

Caracterización de la tolerancia térmica en los estadios nauplio y metanauplio de
Artemia salina, Linnaeus, 1758 (Anostraca: Artemiidae)

Geraldine Andrea Carvajalino Ramos

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Sergio Andrés Marchant Rojas

PhD. Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

A mi director de trabajo de grado, Sergio Andrés Marchant Rojas, y a las profesoras Leidy Pico Martínez y Nathaly Díaz por su orientación y paciencia durante este proceso de aprendizaje.

A mis padres Alfredo y Argenis, por su apoyo y amor incondicional; y a mi hermana Indira por su comprensión y alegría.

A mi amiga Juliana por la amistad y los gratos momentos, y a Arturo por la compañía y el afecto.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	9
1. Objetivos	13
1.1. Objetivo General	13
1.2. Objetivos Específicos	13
2. Competencias	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Descapsulación, eclosión de quistes y mantenimiento de larvas en laboratorio.....	15
3.2. Caracterización de la respuesta aguda	16
3.3. Análisis estadístico.....	18
4. Resultados	19
4.1 Respuesta aguda.....	19
4.2. Comparaciones de LT_{50}	21
5. Discusión.....	23
6. Conclusión	26
Referencias Bibliográficas	28

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Promedio de temperatura letal para el 50% de la muestra (LT_{50}) a partir de replicas experimentales en el estadio nauplio luego de 2h de exposición a tres temperaturas de aclimatación (25°C, 30°C Y 34°C), (σ) = desviación estándar. Sombreado en gris oscuro se señalan las réplicas descartadas por contaminación.	19
Tabla 2. Promedio de temperatura letal para el 50% de la muestra (LT_{50}) a partir de replicas experimentales en el estadio metanauplio luego de 2h de exposición a tres temperaturas de aclimatación (25°C, 30°C Y 34°C), (σ) = desviación estándar. Sombreado en gris oscuro se señalan las réplicas descartadas por contaminación.	20
Tabla 3. Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para determinar el efecto del estadio y la aclimatación sobre la tolerancia térmica (LT_{50}) de las larvas. gl: Grados de libertad, SC: suma de cuadrados, F: razón f, P: valor p	21

Lista de Figuras

- Figura 1. Equipo empleado para la generación del gradiente térmico. (a) Baños de circulación de agua marca LAUDA Alpha RA12 conectados a bloque de aluminio. (b) Bloque de aluminio cargado con muestras. Cada columna corresponde a una temperatura diferente del gradiente. El equipo permite evaluar 12 temperaturas con 6 réplicas..... 17
- Figura 2. Comparación de los límites de tolerancia térmica (LT_{50}) para dos estadios del desarrollo larval en *Artemia salina* bajo temperatura de aclimatación de 25°C, 30°C y 34°C. (a) datos del estadio Nauplio, (b) datos del estadio metanauplio. Los puntos demarcados con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) utilizando una prueba Tukey HSD post hoc. La desviación estándar (σ) se presenta en color rojo22

Resumen

Título: Caracterización de la tolerancia térmica en los estadios nauplio y metanauplio de *Artemia salina*, Linnaeus, 1758 (Anostraca: Artemiidae)*

Autor: Carvajalino-Ramos, Geraldine Andrea**

Palabras Clave: Tolerancia térmica, LT₅₀, aclimatación, temperatura, nauplio, metanauplio, cambio climático.

Descripción:

Las primeras etapas del desarrollo larvario representan un período crítico en el ciclo de vida de muchas especies de invertebrados acuáticos con un papel ecológico crucial en el equilibrio de los sistemas tróficos y pelágicos. A pesar de su importancia, los estudios de fisiología que evalúan los efectos del cambio climático en la supervivencia y distribución de las especies se han realizado principalmente en individuos adultos y no en etapas tempranas de desarrollo. Debido a esto, esta pasantía de investigación se llevó a cabo para crear y desarrollar las habilidades prácticas requeridas para estudiar la tolerancia térmica en las etapas de nauplio y metanauplio del camarón de salmuera (*Artemia salina*), una especie modelo ampliamente estudiada en acuicultura y toxicología. La tolerancia térmica de *Artemia salina* se evaluó en dos etapas de desarrollo, nauplio y metanauplio. Los quistes se criaron a tres temperaturas de aclimatación (25 °C, 30 °C y 34 °C) hasta que se desarrollaron larvas de nauplios y metanauplios. La temperatura letal media (LT₅₀) se determinó en cada tratamiento después de una exposición de dos horas a una temperatura de choque agudo entre 16 °C y 63 °C, después de una recuperación de una hora. Las temperaturas agudas se generaron con la ayuda de dos baños termales circulantes conectados en lados opuestos de un bloque de aluminio. Las larvas nauplios aclimatadas a 34 °C fueron significativamente más tolerantes a una temperatura más alta (LT₅₀ = 43,0 °C) que las larvas de nauplios aclimatadas a 25 °C y 30 °C. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la tolerancia térmica en la etapa de metanauplio. Estos resultados sugieren una respuesta de plasticidad más significativa en las larvas de nauplios que en las larvas de metanauplios, lo que podría estar asociado con un suministro adecuado de energía todavía presente en la yema de la larva de nauplios, que se pierde durante el desarrollo de la larva de metanauplios. Aunque este estudio representa un buen enfoque para evaluar cómo la temperatura de aclimatación puede afectar la supervivencia de las primeras etapas de desarrollo en *Artemia salina*, los estudios futuros deberían evaluar más a fondo el efecto de la disponibilidad de alimentos durante el desarrollo sobre la tolerancia térmica. La experimentación en condiciones controladas puede mejorar la comprensión de la dinámica de las especies ante escenarios de cambio climático.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Sergio Andres Marchant Rojas. Ph.D.

Abstract

Title: Characterization of thermal tolerance in the nauplius and metanauplius stages of *Artemia salina*, Linnaeus, 1758 (Anostraca: Artemiidae)*

Author(s): Carvajalino-Ramos, Geraldine Andrea **

Key Words: Thermal tolerance, LT₅₀, acclimation, temperature, nauplius, metanauplius, climate change.

Description: The early stages in larval development represent a critical period in the life cycle of many aquatic invertebrate species with a crucial ecological role in the balance of trophic and pelagic systems. Despite its importance, physiology studies evaluating climate change's effects on species survival and distribution have primarily been performed in adult individuals rather than in early developmental stages. Due to this, this research internship was carried out to create and develop practical skills required for studying thermal tolerance in nauplius and metanauplius stages of brine shrimp (*Artemia salina*), a model species widely studied in aquaculture and toxicology. *Artemia salina* thermal tolerance was evaluated in two developmental stages, nauplius and metanauplius. Cysts were reared at three acclimatization temperatures (25°C, 30°C, and 34°C) until nauplius and metanauplius larvae were developed. The mean lethal temperature (LT₅₀) was determined at each treatment after a two-hour exposure to acute shock temperatures between 16°C and 63°C, after a one h recovery. The acute temperatures were generated with the help of two circulating thermal baths connected on opposite sides of an aluminum block. Nauplius larvae acclimated to 34°C were significantly more tolerant to a higher temperature (LT₅₀ = 43.0°C) than nauplius larvae acclimated to 25°C and 30°C. However, no significant differences in thermal tolerance were detected in the metanauplius stage. These results suggest a more significant plasticity response in nauplii larvae than in metanauplii larvae, which could be associated with an adequate supply of energy still present in the nauplii larva yolk, which is lost during the development of the metanauplii larva. Although this study represents a good approach to evaluating how acclimatization temperature can affect the survival of early developmental stages in *Artemia salina*, future studies should further evaluate the effect of food availability during development on thermal tolerance. Experimentation under controlled conditions may improve the understanding of the dynamics of species in the face of climate change scenarios.

* Degree Work

** Faculty of Sciences. School of Biology. Director: Sergio Andres Marchant Rojas. PhD.

Introducción

El incremento en la temperatura global representa una amenaza a la biodiversidad afectando a los organismos en un amplio rango de niveles, incluyendo funciones proteicas, fluidez de la membrana celular, metabolismo y desarrollo (Long y Daly, 2017). En la última década el incremento de la temperatura se ha acelerado y se estima que para finales del siglo XXI la temperatura superficial aumente en 1,5°C (IPCC, 2019) generando un incremento en el nivel medio global oceánico por el derretimiento de los glaciares continentales y la capa de hielo ártico (Sánchez et al., 2020). Estos cambios ambientales promueven la reorganización poblacional de las especies; alterando la funcionalidad de los ecosistemas y sus servicios, principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Barlow et al., 2018).

Los ecosistemas acuáticos representan una base importante en los sectores ambientales y económicos de las costas tropicales. Aproximadamente 1.300 millones de personas se ven beneficiadas por la pesquería y la acuicultura como fuentes de proteína (Lam et al., 2020). Debido a la importancia de estos ecosistemas, muchos estudios han evaluado los efectos de la temperatura sobre la fauna marina. Sin embargo, utilizando principal y casi exclusivamente los esfuerzos en el estudio de individuos adultos, y siendo aun limitada la información sobre los efectos del cambio climático en estadios tempranos de especies acuáticas, particularmente en invertebrados marinos (Long y Daly, 2017; Rebolledo y Collin, 2018).

La mayoría de los invertebrados marinos comparten en sus estadios tempranos la característica de una larva planctónica. Esta puede llegar a estar en la columna de agua desde horas hasta meses antes de su paso a la etapa juvenil; por lo que se ven expuestas a factores de estrés del

cambio climático en un periodo crítico dentro del ciclo de vida al ser más susceptibles a fluctuaciones en la temperatura (Foo y Byrne, 2016), influenciando desde sus tasas metabólicas hasta su distribución. Adicionalmente, se ha observado que un incremento en la temperatura hace que las larvas atraviesen tiempos de desarrollo acelerados que puede representar una disminución en el tiempo de estadía en la columna de agua, afectando no solo sus características fenotípicas si no también su capacidad de dispersión. Esto último es de gran importancia en los ecosistemas acuáticos, debido al rol ecológico de las larvas en el equilibrio de los sistemas tróficos en ambientes pelágicos (Barría et al., 2005).

Las cuatro respuestas principales de las poblaciones frente al cambio climático son la microevolución/adaptación, cambios en la distribución, la extinción y la aclimatización (Foo y Byrne, 2016). En este proyecto se desarrolló una pasantía de investigación centrada en el estudio de la aclimatización, que se puede definir como el ajuste fisiológico de los individuos a un entorno nuevo y que describe la plasticidad fenotípica de una especie, la cual puede proveer una potencial resiliencia a periodos cortos de estrés, si se produce una compensación térmica y el fenotipo no afecta negativamente las tasas fisiológicas (Foo y Byrne, 2016; Seebacher et al., 2015).

El estudio de estadios tempranos del ciclo de vida de los organismos es importante porque corresponden a las etapas a las que en primera instancia se ven afectadas por factores externos y son las que moldean los juveniles o adultos a futuro. Debido a esto, estudiar como la aclimatización influye en estadios larvales permite contribuir con una visión de la dinámica de las especies a largo plazo en escenarios de cambio climático.

El estudio del efecto de la temperatura sobre los organismos puede ser realizado con una variedad de técnicas y métodos diferentes como el análisis de cambios morfológicos, la síntesis proteica asociada a estrés térmico, la estimación de las tasas de mortalidad, el cambio de la tasa de

consumo oxígeno o tasa metabólica entre otros (Barría et al., 2005; Demirkalp y Saygi, 2002; Sung et al., 2008). Sin embargo, en muchos casos, el estudio fisiológico de algunas especies es inviable debido a que pueden presentar dificultades en la cría de larvas en condiciones de laboratorio, reflejándose en su susceptibilidad, número de descendientes, periodos de desarrollo, costos de mantenimiento e intervalo de tiempo requerido entre experimentos; siendo una solución a esta problemática, el uso de organismos modelos, que son especies con un mantenimiento económico, ciclos de vida rápidos y descendientes numerosos (Michael et al., 1956). Un modelo de estudio adecuado para larvas de invertebrados acuáticos corresponde al camarón de salmuera (*Artemia salina*) un crustáceo perteneciente al género *Artemia*. Esta especie cuenta con un amplio rango de distribución encontrándose en lagunas costeras, lagos salados y salinas, y en general en todos los ambientes hipersalinos costeros (Abatzopoulos et al., 2002; Crespo, 2016). Su ciclo de vida consta de dos estadios larvales, nauplio y metanauplio, diferenciados entre sí por la presencia de toracópodos en metanauplios; y un estadio pre-adulto o juvenil donde se presenta desarrollo de genitales y comienzo de la manifestación del dimorfismo sexual, y un adulto. Las larvas pueden originarse de líneas partenogénicas o bisexuales de forma vivípara, vivípara lecitotrófica y ovípara (quistes), siendo estos últimos originados bajo condiciones adversas y altamente resistentes a los ambientes hostiles (Castro et al., 2009; Gajardo y Beardmore, 2012). Los quistes son fáciles de transportar y se pueden almacenar inclusive por años. *Artemia salina* es una especie ampliamente utilizada como alimento vivo en la dieta de peces y mariscos comerciales por sus valores nutricionales, su implementación en estudios fisiológicos como sujetos de prueba frente a ensayos de toxicidad ha crecido, debido a su sensibilidad, pero también resiliencia a un amplio rango de componentes (Michael et al., 1956). Adicionalmente, debido a que *Artemia salina* tolera salinidades de hasta 300‰ y entornos deficientes de oxígeno, esta es una especie adecuada para

observar el efecto de factores experimentales como la temperatura, sin interferencias al ser estables frente a otros factores de estrés (Dumitrascu, 2011). Aunque existen estudios fisiológicos realizados con *Artemia salina*, no existen estudios del efecto de la temperatura de aclimatación de estadios larvales en la tolerancia térmica en esta especie. Los estudios que abordan tolerancia térmica para el género incluye a *Artemia franciscana*, en la cual se caracterizó a nivel molecular el efecto de la temperatura en la síntesis de proteínas de choque térmico y su relación a diversos compuestos y bacterias patógenas para la especie (Junprung et al., 2021; Liqing et al., 2022).

Debido a que la larva nauplio planctónica es un estadio compartido por muchos grupos de crustáceos y la larva más característica de este grupo (Brusca y Brusca, 2005), caracterizar la tolerancia térmica en estos estadios permitirá comprender mejor el comportamiento de larvas de invertebrados acuáticos frente al calentamiento global. En el marco de este proyecto, la pasantía de investigación está enfocada a un ejercicio para la asimilación y destreza en metodologías que permitan caracterizar la tolerancia térmica en invertebrados acuáticos, evaluando el efecto del estado de desarrollo y la aclimatación en la tolerancia térmica del organismo modelo *Artemia salina* en condiciones de laboratorio.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Caracterizar la tolerancia térmica del estadio nauplio y metanauplio del camarón de salmuera, *Artemia salina* en respuesta aguda a choque térmico.

1.2. Objetivos Específicos

Determinar el efecto de la temperatura de exposición en la respuesta aguda a choque térmico del estadio nauplio y metanauplio de *Artemia salina*.

Determinar el efecto de la aclimatación a tres temperaturas en la respuesta aguda a choque térmico de los estadios nauplio y metanauplio en *Artemia salina*.

2. Competencias

Adquiere destrezas y emplea técnicas para el establecimiento y mantenimiento de larvas de *Artemia salina* en cautiverio.

Adquiere habilidades para el desarrollo de experimentos que evalúan la tolerancia térmica mediante LT_{50} utilizando larvas de *Artemia salina* en diferentes estados de desarrollo.

Aplica análisis estadísticos para estimar y comparar parámetros fisiológicos relacionados con la tolerancia térmica e interpreta de manera adecuada los resultados.

Elabora correctamente informes concisos y con rigor científico.

3. Materiales y métodos

3.1. Descapsulación, eclosión de quistes y mantenimiento de larvas en laboratorio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de docencia para fisiología animal de la escuela de Biología en la Universidad Industrial de Santander. En primera instancia se hidrató un gramo de quistes de *Artemia salina* (Brine shrimp direct Inc., USA) durante dos horas mediante incubación en una caja Petri con agua salina a una concentración de 35 ‰ y temperatura ambiente; posteriormente se transfirieron los quistes a una solución de hipoclorito al 5% para una desinfección y disolución del corion durante 15 min, para luego realizar lavados con agua corriente sobre una red de malla y la remoción del hipoclorito. Los quistes fueron luego transferidos a un contenedor de plástico (capacidad de un litro) con agua salina a una concentración de 35 ‰ oxigenado por medio de una bomba de oxígeno. Los tratamientos de aclimatación fueron establecidos utilizando una incubadora ajustadas a su respectiva temperatura de aclimatación (25°C, 30°C y 34°C) utilizando un protocolo modificado de Sorgeloos et al. (1986). La eclosión de las larvas se revisó durante las siguientes 24h, ya que en algunos caso se aceleró al incrementar la temperatura (Demirkalp y Saygı, 2002) por lo que fue necesario una revisión alrededor de 18h de incubación en los tratamientos de aclimataciones de 30°C y 34°C.

Posterior a la eclosión, se realizó la separación de los nauplios eclosionados y posteriores metanauplios con la ayuda de una linterna. Los estadios nauplios y metanauplios tienen fototaxis positiva por lo que se ven atraídos a las fuentes de luz (Hatsuzawa et al., 2013). Para evitar la manipulación excesiva de las larvas, la recolección de las larvas se hizo con ayuda de una pipeta Pasteur plástica. La clasificación de los estadios permitió además el cambio en el agua del

contenedor, lo cual evito la influencia de la descomposición de materia orgánica y permitió un desarrollo adecuado de las larvas al siguiente estadio de estudio.

. El estadio metanauplio a diferencia del estadio nauplio no cuenta con reservas de vitelo y es un filtrador no selectivo (Sorgeloos et al., 1986), por lo que se implementó una alimentación con un gramo de *Arthospira platensis* (espirulina) siguiendo la recomendación de la marca comercial donde se adquirieron los quistes (Brine shrimp direct Inc., USA).

La diferenciación entre nauplios y metanauplios se observó en el desarrollo de toracópodos, disminución significativa del vitelo y desarrollo del aparato digestivo (Abatzopoulos et al., 2002; Guevara y Lodeiros, 2003).

3.2. Caracterización de la respuesta aguda

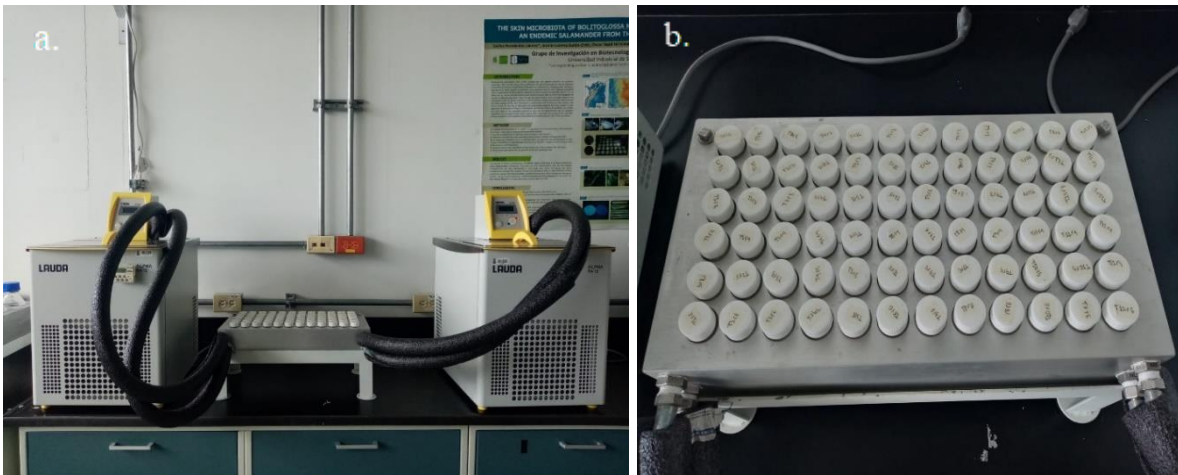
Para caracterizar la respuesta aguda a choque térmico (estrés térmico por cambios en la temperatura ambiental) se utilizó un gradiente térmico (Figura 1) creado a partir del uso de dos baños de circulación conectados en lados opuestos de un bloque de aluminio. El gradiente permitió la evaluación simultánea de 12 temperaturas de choque (16°C, 20°C, 24°C, 29°C, 33°C, 36°C, 41°C, 45°C, 49°C, 53°C, 58°C y 63°C) utilizando 3 réplicas biológicas. El gradiente posee espacio para ubicar 72 viales de 30 ml para el desarrollo de los experimentos. Para asegurarse que las temperaturas en el bloque eran las adecuadas para los ensayos, se midió y registró la temperatura del agua en los viales con ayuda de un termómetro digital luego de dos horas de estabilización del equipo. Esta medición se realizó en los 72 viales del gradiente. Para evitar fluctuaciones bruscas en el gradiente, este se mantuvo completamente cargado durante todo el tiempo de estabilización y ensayos experimentales.

Para dar inicio al experimento se adicionaron 5 larvas del estadio y temperatura de aclimatación a examinar en cada vial. Para cada experimento se utilizaron 180 larvas (12

temperaturas x 3 réplicas x 5 individuos). Para prevenir mortalidad por choque térmico entre temperaturas muy diferentes, el montaje de las muestras en el bloque se realizó iniciando en la posición de la temperatura de aclimatación, para luego, después de 10 minutos, realizar el desplazamiento de los viales a la siguiente temperatura y reemplazo de las muestras inicialmente cargadas hasta llenar todos los espacios del gradiente. Después de dos horas de exposición y 1 hora de recuperación a la temperatura de aclimatación, se registraron los individuos vivos y muertos de cada vial de manera similar a lo realizado por Walther et al. (2013).

Figura 1

Equipo empleado para la generación del gradiente térmico. (a) Baños de circulación de agua marca LAUDA Alpha RA12 conectados a bloque de aluminio. (b) Bloque de aluminio cargado con muestras. Cada columna corresponde a una temperatura diferente del gradiente. El equipo permite evaluar 12 temperaturas con 6 réplicas.



3.3. Análisis estadístico

La tolerancia térmica se estimó mediante el cálculo de LT_{50} (temperatura en la que el 50% de las larvas están muertas) utilizando el software estadístico JMP 16.2.0 (JMP, 1980) estimando la función de regresión logística sobre los datos de respuesta, que en este caso correspondió a una variable binaria (vivo/muerto) para cada temperatura de tratamiento (aclimatación a 25°C, 30°C y 34°C) (Hammond y Hofmann, 2010; Rebolledo y Collin, 2018).

Para comprobar el ajuste de los datos de LT_{50} a una distribución normal, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk. Para determinar si existen diferencias significativas que relacionen la temperatura experimental, la temperatura de aclimatación y el estadio larval respecto a la mortalidad, se realizó un análisis de varianza factorial (ANOVA) comparando las medias de LT_{50} estimadas por aclimatación y estadio de desarrollo, siguiendo la metodología descrita por Collin y Chan (2016) y Mendes y Cruz (2017). Al detectar diferencias significativas entre tratamientos, se realizó una prueba post hoc Tukey HSD para determinar diferencias entre grupos de aclimatación y estadios utilizando un valor de significancia de $\alpha=0,05$ para los dos análisis (Miller et al., 2013).

4. Resultados

4.1. Respuesta aguda

4.1.1. Nauplios

Se observó el LT_{50} más alto ($43.01^{\circ}C$) para la aclimatación de $34^{\circ}C$ en comparación con aclimataciones de $25^{\circ}C$ y $30^{\circ}C$ con LT_{50} de $39,02^{\circ}C$ y $38,97^{\circ}C$ respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1

Promedio de temperatura letal para el 50% de la muestra (LT_{50}) a partir de replicas experimentales en el estadio nauplio luego de 2h de exposición a tres temperaturas de aclimatación ($25^{\circ}C$, $30^{\circ}C$ y $34^{\circ}C$). (σ)= desviación estándar. Sombreado en gris oscuro se señalan las réplicas descartadas por contaminación.

Aclimatación	Experimento	LT_{50}
25°C		
	2	39,04
	3	38,99
Promedio		39,02
(σ)		0,04
30°C	1	38,89
	2	39,04
	3	38,94
Promedio		38,96
(σ)		0,08
34°C	1	42,94
	2	43,09
	3	42,99
Promedio		43,01
(σ)		0,08

4.1.2. Metanauplios

El LT_{50} estimado para las tres aclimataciones (25°C, 30°C y 34°C) se conservó dentro de intervalos cercanos 38,88°C, 38,96°C y 38,73°C) (Tabla 2).

Tabla 2

Promedio de temperatura letal para el 50% de la muestra (LT_{50}) a partir de réplicas experimentales en el estadio metanauplio luego de 2h de exposición a tres temperaturas de aclimatación (25°C, 30°C Y 34°C). (σ)= desviación estándar. Sombreado en gris oscuro se señalan las réplicas descartadas por contaminación.

Aclimatación	Experimento	LT_{50}
25°C		
	2	38,85
	3	38,89
Promedio		38,87
(σ)		0,03
30°C	1	38,89
	2	39,04
	3	38,94
Promedio		38,96
(σ)		0,07
34°C	1	38,94
	2	38,59
	3	38,64
Promedio		38,73
(σ)		0.19

4.2. Comparaciones de LT_{50}

4.2.1. Prueba de los efectos

El estadio de desarrollo (ANOVA de dos vías, $p < 0,0001$) y la temperatura de aclimatación (ANOVA de dos vías, $p < 0,0001$) tienen un efecto significativo sobre la temperatura letal media (LT_{50}) en la especie *Artemia salina*, y existe una interacción significativa entre el estadio y la aclimatación (ANOVA de dos vías, $p < 0,0001$) (Tabla 3). La temperatura letal media sigue valores similares para los estadios nauplio y metanauplio en aclimataciones de 25°C y 30°C, con un incremento significativo únicamente en nauplios para una temperatura de aclimatación de 34°C. (Tukey HSD, $p < 0,0001$ en ambas comparaciones) (Figura 2a). La LT_{50} calculada para el estadio metanauplio no presentó diferencias significativas (Tukey HSD, $p > 0.05$) en ninguna de las tres aclimataciones (25°C, 30°C Y 34°C) (Figura 2b).

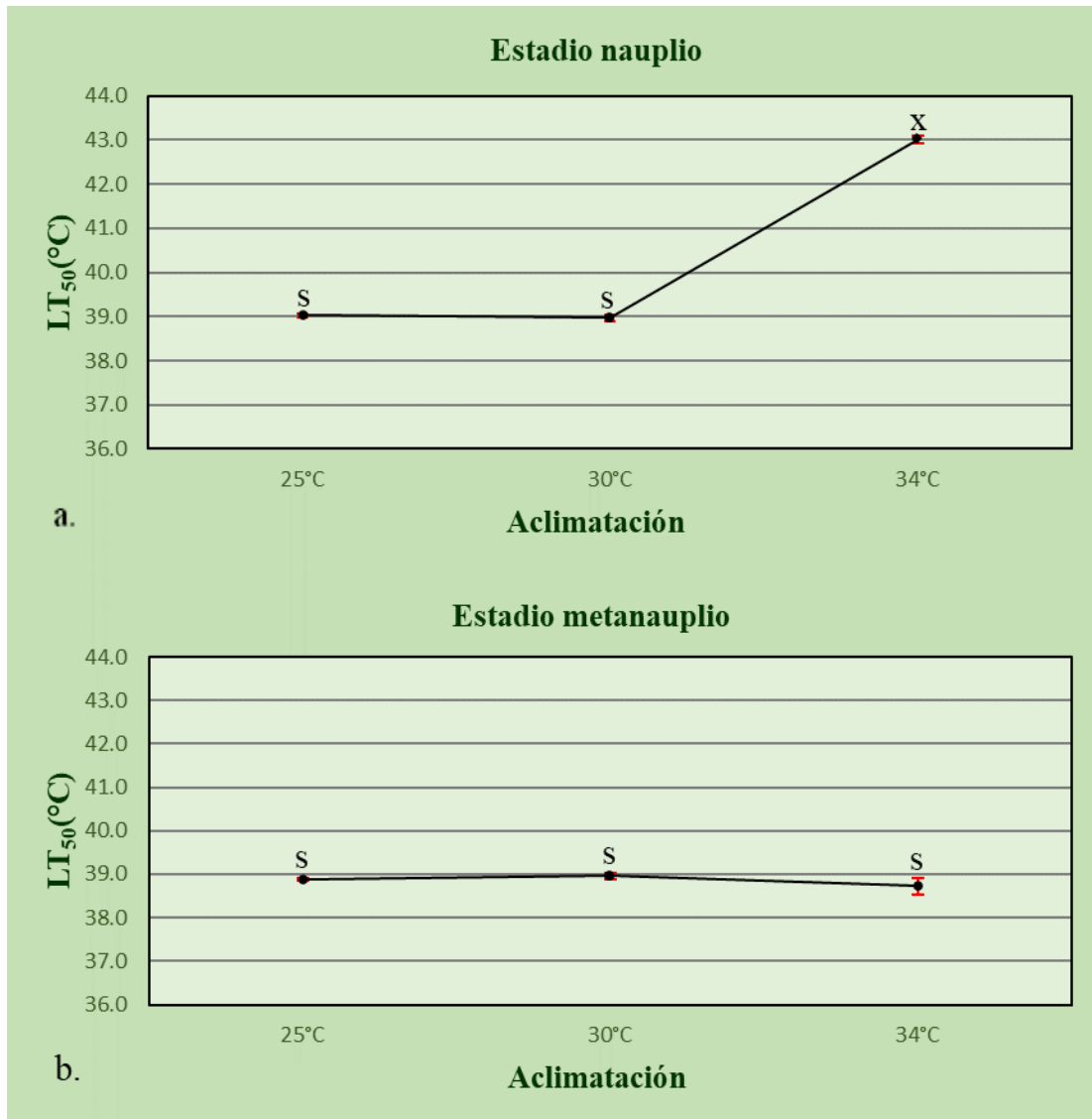
Tabla 3

Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para determinar el efecto del estadio y la aclimatación sobre la tolerancia térmica (LT_{50}) de las larvas. gl: Grados de libertad, SC: suma de cuadrados, F: razón f, P: valor p.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadio	1	9,024186	913,6773	<0,0001
Aclimatación	2	14,108484	714,2251	<0,0001
Estadio*Aclimatación	2	17,173362	869,3809	<0,0001

Figura 2

Comparación de los límites de tolerancia térmica (LT_{50}) para dos estadios del desarrollo larval en *Artemia salina* bajo temperatura de aclimatación de 25°C, 30°C y 34°C. (a) datos del estadio Nauplio, (b) datos del estadio metanauplio. Los puntos demarcados con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$) utilizando una prueba Tukey HSD post hoc. La desviación estándar (σ) se presenta en color rojo.



5. Discusión

En este trabajo se evidenció una mayor aclimatación y tolerancia térmica a choque agudo en *Artemia salina* para el estadio nauplio que en el estadio metanauplio. Esto concuerda con estudios realizados alrededor de los patrones de respuesta térmica para larvas de crustáceo donde se establece que la tolerancia térmica decrece a medida que incrementa la complejidad de los organismos (Dempster y Sommerfeld, 1998). Para nuestro conocimiento, *Artemia salina* no cuenta con estudios previos en la evaluación de tolerancia térmica en estadios tempranos, siendo los únicos estudios aproximados a esta temática aquellos que están enfocados en el estudio de proteínas de choque térmico en *Artemia franciscana* en etapa adulta, y en asociación con otro tipo de factores externos, como el estrés osmótico y la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Junprung et al., 2021; Liqing et al., 2022). Sin embargo, en otros grupos de invertebrados marinos se ha reportado un patrón similar al identificado en este estudio utilizando *Artemia salina*. En larvas en etapa de desarrollo con cuatro brazos del erizo de mar *Lytechinus variegatus* se caracterizó la respuesta aguda para un rango de temperaturas entre los 28°C y los 36°C observándose un cambio o plasticidad del LT_{50} para larvas aclimatadas a 29°C ($LT_{50} = 34.1^\circ\text{C}$) (Collin y Chan, 2016). De igual forma para el cangrejo *Petrolisthes manimaculis* se observó una tolerancia termal significativamente alta para larvas zoea I en comparación con la etapa juvenil, observándose además un cambio significativo en la tasa de consumo de oxígeno (Miller et al., 2013). Por último, en un análisis que evaluó la tolerancia térmica de juveniles y adultos de 4 especies, *Laternula elliptica* (molusco bivalvo), *Cucumaria georgiana* (pepino de mar), *Sterechinus neumayeri* (erizo de mar) y *Odontaster validus* (estrella de mar), se demostró que los juveniles de las cuatro especies en general alcanzaron un mejor desempeño en comparación con

adultos frente a tasas lentas de calentamiento, identificándose como posibles causas a una reducción en la eficacia aeróbica en adultos (Peck et al., 2013).

Existen diversos factores asociados a las diferencias en la capacidad de aclimatización en invertebrados acuáticos. En crustáceos, el estadio nauplio cuenta con una reserva de vitelo por lo que el gasto energético estaría dirigido al costo de la metamorfosis. Sin embargo, luego de su transición a metanauplio el gasto energético incrementa, y la larva debe suplir sus necesidades metabólicas por medio de la captación de alimento y seguir su metamorfosis a pre-adulto (Guevara y Lodeiros, 2003; Miller et al., 2014). La capacidad de aclimatización también estaría ligada a la disminución en el tiempo de desarrollo. La eclosión de quistes en aclimataciones de 30°C y 34°C se produjo en un periodo de entre 18h y 20h. Esta disminución sobre el tiempo de desarrollo está registrada en la literatura para otras larvas poiquilothermas (ectotérmicas) donde la alza en la temperatura disminuye el tiempo de desarrollo y posteriormente se traduce en una alta mortalidad (Barría et al., 2005). Por lo que juntos, el efecto de la carga metabólica, demanda energética y la disminución en el tiempo de desarrollo en este estudio puede en cierta medida explicar la alta plasticidad de los nauplios a una aclimatación de 34°C con un LT_{50} aproximado a 43°C en contraste con la disminución del LT_{50} en el estadio metanauplio a la misma aclimatación con una temperatura de 38,7°C. Varios estudios que analizan la respuesta de aclimatización a largo plazo y que emplean ectotérmicos marinos han demostrado que los factores mencionados anteriormente tienen como consecuencias cambios en la fisiología de las especies. En los últimos 20 años de cambio climático se ha observado un incremento del 20% en las tasas fisiológicas, por lo que en general se pueden establecer dos escenarios; el primero con una compensación termal a partir de cambios en la tasa fisiológica y como resultado un mejor desempeño en determinados ambientes, mientras la segunda respuesta es la no compensación termal y por lo tanto este incremento en las

tasas fisiológicas generaría un efecto negativo aditivo comprometiendo el correcto funcionamiento de los organismos a largo plazo (Foo y Byrne, 2016; Seebacher et al., 2015).

En cuanto a la respuesta frente a una aclimatación de 30°C y 25°C no se evidenciaron diferencias marcadas entre estadios, sin embargo, los límites de temperatura letal para esta especie se ha descrito alrededor de los 37°C y 38°C en condiciones de temperatura óptimas de aclimatación (28°C) (Dumitrascu, 2011), por lo que este resultado no es atípico teniendo en cuenta la diferencia de 2,5°C en los dos extremos del optimo con aumento aproximado de un grado centígrado para la temperatura media letal (39.0°C) para los dos estadios.

La realización de estudios que determinen el LT_{50} en estadios tempranos es una herramienta útil que permite predecir el comportamiento de las especies a largo plazo, teniendo en cuenta que la capacidad de aclimatización de los organismos varía entre especie e incluso entre poblaciones debido a las diferencias ambientales o de historias de vida. Las poblaciones marinas ectotérmicas que habitan mares polares y tropicales han demostrado una menor capacidad de aclimatación en comparación con especies que habitan sitios templados debido a que experimentan fluctuaciones mínimas en su temperatura, durante el año se presenta una variación entre 1°C y 3°C en la temperatura del mar (Peck et al., 2010), por lo que es esperado que la respuesta general frente a un choque térmico agudo no mostrará rangos elevados de temperatura en comparación con especies de zonas templadas como *Evechinus chloroticus*, una especie de erizo de mar que cuando colectados en la temporada de verano a una temperatura de 20.4°C tienen un LT_{50} entre rangos de 29°C y 30°C (Delorme et al., 2020). En especies que habitan climas no templados se ha señalado que especies que habitan ambientes como el océano Antártico fueron sometidos a un aislamiento geográfico y temperaturas constantes por lo que son más susceptibles que las especies de zonas tropicales debido a la pérdida de genes relacionados con mecanismos de respuesta frente

al incremento de la temperatura, es decir frente a un escenario de cambio climático son los principales afectados (Peck et al., 2010; Somero, 2010).

Continuar con estudios en la especie *Artemia salina* establece un panorama que puede permitir la descripción de la base genética y fisiológica de la aclimatación. Estos mecanismos son importantes para entender mejor el comportamiento de especies susceptibles al cambio climático, teniendo en cuenta su rango de distribución, su fácil mantenimiento y sus estadios larvales compartidos con un amplio rango de especies. Algunos esfuerzos en esta línea de investigación incluyen estudios relacionados con proteínas de choque térmico para la especie *Artemia franciscana* (Junprung et al., 2021; Liqing et al., 2022) que podrían utilizarse como una referencia para analizar el efecto de estas proteínas sobre *Artemia salina* cambiando el enfoque a factores como la temperatura de exposición y el estadio a modo de un estudio complementario desde la biología molecular que permita entender los cambios ocurridos a este nivel en la especie.

6. Conclusión

Se establece la temperatura de aclimatación como un factor influyente en la tolerancia térmica del estadio de desarrollo nauplio de *Artemia salina*. La larva nauplio de la especie presenta una respuesta de plasticidad a nivel fisiológico mayor que el estadio metanauplio con un LT_{50} de $43^{\circ}C$, esto relacionado a los suministros almacenados como vitelo en esta etapa del desarrollo los cuales son agotados al término de esta. Teniendo en cuenta los límites térmicos obtenidos en este proyecto, se sugiere para estudios posteriores una reducción en el límite superior del gradiente térmico, de manera que los baños térmicos utilizados puedan generar un gradiente con intervalos más estrechos de temperatura y observar de forma más minuciosa los cambios en el LT_{50} .

Asimismo, la inclusión del efecto cruzado de la temperatura en relación con otros factores, tales como la disponibilidad de nutrientes durante el desarrollo de la especie para observar más a detalle la interacción sobre la tolerancia térmica de los organismos. El estudio con este tipo de metodología es eficiente y con un bajo error entre replicas con una variación térmica entre réplicas mínimas. Al no existir información relacionada a la tolerancia térmicas en etapas tempranas de *Artemia salina*, este estudio representa un primer acercamiento a la dinámica termal temprana de la especie y una guía para el establecimiento de nuevos proyectos asociados a la dinámica termal temprana en otras especies frente a escenarios de cambio climático.

Referencias Bibliográficas

- Abatzopoulos, T. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S., y Sorgeloos, P. (2002). *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer Netherlands.
- Barlow, J., França, F., Gardner, T. A., Hicks, C. C., Lennox, G. D., Berenguer, E., Castello, L., Economo, E. P., Ferreira, J., Guénard, B., Gontijo Leal, C., Isaac, V., Lees, A. C., Parr, C. L., Wilson, S. K., Young, P. J., y Graham, N. A. J. (2018). The future of hyperdiverse tropical ecosystems. *Nature*, 559(7715), 517–526. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0301-1>
- Barría, E. M., Jara, C. G., y Paschke, K. A. (2005). La temperatura como factor de variabilidad en el desarrollo y morfología de larvas zoeas de *Acanthocyclus hassleri* Rathbun (Decapoda, Brachyura, Ateleyclidae) cultivadas en laboratorio. *Investigaciones Marinas*, 33(1), 25–41. <https://doi.org/10.4067/s0717-71782005000100002>
- Castro, J., Castro, T., Arredondo, J., Hernández, L., Castro, G., De Lara, A., y Dosta, M. (2009). La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. *Universidad Autónoma de México*, 73, 5–15.
- Collin, R., y Chan, K. Y. K. (2016). The sea urchin *Lytechinus variegatus* lives close to the upper thermal limit for early development in a tropical lagoon. *Ecology and Evolution*, 6(16), 5623–5634. <https://doi.org/10.1002/ece3.2317>
- Crespo, J. E. (2016). *Biogeografía y taxonomía del género Artemia (Crustacea, Anostraca) en Chile: Una revisión. January 2002.*
- Delorme, N. J., Frost, E. J., y Sewell, M. A. (2020). Effect of acclimation on thermal limits and hsp70 gene expression of the New Zealand sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 250(May),

110806. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110806>

Demirkalp, F. Y., y Saygı, Y. (Basbug). (2002). Effects Of Temperature On Survival And Growth Of *Artemia* From Tuz Lake, Turkey. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*.
<https://doi.org/10.46989/001c.20319>

Dempster, T. A., y Sommerfeld, M. R. (1998). effects of environmental conditions on larval growth and development. *Journal of Phycology*, 34(4), 712–721.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340712.x>

Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. *Balneo Research Journal*, 2(4), 119–122.
<https://doi.org/10.12680/balneo.2011.1022>

Foo, S. A., y Byrne, M. (2016). Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. En *Advances in Marine Biology* (1a ed., Vol. 74). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.06.001>

Gajardo, G. M., y Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: Adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology*, 3 JUN. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185>

Guevara, M., y Lodeiros, C. (2003). Composición bioquímica de nauplios y metanauplios de *Artemia sp.* (Crustacea, Anostraca) proveniente de la salina artificial de Araya, nororiente de Venezuela Biochemical composition of nauplii and metanauplii of *Artemia sp.* (Crustacea, Anostraca) from the. En *Ciencias Marinas* (Vol. 29, Número 4B).

Hammond, L. T. M., y Hofmann, G. E. (2010). Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: Mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine Biology*, 157(12), 2677–2687.
<https://doi.org/10.1007/s00227-010-1528-z>

Hatsuzawa, T., Michishita, K., y Yanagida, Y. (2013). A reciprocating linear actuator driven by

- anti-phototaxis of plankton. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 201, 316–320.
<https://doi.org/10.1016/j.sna.2013.07.016>
- IPCC. (2019). Informe Especial sobre los Impactos del Calentamiento global de 1,5 °C. En *Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*.
www.environmentalgraphiti.org
- Junprung, W., Supungul, P., Tassanakajon, A., Van Stappen, G., y Bossier, P. (2021). Balancing selection at the ATP binding site of heat shock cognate 70 (HSC70) contributes to increased thermotolerance in *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 531(October 2020), 735988.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735988>
- Lam, V. W. Y., Allison, E. H., Bell, J. D., Blythe, J., Cheung, W. W. L., Frölicher, T. L., Gasalla, M. A., y Sumaila, U. R. (2020). Climate change, tropical fisheries and prospects for sustainable development. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(9), 440–454.
<https://doi.org/10.1038/s43017-020-0071-9>
- Liqing, Iryani, M. T. M., Lv, A., Sun, J., Anirudhan, A., Tan, M. P., Danish-Daniel, M., Wong, L. L., Baruah, K., Sorgeloos, P., Muhammad, T. S. T., Wang, M., Liang, Y., Mok, W. J., y Sung, Y. Y. (2022). Effects of heat shock protein 70 knockdown on the tolerance of the brine shrimp *Artemia franciscana* to aquaculture-related stressors: Implications for aquatic animal health and production. *Aquaculture*, 550(July 2021), 737872.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737872>
- Long, W. C., y Daly, B. (2017). Upper thermal tolerance in red and blue king crab: sublethal and lethal effects. *Marine Biology*, 164(8), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3190-1>

- Mendes, L. D. N., y Cruz, R. (2017). Estimation of density and abundance of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, in the Imburana peninsula, northern Brazil. *Crustaceana*, 90(5), 571–587. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003673>
- Michael, A. S., Thomps, C. G., y Abraliov, M. (1956). *Artemia* Organism Bioassay. *Science*, 123(March-3194), 464.
- Miller, N. A., Paganini, A. W., y Stillman, J. H. (2013). Differential thermal tolerance and energetic trajectories during ontogeny in porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. *Journal of Thermal Biology*, 38(2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.11.005>
- Miller, S. H., Zarate, S., Smith, E. H., Gaylord, B., Hosfelt, J. D., y Hill, T. M. (2014). Effect of elevated pCO₂ on metabolic responses of porcelain crab (*Petrolisthes cinctipes*) larvae exposed to subsequent salinity stress. *PLoS ONE*, 9(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109167>
- Peck, L. S., Morley, S. A., y Clark, M. S. (2010). Poor acclimation capacities in Antarctic marine ectotherms. *Marine Biology*, 157(9), 2051–2059. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1473-x>
- Peck, L. S., Souster, T., y Clark, M. S. (2013). Juveniles Are More Resistant to Warming than Adults in 4 Species of Antarctic Marine Invertebrates. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066033>
- Rebolledo, A. P., y Collin, R. (2018). Thermal tolerance of the Zoea I stage of four neotropical crab species (Crustacea: Decapoda). *Zoologia*, 35, 1–5. <https://doi.org/10.3897/zoologia.35.e14641>
- Sánchez, B., Flores, S., Rodríguez, E., Anaya, A. M., y Contreras, E. A. (2020). Causas y consecuencias del cambio climático en la producción pecuaria y salud animal. Revisión.

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 11, 126–145.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11s2.4742>

Seebacher, F., White, C. R., y Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61–66.
<https://doi.org/10.1038/nclimate2457>

Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>

Sorgeloos, P., Lavens, P., Lè, P., Tackaert, W., y Versichele, D. (1986). *manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura programa cooperativo gubernamental fao-italia*.

Sung, Y. Y., Pineda, C., MacRae, T. H., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2008). Exposure of gnotobiotic *Artemia franciscana* larvae to abiotic stress promotes heat shock protein 70 synthesis and enhances resistance to pathogenic *Vibrio campbellii*. *Cell Stress and Chaperones*, 13(1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0011-y>