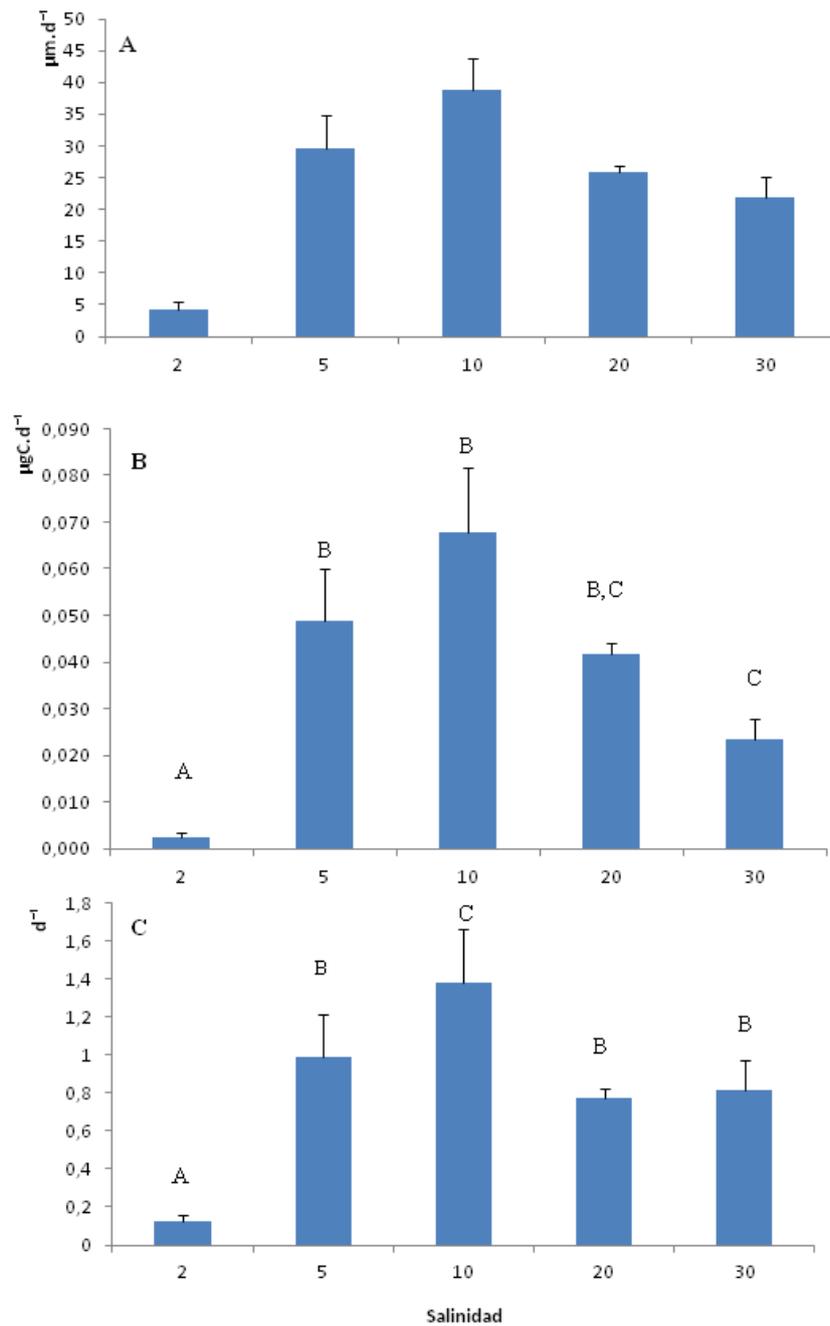


Fig.7 Crecimiento (promedio por día) estadio Nauplio en función a los distintos niveles de salinidad. **A** incremento en el largo ($\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$), **B** incremento de biomasa ($\mu\text{gC}\cdot\text{d}^{-1}$), **C** incremento de la biomasa específica (d^{-1}). En los gráficos B y C, las letras indican grupos estadísticamente homogéneos de acuerdo a comparaciones post-hoc (pruebas pareadas de Student).

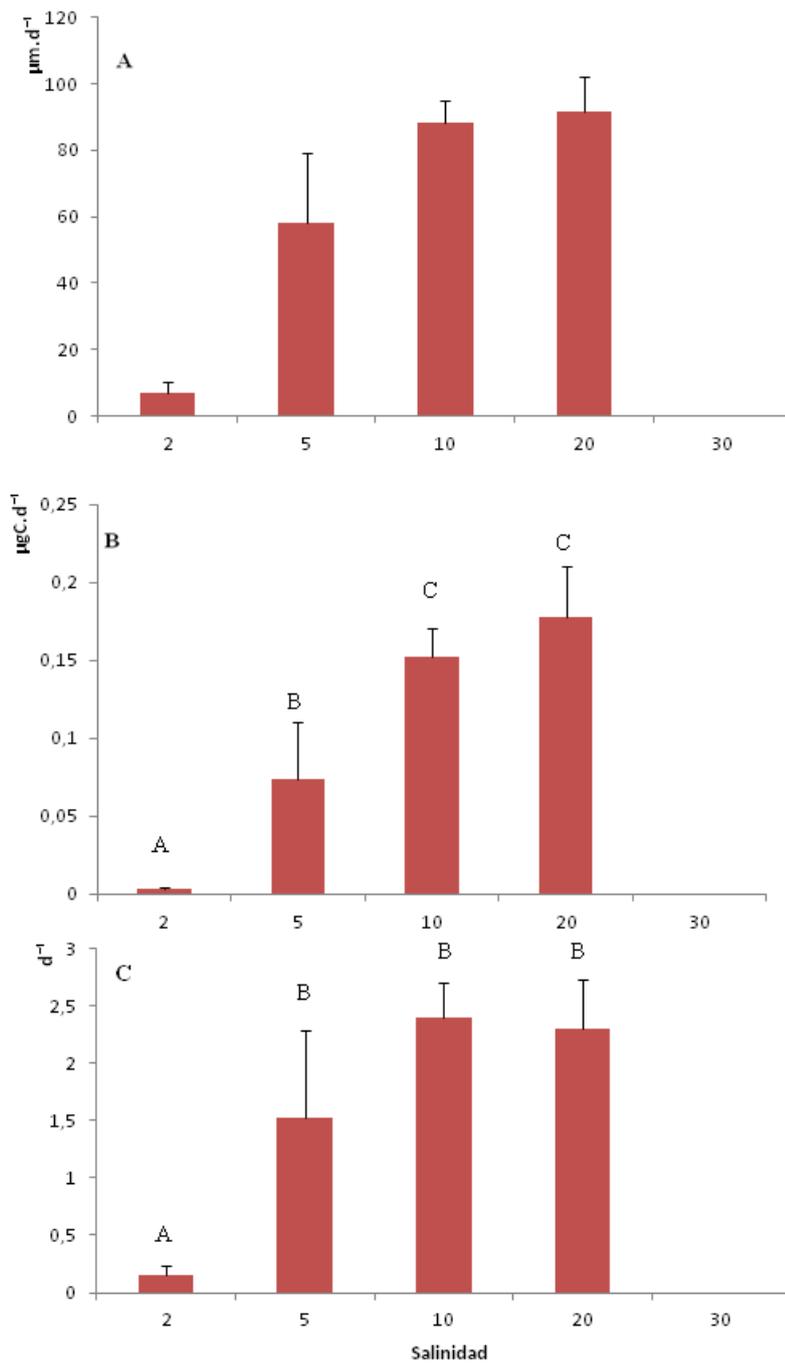


Fig.8 Crecimiento (promedio por día) estadio Copepodito en función a los distintos niveles de salinidad. **A** incremento en el largo ($\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$), **B** incremento de biomasa ($\mu\text{gC}\cdot\text{d}^{-1}$), **C** incremento de la biomasa específica (d^{-1}). En los gráficos B y C, las letras indican grupos estadísticamente homogéneos de acuerdo a comparaciones post-hoc (pruebas pareadas de Student).

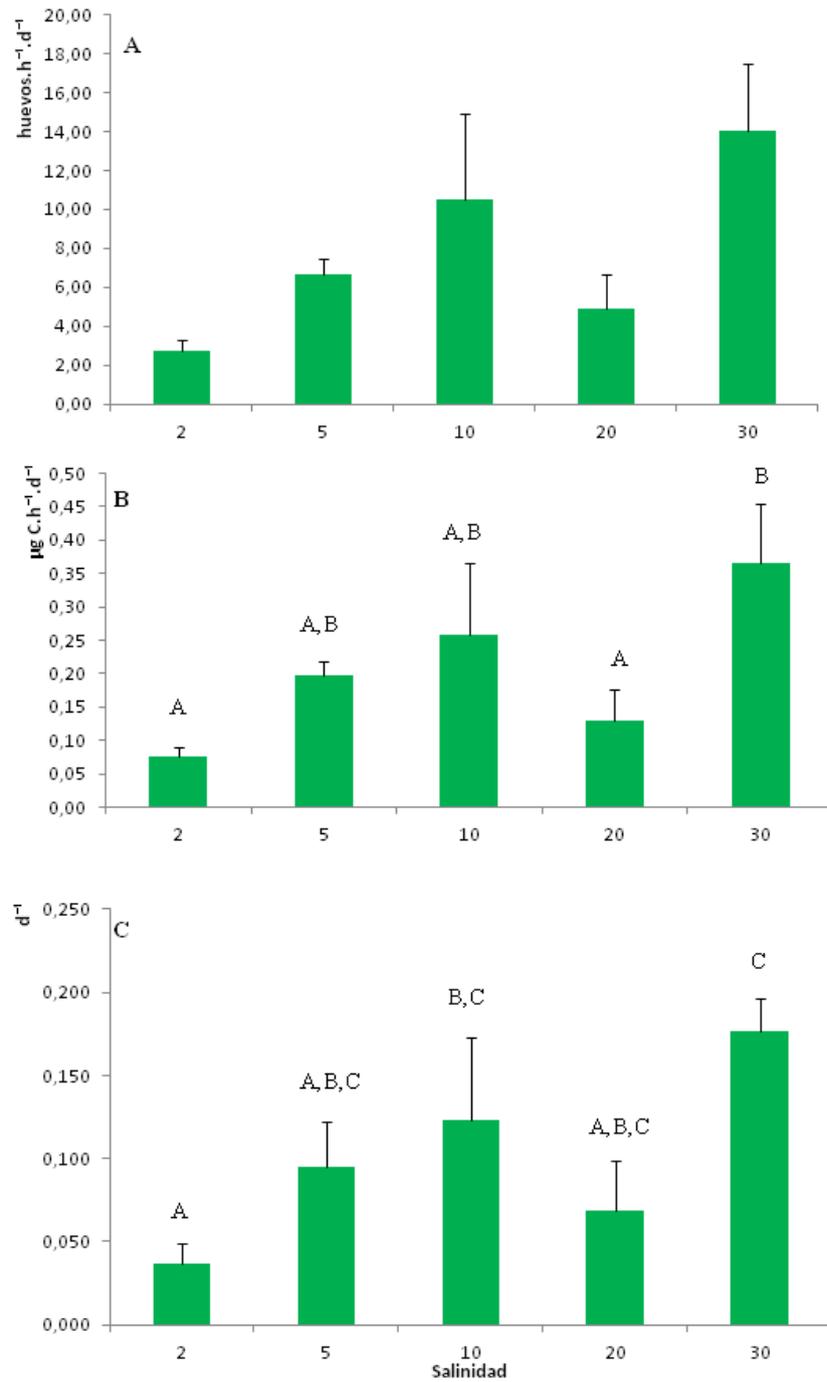


Fig.9 Estadío adultos (promedios por día) en función de la salinidad. **A** huevos por hembra (huevos.h⁻¹.d⁻¹), **B** incremento de la biomasa (µgC.d⁻¹), **C** incremento de la biomasa específica (d⁻¹). En los gráficos B y C, las letras indican grupos estadísticamente homogéneos de acuerdo a comparaciones post-hoc (pruebas pareadas de Student).

Análisis de crecimiento absoluto: separado por estadio

Para los tres estadios se evidencia un efecto significativo de la salinidad sobre la tasa de crecimiento absoluto (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados del análisis de varianza para la evaluación del efecto de la salinidad sobre el crecimiento absoluto ($\mu\text{g C}\cdot\text{d}^{-1}$) de los tres estadios de desarrollo de *Acartia tonsa* en condiciones experimentales. El crecimiento de las hembras adultas corresponde a la producción de biomasa en forma de tasa de producción de huevos GL: grados de libertad; F: estadístico F; p: valor de probabilidad.

NAUPLIOS			
Fuente variación	GL	F	P
<i>Salinidad</i>	4	26.84	<0.01
<i>Residuales</i>	10		
COPEPODITOS			
Fuente variación	GL	F	P
<i>Salinidad</i>	3	26.68	<0.01
<i>Residuales</i>	8		
ADULTOS			
Fuente variación	GL	F	P
<i>Salinidad</i>	4	8.92	<0.01
<i>Residuales</i>	10		

Análisis de crecimiento específico: salinidad, estadio e interacción

El crecimiento biomasa-específico cambió significativamente con la salinidad y con el estadio. También se evidenció una interacción significativa entre salinidad y estadio; esto quiere decir que el crecimiento específico cambió con la salinidad de manera diferente entre estadios (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados del análisis de varianza para la evaluación del efecto de la salinidad y del estadio de desarrollo (nauplio, copepodito y adulto) sobre el crecimiento específico (d^{-1}) de *Acartia tonsa* en condiciones experimentales. El crecimiento de las hembras adultas corresponde a la producción de biomasa en forma de tasa de producción de huevos GL: grados de libertad; F: estadístico F; p: valor de probabilidad.

Fuente variación	GL	F	P
<i>Salinidad</i>	4	26.274	<0.01
<i>Estadio</i>	2	96.93	<0.01
<i>Sal x Estadio</i>	7	9.73	<0.01
<i>Residuales</i>	28		

DISCUSIÓN:

La producción de huevos fue semejante a los resultados ya existentes en experimentos previos, como es el caso de los resultados publicados en Calliari et al 2006 para salinidades comprendidas entre 10 y 33, en el sentido de que se observó un crecimiento en la producción de menor a mayor salinidad, con la salvedad de que en este experimento se dio la menor producción a salinidad 20, 4.88 huevos. $h^{-1}.d^{-1}$, mientras que en bibliografía citada consta la mayor producción a esa salinidad con 27 huevos. $h^{-1}.d^{-1}$. Esto sugiere una diferencia con resultados de la bibliografía y con el patrón general a diferentes salinidades, en cuanto a que el valor observado de producción de huevos a salinidad 20, escapa a la tendencia que muestra el conjunto de datos. En base a la información disponible no resulta posible explicar el motivo de esa anomalía. También existió disminución notoria en la producción de huevos a

salinidades 2 y 5 con datos muy inferiores a los ya publicados.

En comparación con los resultados de Calliari et al 2004 (1,4 - 7,5 huevos.h⁻¹.d⁻¹), a salinidades semejantes 2, 5 y 10, los valores obtenidos en este trabajo son mayores (2,75; 6,69 y 10,46 huevos.h⁻¹.d⁻¹, para las salinidades 2,5 y 10 respectivamente). Sin embargo, debe considerarse que el trabajo de referencia fue de tipo observacional en un ambiente natural (Río de la Plata), donde seguramente actuaron distintas variables al mismo tiempo (salinidad, temperatura, cantidad y calidad de alimento, etc.).

Al comparar los datos con los obtenidos por Holste and Peck 2006, donde obtuvieron una producción de 24 huevos.h⁻¹.d⁻¹ para una concentración de sal de 18 y a 18°C, queda claro que la producción en éste trabajo es mucho menor. Sin embargo el trabajo citado concuerda con los datos registrados por Calliari et al. 2006, donde se registró también un máximo a salinidad 20.

Existió un crecimiento diferencial en los distintos estadios de desarrollo de *A. tonsa* en función de la salinidad experimentada como sugieren las figuras 7, 8 y 9 y resulta del ANOVA. En todos los casos se encontró que la respuesta de crecimiento, tanto absoluto como específico, fue mayor a salinidades intermedias, en el entorno de 10.

Los resultados siguen en general el patrón esperado ya que por ejemplo el rango óptimo de salinidad para el éxito reproductivo está entre 10 y 33 (Calliari et al.2006), con la excepción ya mencionada correspondiente a la salinidad 20.

Para todos los estadios se observó muy poca tolerancia a la salinidad 2, siendo esta la que registra los valores mínimos en todas las gráficas (excepción parcial para copepoditos a salinidad 30, donde no se pudo evaluar respuesta), lo que sugiere que *Acartia tonsa* tendría una mayor tolerancia a salinidades relativamente altas que a aquellas en el extremo inferior.

En términos de crecimiento específico, se dieron distintos patrones, según el estadio. En todos los casos el menor crecimiento se produjo a salinidad 2, siendo el de adultos el que registró el menor de todos, mientras que los valores para nauplios y copepoditos fueron muy similares. Luego se dio un aumento progresivo hasta salinidad 10 para todos los estadios, donde se obtuvieron los valores mayores para nauplios y copepoditos. El valor de nauplios es un poco mayor al registrado en adultos, pero el de copepoditos es notoriamente superior a ambos, lo que indicaría que éste estadio se adaptó mejor a esa salinidad que los dos restantes. En todos los estadios se registra una disminución a salinidad 20, siendo muy pequeña para copepoditos, pero muy pronunciada para el caso de nauplios y adultos. Finalmente se observó

un crecimiento menor en nauplios a salinidad 30, pero muy importante para adultos que registran su máximo a esta salinidad. Un dato que puede llegar a ser tenido en cuenta es el hecho de que en esta salinidad fue la única en la que se registró una mortalidad de 0% en los adultos. Si bien no es un dato que exista evidencia para mi conocimiento, podría ser interesante investigar su incidencia en el futuro. En el caso de copepoditos no existen datos a esta salinidad, pero el crecimiento específico registrado en este estadio para el resto de las salinidades, es notoriamente superior.

A pesar de la baja tolerancia a la salinidad 2 y a la inexistencia de copepoditos a salinidad 30, los presentes resultados dejan en evidencia la fuerte eurihalinidad de esta especie, en prácticamente todo su desarrollo ontogénico, permitiendo suponer que si el ambiente en el que la especie se encuentra, sufre alteraciones vinculadas a variabilidad climática, por ejemplo aumento de precipitaciones con una disminución de la salinidad, *A. tonsa* sería capaz de soportar cambios dentro de un rango relativamente amplio, y mantener así su rol dentro de la red trófica.

Un aspecto interesante a explorar en futuros trabajos en función de los resultados derivados de este experimento es la comparación del crecimiento a distintos niveles de salinidad de individuos adaptados en el largo plazo (toda su ontogenia) vs. otros adaptados por cortos períodos de tiempo (por ejemplo, horas), en ambos casos utilizando individuos provenientes de una misma población. Las comparaciones que se pueden hacer actualmente en función de la información disponible están basadas en experimentos realizados con poblaciones de orígenes geográficos diferentes, que podrían presentar diferencias genéticas relacionadas a los niveles de salinidad experimentadas por cada población en tiempos aún mas prolongados, de tipo evolutivo. Ello permitiría dilucidar si el período de adaptación tiene un efecto importante sobre el crecimiento a diferentes salinidades.

BIBLIOGRAFÍA:

- Berggreen U, Hansen B, Kiorboe T (1988) Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar Biol* 99: 341-352
- Calliari D, Britos A, Conde D (2009) Testing the relationship between primary production and *Acartia tonsa* grazing pressure in an estuarine lagoon. *J Plankton Res*, 31: 1045-1058
- Calliari D, Cervetto G & Castiglioni R (2004) Summertime herbivory and egg production by *Acartia tonsa* at the Montevideo Coast-Río de la Plata. *OPHELIA* 58 (2): 115-128
- Calliari D, Marc Andrsen C, Thor P, Gorokhova E, Tiselius P (2006) Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co-occurring copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi* in different ways. *Mar Ecol Prog Ser* 312: 177-188
- Hirst A, Lampitt R (1998) Towards a global model of in situ weight-specific growth in marine planktonic copepods. *Mar Biol* 132:247-257
- Holste L, Peck M (2006) The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Mar Biol* 148:1061-1070
- Jaume D, Conradi M, López-González P (2004) Capítulo 18 Copépodos. En: Barrientos J, Curso Práctico de Entomología, Instituto Mediterráneo de estudios Avanzados, Dep. de Fisiología y Zoología, Universidad de Sevilla. 303-331
- Kenji Miyashita L, De Melo Júnior M, Lopes R (2009) Estuarine and oceanic influences on copepod abundance and production of a subtropical coastal area. *J Plankton Res*, 31: 815-826
- Mauchline J (1998) The biology of Calanoid Copepods, ELSEVIER 001-709.
- Leandro S, Queiroga H, Laura Rodríguez-Graña L, Tiselius P (2006) Temperature-dependent development and somatic growth in two allopatric populations of *Acartia clausi* (Copepoda: Calanoida) *Mar Ecol Prog Ser* 322: 189-197
- Martínez M, Rodríguez-Graña L, Santos L, Denicola A, Calliari D (2020) Long-term exposure to salinity variations induces protein carbonylation in the copepod *Acartia tonsa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 526, DOI: 10.1016/j.jembe.2020.151337

- Medellín-Mora J & Escribano R (2013) Análisis automático de zooplancton utilizando imágenes digitalizadas: estado del conocimiento y perspectivas en Latinoamérica. *Lat .Am. J. Aquat. Res.*,41 (1),29-41
- Rodríguez-Graña L, Calliari D, Conde D, Sellanes J, Urrutia J (2008) Food web of a SW Atlantic shallow coastal lagoon: spatial environmental variability does not impose substantial changes in the trophic structure. *Mar Ecol Prog Ser* 362:69-83
- Rodríguez-Graña L , Calliari D, Tiselius P, Winding Hansen B , Nilsson Sköld H (2010) Gender-specific ageing and non-Mendelian inheritance of oxidative damage in marine copepods. *Mar Ecol Prog Ser* 401: 1–13

ANEXO: Protocolo detallado de aclimatación.

DIA 1: Se colectó un número grande de individuos del cultivo ya existente (S=15), filtrando 20 L de cultivo por un tamiz de 100 μm ; de esos 20L se tamizaron 10L por 63 μm , para la obtención de agua libre de individuos (agua limpia). Los individuos retenidos en esta última filtración fueron devueltos a los tanques originales del laboratorio, al igual que el agua excedente. En los 10 L de agua limpia, se colocaron los organismos tamizados por 100 μm y se etiquetó S=15 ADULTOS, estos individuos fueron alimentados ad libitum con cultivo de *Rhodomonas sp.* en crecimiento exponencial.

También se prepararon las siguientes diluciones: 2, 5, 10, 20 y 25 (15 y 30 ya se tenían), para lo cual se partió de distintos volúmenes de agua con salinidad 22 y 30 y de agua declorada para completar los 15L necesarios para cada tanque. Luego de varias horas se controlaron las salinidades de los tanques y se corrigió las que fueron necesarias. Por otra parte se tamizó por 63 μm la totalidad del tanque de S=15 y 2/5 partes fueron para el tanque S=20, mientras que las otras 3/5 partes fueron para el tanque S=10. A cada tanque se le agregó una concentración de 300cc de algas y se les colocó un aireador que al oxigenar producía un burbujeo de intensidad leve.

DIA 3: En la mañana se continuó con la aclimatación y se tamizó por 63 μm , 7.5L del tanque S=20 y estos individuos fueron colocados en el tanque S=25; también se filtró por 63 μm , 10L del agua del tanque S=10, cuyos individuos pasaron a S=5 (en ambos casos el agua filtrada fue devuelta al tanque original). A cada tanque se le agregó una concentración de alimento de 175cc. En la tarde se continuó con la aclimatación y se filtró la totalidad del tanque S=25, colocándolo en el tanque de S=30 y se filtró la mitad del contenido del tanque S=5 (7.5L) y se pasaron al tanque de S=2. En todos los casos se agregó una concentración de alimento de 170cc. Aquí se terminó de colocar los individuos en las salinidades objetivo, (figura 10).

DIA 4: Se preparó 3L de agua a cada salinidad, para ser utilizada en las pizetas, vasos de Bohemia, etc. Se filtró por 63 μm el fondo de cada tanque y bajo la lupa se separaron y contabilizaron los huevos. Éstos fueron colocados en vasos de Bohemia etiquetados, con 1L de agua a la salinidad adecuada; el resto de agua con los individuos fue devuelto a los tanques originales.

S=30 Huevos: 110 en 4ml = 110 /4 ml, sacados de 200ml.

Total aprox. = 5500 huevos.

S=20 Se obtuvieron muchos huevos y por lo tanto no se contabilizaron.

S=10 Huevos: 194 en 4ml = 194/4ml, sacados de 200ml.

Total aprox. = 9700 huevos.

S= 5 Huevos: 133 en 4ml = 133/4ml, sacados de 200ml.

Total aprox. = 6650 huevos.

S= 2 Huevos: 56 en 4ml = 56/4ml, sacados de 200ml.

Total aprox. = 2800 huevos.

A cada vaso de Bohemia se le agregó una concentración de alimento de 10cc y a los tanques de 15L, se le agregó 150cc de alimento.

Los vasos de Bohemia fueron colocados y dejados para su posterior eclosión en una mesada del laboratorio, con su respectivo cartel identificatorio, que decía CULTIVO DE JUVENILES, *Acartia tonsa* y la fecha. También se chequeó la salinidad de los tanques y se corrigió cuando fue necesario. Esta actividad quedó finalizada a las 18:40hs (17/2).

DIA 5: Dos días y medio después se verificó la existencia de nauplios en cada uno de los vasos, mediante la observación bajo la lupa de una pequeña muestra (20ml) y se agregó 5ml de alimento a cada uno de ellos. Para las distintas salinidades, lo observado fue lo siguiente:

S=30 existencia de muy pocos nauplios (aprox.15) con presencia de alimento.

S=20 existencia de muchos nauplios, también con presencia de alimento.

S=10 existencia de muchos nauplios, pero en menor cantidad que S=20. Muy pequeños y no se detecta presencia de alimento.

S=5 existencia de nauplios muy pequeños, un copepodito muerto, con presencia de

alimento. S=2 existencia de nauplios muy pequeños, un copepodito muerto. No se detecta alimento.

Esta actividad quedó finalizada a las 11:20hs (20/2).

DIA 6: Al día siguiente se tamizó la totalidad de los vasos y lo observado fue lo siguiente:

S=30 nauplios grandes con alimento.

S=20 nauplios grandes con limento.

S=10 nauplios, mayor densidad.

S= 5 nauplios, menor densidad y presencia de aglomerados.

S=2 nauplios, menor densidad y presencia de aglomerados.

Se les agregó 5mL de alimento a cada vaso y 150mL a los tanques. Esta actividad quedó finalizada a la hora 10 (21/2). También se prepararon 8L de agua de cada una de las salinidades objetivo, para su posterior uso (las mismas dieron un margen de error promedio, entre la salinidad objetivo y la realmente medida de 3%)

DIA 7: Se filtró el fondo de los tanques por 63 μm , bajo la lupa se separaron los huevos que van a ser cultivados para la obtención de nauplios. Los huevos recolectados fueron colocados en vasos de Bohemia con 1L de agua a la salinidad adecuada y se le agregó 3ml de alimento a cada uno. Luego fueron dejados en la mesada junto con los del cultivo de juveniles, ambos debidamente etiquetados.

DIA 8: Se prepararon 10L de agua de cada una de las salinidades con las que se estuvo trabajando y se colocó en tanques nuevos, junto con los individuos que habían sido cultivados en primera instancia en los vasos de Bohemia, para la obtención de juveniles. Para eso la totalidad del volumen de los vasos fue filtrado por 63 μm y analizado bajo la lupa, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

S=30 NADA se descarta la muestra

S=20 nauplios grandes y copepoditos pequeños (pocos)

S=10 nauplios grandes, no hay copepoditos

S=5 nauplios y un copepodito

S=2 nauplios muy pequeños y un copepodito macho

A cada tanque nuevo se le agregó una concentración de 116ml de alimento y se etiquetó con la salinidad adecuada y la palabra "JUVENILES".

Este día también se prepararon las botellas (500ml) que iban a ser usadas para la incubación a las distintas salinidades de nauplios y juveniles y los vasos de Bohemia (1L), para la incubación de los adultos, figura 11. De cada salinidad y estadio se realizaron tres réplicas, donde cada una de ellas fue dejada en una incubadora diferente, para de esta manera obtener igualdad de condiciones para todas las muestras (ej. réplica 1, incubadora 1, réplica 2, incubadora 2 y así sucesivamente con todas las muestras) y estar a la temperatura necesaria para el experimento, 20°C.

DIA 9: se realizó una dilución de 5ml de *Rhodomonas* en 45ml de agua a salinidad 30 (dilución 1/100) y se analizó 1ml de la dilución en un analizador de partículas, para saber los mg de C que se le van a agregar a cada una de las botellas y a los vasos del experimento. De la dilución surgió que en 1ml de muestra habían 8961 partículas de entre 6-10.7 μm (es decir 896100 en el total de la muestra). El tamaño modal fue: 7.64 μm . Cada botella de incubación lleva aproximadamente 620ml de agua y se les agregó 11.5ml de alimento, mientras que a los vasos con 1L de agua se les agregó 18.5ml de alimento.

Al final del anexo se presenta una foto del laboratorio de microscopía que muestra cómo eran analizadas y fotografiadas las muestras, para su posterior medición (figura 12).



Fig. 10. Todos los individuos colocados en la salinidad objetivo.



Fig.11 Preparado de las botellas para la posterior incubación.



Fig. 12 Laboratorio de microscopía. Análisis de una de las muestras.