



DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

**COMPORTAMIENTO RESPIRATORIO DE *MUGGIAEA*
ATLANTICA (CNIDARIA: SIPHONOPHORA) BAJO
CONDICIONES DE HIPOXIA EN LA ZONA DE
SURGENCIA DE CHILE CENTRO-SUR**

**Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magister En
Ciencias Mención Oceanografía**

Por Constanza Valentina Larson Paredes
Profesor Guía Mauricio Andrónico Urbina Fonerón
Profesor Co-guía Heraclio Rubén Escribano Veloso

Concepción, Chile. MAYO 2024

Se debe autorizar la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

DEDICATORIA

A la estrella más hermosa y brillante del cielo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Fisiología Animal Comparada de Universidad de Concepción por su apoyo y contribución a mi conocimiento en experimentación.

Así mismo agregó a cada uno de mis tutores y evaluadores por su guía y crítica para formar esta investigación.

Y finalmente agradezco la presencia y constancia de mis amigas y amigos en el desarrollo teórico de la investigación y en el proceso constructivo de mi persona en esta etapa de postgrado.

CONTENIDOS

Portada.....	1
Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Contenidos.....	5
Índice de tablas.....	7
Índice de ecuaciones..	8
Índice de ilustraciones.....	9
Resumen.....	10
Introducción	
I. Condiciones físico-biológicas del sistema de surgencia de Chile centro-sur.....	12
II. Tasa metabólica, comportamiento, y presión crítica del zooplancton gelatinoso.....	15
III. <i>Muggiaea atlantica</i> y su rol en el SCH.....	18
IV. Problemática.....	22
Hipótesis y Objetivos.....	24
Metodología	
I. Muestreo oceanográfico y laboratorio.....	25
II. Respirometría.....	28
III. Diseño experimental.....	29
IV. Determinación de proteína.....	31

V.	Procesamiento de datos.....	32
VI.	Determinación de parámetros biológicos.....	35
VII.	Cuantificación de estrés.....	35
VIII.	Data oceanográfica.....	36
IX.	Análisis estadístico.....	37
X.	Temporalidad del evento surgencia.....	37
Resultados		
Capítulo I: Respuesta fisiológica de <i>Muggiaea atlantica</i> a la hipoxia		
I.I.	Comportamiento respiratorio de <i>Muggiaea atlantica</i>	40
I.II.	Tasa metabólica de <i>Muggiaea atlantica</i>	42
I.III.	Determinación de P_{CRIT} y α en <i>Muggiaea atlantica</i>	45
Capítulo II: Variabilidad ambiental y su influencia sobre los parámetros fisiológicos de <i>Muggiaea atlantica</i>		
II.I.	Condiciones del evento de surgencia 2022-2023.....	47
II.II.	Acople biológico-ambiental.....	49
	Discusión.....	54
	Conclusiones.....	63
	Glosario.....	64
	Abreviaciones.....	66
	Referencias.....	68
	Anexos.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla resumen de experimentos.....	29
Tabla 2: Cálculo de tampón homogenizador.....	32
Tabla 3: Ecuación de mejor ajuste para los tres comportamientos.....	42
Tabla 4: Parámetros calculados en los tres comportamientos	44
Tabla 5: ANOVA para testear variabilidad de parámetros biológicos entre fechas.....	49

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Fórmulas para cálculo de tasa metabólica.....34

Ecuación 2: Fórmulas para cálculo estandarizado de tasa metabólica.....34

ÍNDICE DE ILUSTACIONES

Figura 1: Tipos de comportamientos respiratorios reportados y parámetros fisiológicos cuantitativos.....	18
Figura 2: Morfología de <i>Muggiaea atlantica</i>	19
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Muggiaea atlantica</i>	20
Figura 4: Lugar de muestreo.....	25
Figura 5: Esquema material de muestreo.....	26
Figura 6: Diseño experimental	30
Figura 7: Esquema montaje de respirometría.....	30
Figura 8: Proporción de conductas y réplicas resultantes.....	39
Figura 9: Tasas metabólicas de los tratamientos clasificados.....	41
Figura 10: Representación de las tasas metabólicas oxireguladoras.....	45
Figura 11: Relación del peso de proteína con el punto crítico.....	46
Figura 12: Fluctuación de surgencia y parámetros ambientales medidos....	47
Figura 13: MDS de SMR y factores ambientales.....	50

Figura 14: PCA de SMR y factores ambientales.....	51
Figura 15: MDS de P_{CRIT} y parámetros ambientales.....	52
Figura 16: PCA de P_{CRIT} y parámetros ambientales.....	52
Figura 17: GAM de oxígeno disuelto superficial y a.....	53
Figura 18: Diagrama teórico del comportamiento.....	57

RESUMEN

Muggiaea atlantica es la especie del zooplancton gelatinoso más abundante en los sistemas de surgencia costera, los cuales exhiben condiciones de oxígeno altamente variables bajo la presencia de una zona mínima de oxígeno (ZMO) somera, con una distribución vertical cambiante debido a la surgencia pulsátil. El comportamiento respiratorio de esta especie y sus respuestas adaptativas a las condiciones fluctuantes hipóxicas/normóxicas en dichas zonas de surgencia no están completamente entendidas. En este trabajo, individuos (fases nectóforo y eudoxia) fueron capturados en el centro-sur de Chile (36°30 S) durante agosto de 2022 y marzo de 2023 y sometidos a mediciones de respirometría en condiciones de laboratorio. Parámetros fisiológicos como la tasa metabólica estándar (SMR), la presión parcial crítica de oxígeno (P_{CRIT}) y la capacidad de suministro de oxígeno (α) fueron estimados y relacionados con la temperatura superficial del mar *in situ*, oxígeno superficial, salinidad superficial, clorofila-a superficial y la profundidad de la capa de mezcla obtenida de datos satelitales. La SMR media fue estimada en $9.4 \pm 2.54 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\approx 0.06 \text{ } \mu\text{molO}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1}$), P_{CRIT} fue $1.6 \pm 0.60 \text{ kPa}$, y la media de α fue $5.4 \pm 1.74 \text{ nmol O}_2 \text{ mg P}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ ($\approx 0.03 \text{ } \mu\text{molO}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ PO}_2^{-1}$). El comportamiento de la SMR como función de la presión parcial de oxígeno sugirió que esta es una especie oxireguladora, aunque con un consumo de oxígeno adicional sobre la SMR (>70% de las mediciones), implicando una respuesta de "estrés". La SMR estuvo significativamente correlacionada con todas las variables oceanográficas *in situ*, incluyendo un índice de surgencia, mientras que P_{CRIT}

estuvo correlacionado con la temperatura, oxígeno y clorofila-a. El parámetro α solo se encontró asociado con el oxígeno in situ. Los hallazgos indicaron que *M. atlantica* es una especie altamente tolerante a la hipoxia severa en la zona de surgencia sujeta a una ZMO somera. Sin embargo, esta capacidad depende de los parámetros fisiológicos de la especie los cuales son dependientes de la variabilidad estacional e intraestacional del proceso de surgencia.

INTRODUCCIÓN

I. CONDICIONES FÍSICO-BIOLÓGICAS DEL SISTEMA DE SURGENCIA DE CHILE CENTRO-SUR.

El sistema de corrientes de Humboldt (SCH) se localiza en el borde oriental del Pacífico Sur y presenta surgencia estacional en la región temperada y subtropical, lo que trae consigo aguas subsuperficiales ricas en nutrientes hacia la capa superficial, promoviendo una alta productividad biológica principalmente durante la primavera-verano austral (Thiel et al., 2007). Aquí al descomponerse, la materia orgánica consume el oxígeno disuelto (OD), y además producto de la baja ventilación del agua ecuatorial subsuperficial, se origina una zona de mínimo de oxígeno (ZMO) (Helly & Levin, 2004; Wyrski, 1962), que puede ascender dentro de los primeros 30 m de profundidad y con concentraciones de oxígeno inferiores a 20 $\mu\text{mol/kg}$ ($\approx 10\%$ saturación) frente a la costa de Concepción ($36^\circ 46' \text{ S}$) (Schneider et al., 2006). Adicionalmente, cuando se intensifica la surgencia se produce el ascenso de la ZMO a aguas muy someras ($<20 \text{ m}$), lo cual restringe el hábitat oxigenado del zooplancton, provocando agregaciones (Escribano & Hidalgo, 2000). En el borde superior de la ZMO los organismos pueden experimentar estrés a la hipoxia al quedar atrapados en aguas con poco oxígeno (Ekau et al., 2010).

Sin embargo, existen organismos que incursionan en la ZMO, dada su habilidad para tolerar dichas condiciones ambientales y permitiendo así evadir depredadores (Escribano & Riquelme-Bugueño, 2015; Riquelme-Bugueño et al., 2020; Wishner et al., 2018). Estudios previos proponen que copépodos (Escribano et al., 2009), y peces (Kaartvedt et al., 2009) incursionan a la ZMO para buscar refugio de la depredación que existe en las agregaciones sobre las capas hipóxicas (Wishner et al., 2018).

También se ha reportado que las medusas (= Medusozoa y Ctenophora) tienen mayor tolerancia a las aguas con bajo contenido de oxígeno disuelto (Purcell & Arai, 2001; Rutherford & Thuesen, 2005), al igual que el krill *Euphausia eximia*, que se ha observado que incursiona a aguas anóxicas por migración vertical (Riquelme-Bugueño et al., 2020). Se ha demostrado que las medusas son tolerantes a aguas con concentraciones menores a 1 mgO₂/L (=15% saturación) (Purcell et al., 2007; Purcell, 2012). Por lo mismo, es probable que las medusas puedan dominar en aguas pobres en oxígeno, o sin oxígeno que anteriormente fueron habitadas por peces y crustáceos zooplanctónicos (Moller & Risgård, 2007) gracias a su tolerancia fisiológica.

No obstante, lo anterior, a la fecha se desconoce si hidromedusas (=Hydrozoa) y/o sifonóforos (=Siphonophora) tienen la capacidad fisiológica de persistir en la ZMO, ya sea buscando presas o escapando de la depredación en la capa fótica. En organismos gelatinosos, los últimos antecedentes sobre tolerancia a condiciones de bajo oxígeno disuelto se realizaron en tres ctenóforos (*Pleurobrachia bachei*, *Bolinopsis infundibulum* y *Mnemiopsis leidyi*), cuyos resultados mostraron que las tres especies estudiadas dependen

del metabolismo aeróbico para tolerar la hipoxia (Thuesen et al., 2005). Si bien aquel metabolismo aeróbico se observa cuando el animal está en ambientes normóxicos, éste puede mantenerse en hipoxia por un tiempo determinado dependiendo de la especie.

II. TASA METABÓLICA, COMPORTAMIENTO, Y PRESIÓN CRÍTICA DEL ZOOPLANCTON GELATINOSO

El metabolismo aeróbico, medido como tasa de respiración, se cuantifica como oxígeno consumido por peso y unidad de tiempo, generalmente en $\mu\text{mol O}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en zooplancton. Se describe la tasa metabólica o *metabolic rate* (=MR) como uno de los parámetros fisiológicos más ocupados para evaluar tolerancia a la hipoxia y comparar capacidades aeróbicas entre el zooplancton (por ejemplo, en Ikeda, 1970, 1974, 2012; Ikeda & Mitchell, 1982, Roman et al., 2019; Wishner, 2018), mientras que la tasa metabólica estándar (=SMR) corresponde a la tasa metabólica basal en condiciones específicas y controladas, pero necesaria para mantener sus funciones vitales en reposo y termoneutral.

Específicamente para el grupo de medusozoa, Rutherford & Thuesen (2005) determinaron qué tipo de comportamiento presentan las hidromedusas y escifomedusas frente a la hipoxia estuarina, llegando a resultados que describen un comportamiento regulatorio (organismos que mantienen una baja tasa metabólica hasta llegar a su punto crítico (Prosser, 1973) (Fig. 1),

como fue el caso de *Aurelia labiata*, *Cyanea capillata*, *Phacellophora camtschatica*, *Aquorea victoria*, *Polyorchis penicillatus*, y *Proboscoidactyla flavicirrata*. Además, alternativamente encontraron otras hidromedusas de tipo conformadoras (aquellas que reducen el consumo de oxígeno de acuerdo con la disminución de oxígeno ambiental (Prosser, 1973), tales como *Euphysa flammea*, *Halitholus* sp., *Sarsia* sp., *Clytia gregaria*, *Eutonina indicans*, y *Muggiaea atlantica*; siendo esta última un caso cuestionable ya que presenta un “Punto crítico” aun siendo “conformadora”.

El “original” punto crítico de oxígeno (P_{CRIT}) introducido por Tang (1933) define el nivel de oxígeno ambiental al cual un organismo no es capaz de mantener el consumo de oxígeno independiente del medio (regulador) y se transforma en conformador (Mueller & Seymour, 2011). Sin embargo, recientemente Seibel et al. (2021) han actualizado y estimado los puntos de quiebre teóricos llamado $P_{\text{CRIT-SMR}}$, y $P_{\text{CRIT-MAX}}$ cuando se termina la tasa metabólica estándar y máxima respectivamente, y comienza la conformación. También incluyeron el término α (*alpha*) como la pendiente entre la tasa metabólica y la presión crítica de oxígeno ($\alpha_0 = \text{MR}/\text{PO}_2$ y $\alpha = \text{SMR}/P_{\text{CRIT-SMR}}$) previamente mencionada por Seibel & Deutsch (2020), la cual para ser calculada no necesita una tasa metabólica constante, estandarizada, ni tener un P_{CRIT} definido. Esto convierte a α en un parámetro más inclusivo para cuantificar y describir la capacidad máxima del metabolismo aeróbico estudiado.

Experimentalmente, en condiciones de laboratorio se elimina el MR_{MAX} aclimatando el tiempo que requiera la especie, dejando una SMR inicial en

normoxia o hipoxia dependiendo de los objetivos del investigador (Chabot et al., 2016). La evolución consecuente de la tasa metabólica depende del organismo, variando incluso dentro de la misma especie (Herreid, 1980), existiendo los clásicos reguladores, conformadores, o incluso “respuestas intermedias” (Mangum & Winkle, 1973) dentro de un amplio espectro de comportamientos (Herreid, 1980).

Sin embargo, el denominado Punto crítico es uno de los parámetros menos estudiados en zooplancton gelatinoso, aunque sea un parámetro fácilmente calculable por diferentes métodos (“Broken stick Regression”, “Michaelis-Menten function”, “Weibull Function” y “Line Low Oxygen” (Reemeyer & Rees, 2019)); con él se logra evaluar tolerancia a la hipoxia. Adicionalmente, el P_{CRIT} es un indicador ecológico, ya que los hábitats donde el oxígeno disuelto ambiental está por encima del P_{CRIT} para las medusas, pero está por debajo del P_{CRIT} para el resto del zooplancton, puede aumentar las tasas de depredación del zooplancton, al menos así lo demuestra Decker et al. (2004) con *M. leidyi*. Cabe considerar que los P_{CRIT} reportados a la fecha para los ctenóforos *P. bachei*, *B. infundibulum* y *M. leidyi* son de 7.7, 10.6, y 7.2 hPa respectivamente (Thuesen et al., 2005), mientras que para medusozoa fluctúan entre los 39.5 hPa en *E. flammea* y 5.5 hPa (0.55 kPa) en *M. atlantica*.

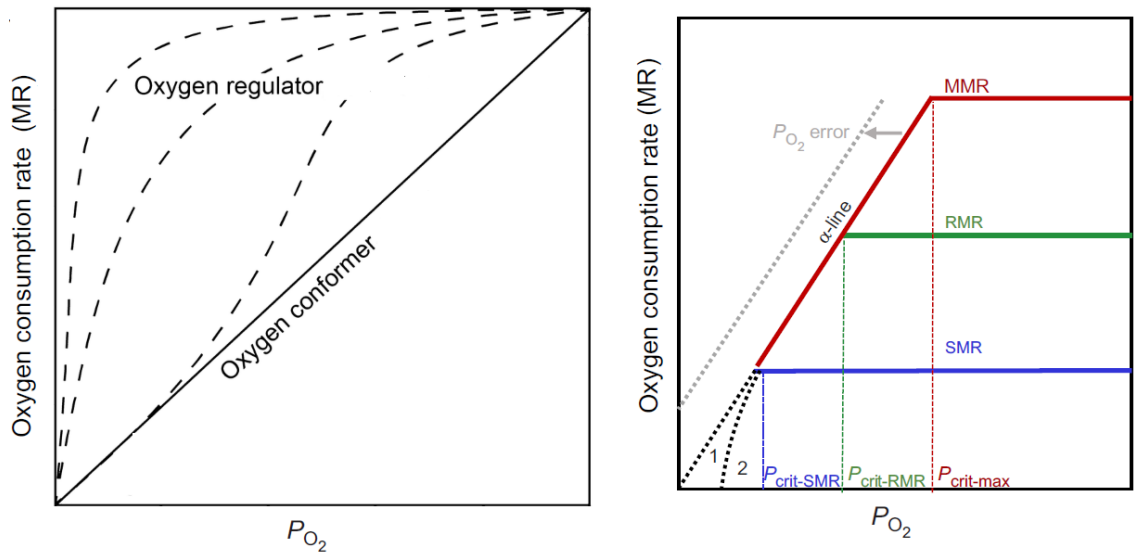


Figura 1: Tipos de comportamientos respiratorios reportados y parámetros fisiológicos cuantitativos. El cuadro de izquierda se observan los posibles tipos de oxiregulación hasta la oxiconformación directamente proporcional entre presión de oxígeno y consumo de oxígeno. Extraído y modificado de Leiva et al., 2018. En el recuadro de derecha se observan los parámetros medidos en cada comportamiento. Extraído de Seibel et al., 2021. Con tasa metabólica máxima (MMR, rojo), rutinaria (RMR, verde) y estándar (SMR, azul) como función de PO_2 .

III. *MUGGIAEA ATLANTICA* Y EL SCH

Muggiaea atlantica (Cunningham, 1892), es un sifonóforo colonial (Siphonophorae= Calyophorae), de tamaño promedio 0.7 cm (Totton, 1965) (FIG. 2). Su ciclo de vida según Cunningham (1982) (FIG. 3) se inicia con el huevo que se transforma rápidamente en plánula, la que posteriormente

genera un nectóforo liso y sin crestas (nectóforo rudimentario). Luego se desarrolla y separa el característico nectóforo piramidal (nectóforo definitivo), llevando consigo el sifosoma/tallo (colonia con subunidades). Los eudoxomas, cuando están completamente desarrollados en el tallo tubular o sifosoma, se liberan y continúan viviendo como organismos independientes o colonias, que se describieron originalmente con el nombre de eudoxia Eschscholtzii. La eudoxia tiene un cáliz genital (bráctea) que se parece a un nectóforo en forma, y esto produce óvulos o espermatozoides. Cada eudoxia es unisexual, pero produce varios cálices genitales en sucesión (gonóforos), todos del mismo sexo. A partir del huevo de eudoxia se desarrolla la larva y se reinicia la serie de etapas.

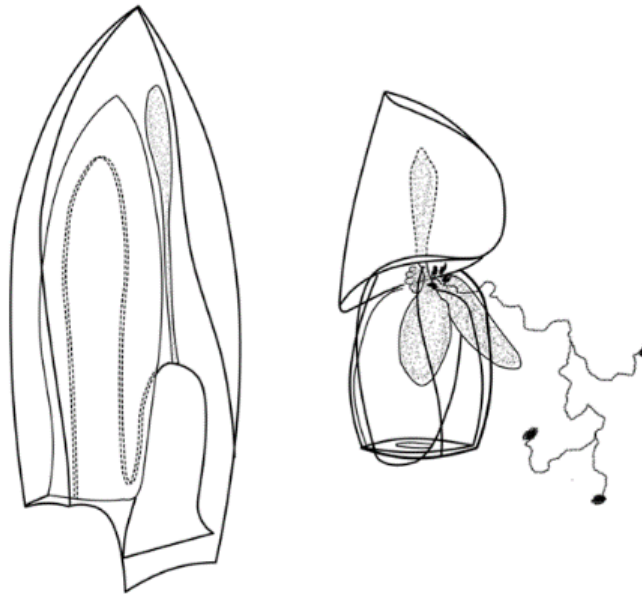


Figura 2: Morfología de *Muggiaea atlantica*. Izquierda: Nectóforo adulto, derecha: Eudoxia completa. Extraído de Blacket (2016).

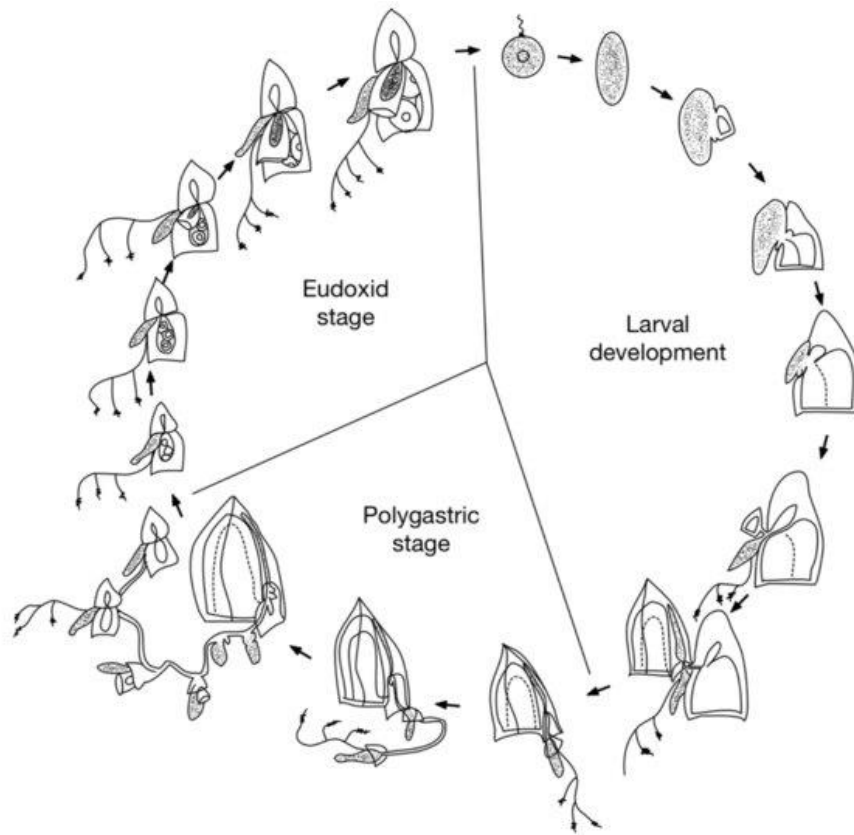


Figura 3: Ciclo de vida de *Muggiaea atlantica*. Extraído de Blacket (2016).

La duración del ciclo completo de vida de la especie depende directamente de la temperatura ambiente donde se desarrolle (Blacket, 2016). Para el congénero *Muggiaea kochii* (Will, 1844) está descrito el ciclo para los 13, 18 y 24 °C, dando una durabilidad de 21, 14 y 11 días respectivamente, permaneciendo el nectóforo en estado latente a los 13°C sin maduración de eudoxias en condiciones de laboratorio (Carré & Carré, 1991). Estos resultados son de relevancia para entender que *M. atlantica* es una especie más resistente a menores temperaturas que *M. kochii* y que su ciclo de vida pareciera estar completamente desarrollado bajo los 13°C en el sistema de Humboldt.

La especie se encuentra presente tanto en los principales sistemas de surgencia costera de borde oriental, y en sistemas de fiordos estuarinos y canales interiores (D' Ambrosio et al., 2019; Pages & Orejas, 1999; Palma, 2008; Palma & Rosales, 1995; Palma et al., 2007, 2011, 2014). Se define como una especie dominante en aguas frías emergentes de procesos de surgencia tanto en Benguela (Pages & Gili, 1991a, 1991b, 1992b) como en el Pacífico suroriental entre los 20 y 55°S (Alvariño, 1971; Palma & Apablaza, 2004; Palma & Silva, 2004, 2006; Ulloa et al., 2000).

Oceanográficamente, *M. atlantica* ha sido más estudiada dentro y al sur de la Corriente de Benguela que en SCH. En el sur de África se ha demostrado que la especie es nerítica (<100 m de profundidad) (Thibault-Botha et al., 2004), se presenta en alta densidad (sobre los 28 ind m⁻³) siendo dominante (Pages, 1992; Pages & Gili, 1992a), y trae consigo una baja biodiversidad en ensambles zooplanctónicos de la región (Thibault-Botha et al., 2004). En paralelo, se ha descrito el mismo rol ecológico en aguas de SCH (Palma & Apablaza, 2004; Ulloa et al., 2000), además de indicar que la densidad poblacional de la especie está afectada positivamente por el índice de surgencia (Palma & Rosales, 1995) y pareciera tener una distribución vertical reducida (<50m) por la presencia e influencia de la ZMO en la provincia de Mejillones, Chile (Palma & Apablaza, 2004).

La importancia ecológica de la especie radica, además, en la depredación de copépodos (Purcell, 1982), anfípodos y larvas de bivalvos y peces (Alvariño, 1980) de entre 0.4 y 1.2 mm de longitud (Purcell, 1982); y posible depredación sobre otros crustáceos pertenecientes al mesozooplankton que

no se hayan reportado previamente, y que son de importancia comercial en los sistemas de gran productividad biológica. Entre los taxones de zooplancton, las especies de gelatinosos carnívoros (p. ej., medusas, ctenóforos y sifonóforos) tienen un papel importante en la dinámica de la red alimentaria al configurar controles de *top-down* y *bottom-up* (Hosia et al., 2014; West et al., 2009). Las influencias de arriba hacia abajo resultan del pastoreo de las medusas sobre el mesozooplancton, que a su vez reduce el pastoreo del mesozooplancton en los niveles tróficos inferiores (Granéli & Turner, 2002; Stibor et al., 2004). Las influencias ascendentes son el resultado de la excreción de nutrientes disueltos como amonio por parte de las medusas, lo que estimula la producción de fitoplancton, que a su vez estimula la producción secundaria y de orden superior (West et al., 2009). Esto es trascendental de entender que pueda ocurrir en SCH y específicamente en la ZMO, donde el componente gelatinoso carnívoro puede estar aportando o restando energía dependiendo de su adaptabilidad a permanecer en esta zona.

IV. PROBLEMÁTICA

Ahora, siendo *M. atlantica* el sifonóforo dominante del mesozooplancton gelatinoso en periodos de surgencia en las costas de Chile central, queda entonces por entender el comportamiento de *Muggiaea atlantica* ante las condiciones hipóxicas traídas por la Zona Mínima de Oxígeno ascendente. Si *Muggiaea atlantica* posee comportamiento oxiregulador con P_{CRIT} bajo la

presión parcial de la ZMO (~ 2.1 kPa), esto significaría que la especie es eficiente para incursionar dentro de estas aguas. Para esclarecer esto es importante entonces confirmar la regulación de *Muggiaea atlantica* ante la hipoxia, junto a la determinación de su P_{CRIT} y SMR para comprobar que es un posible forzante biótico de la dinámica poblacional de la ZMO presente en el SCH.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Muggiaea atlantica posee un comportamiento oxiregulador, que le otorga la capacidad para incursionar dentro de la Zona de Mínimo Oxígeno, asociado a un “Punto Crítico” de bajo valor (< 2.1 kPa).

Objetivo general

Avanzar en el conocimiento de las respuestas metabólicas a la hipoxia en la especie gelatinosa *Muggiaea atlantica* en el sistema de surgencia de Chile centro-sur.

Objetivos específicos

1. Determinar experimentalmente la respuesta a la hipoxia de *Muggiaea atlantica* en base a sus parámetros respiratorios (SMR y presión crítica de oxígeno)
2. Determinar la relación entre la variabilidad oceanográfica del sistema de surgencia de Chile centro-sur y los parámetros respiratorios de *Muggiaea atlantica*

METODOLOGÍA

I. MUESTREO OCEANOGRÁFICO Y LABORATORIO

Se llevaron a cabo muestreos fuera de la Bahía de Coliumo, Región del Biobío, Chile, lugar característico por sus condiciones de surgencia variable y contener la serie de tiempo oceanográfica de la Universidad de Concepción desde 1997. Se realizaron embarques en la ‘Estación 18’ (36°30’ Latitud Sur y 73°08’ Longitud Oeste) mediante la lancha “Kay kay II”, y adicionalmente frente a la Boca Norte de la Bahía de Coliumo (36° 29’ Latitud Sur y 72° 58’ Longitud Oeste) (FIG. 4) mediante la lancha “el mechón” en el estrato de 80-0 y 40-0 metros de profundidad respectivamente. Los lances verticales se realizaron con red de zooplancton tipo WP2 de 200 μm con copo no filtrante (FIG. 5) para la recolección de mesozooplancton vivo.

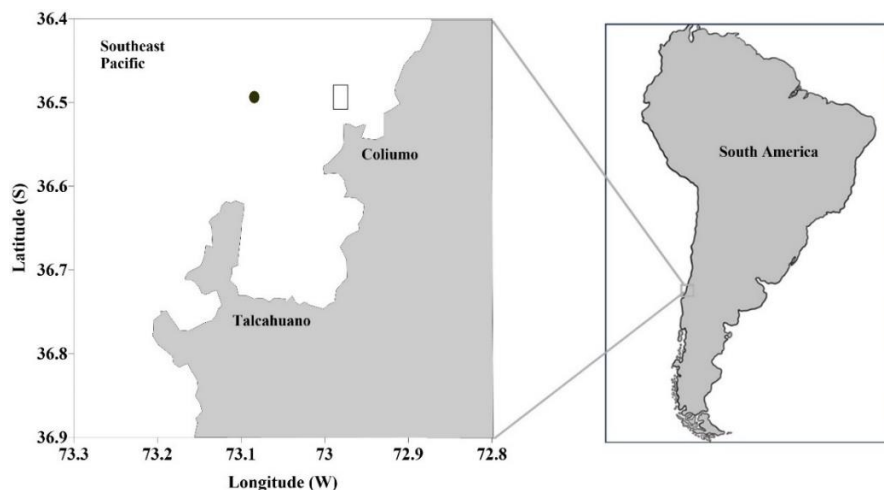


Figura 4: Lugar de muestreo “Estación 18” como punto negro y “Boca Norte de la Bahía de Coliumo” en el área del rectángulo.

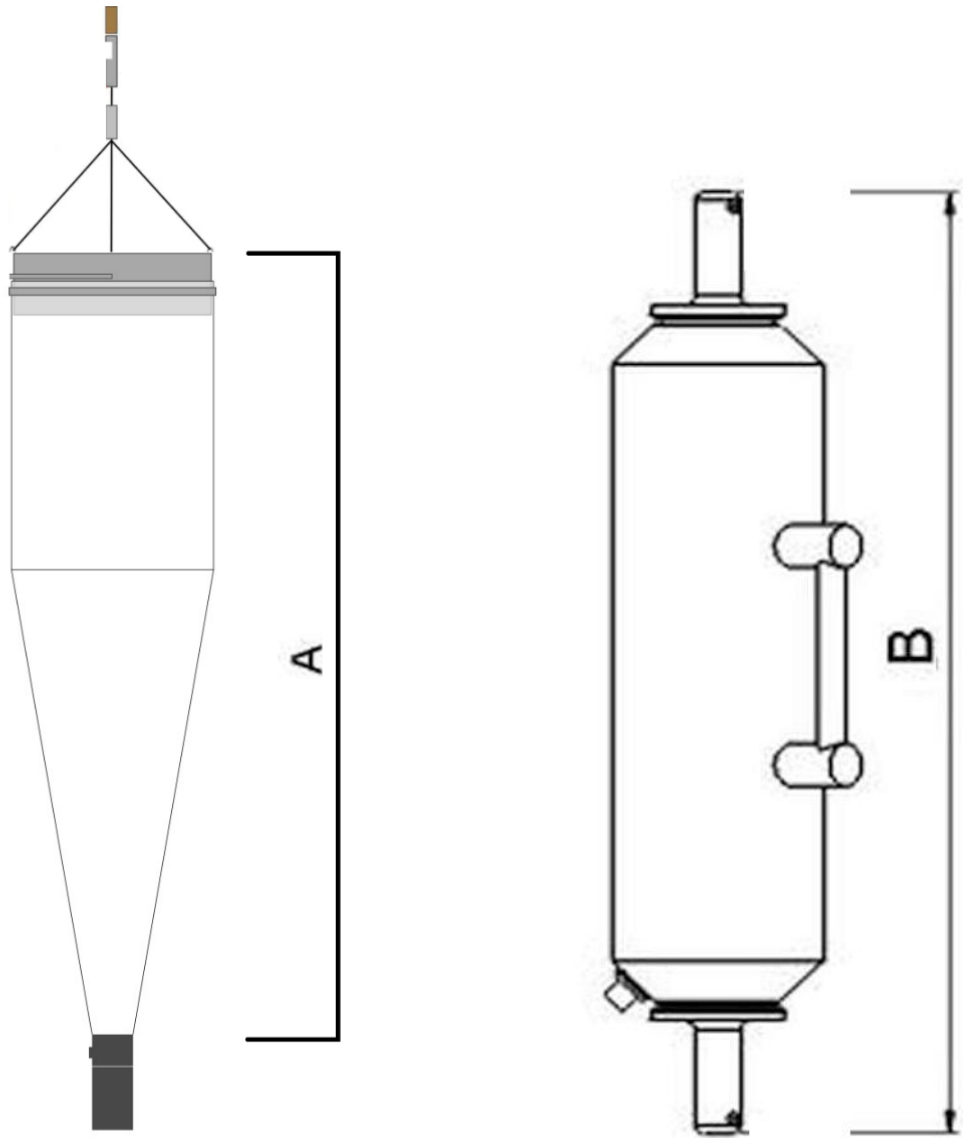


Figura 5: Esquema material de muestreo. Izquierda Red WP2 extendida, extraída de Aquatic BioTechnology (2024); derecha botella Niskin, extraída de Hydro-Bios Apparatebau GmbH (2024). Con A= 315 cm de longitud de Red; y B= 64 cm de longitud.

En cada embarque se extrajo agua superficial mediante botella Niskin 5L (~5 metros de profundidad) (FIG. 5), que luego en laboratorio fue filtrada a 0.2 μm por bomba de filtración para excluir microplancton, con fin de incubar la especie y realizar blancos de respiración microbiana.

El zooplancton recolectado por cada lance se conservó en frío con *icepack* durante el transporte y luego se realizó la identificación, separación y limpieza de la fase poligástrica (=nectóforos) y reproductiva (=eudoxias) de la especie desde la comunidad zooplanctónica.

El proceso previo de incubación, mencionado anteriormente, se realizó bajo lupa estereoscópica Leica S8APO montando zooplancton en placas Petri de vidrio y agua filtrada ($12 \pm 2^\circ\text{C}$) por baño termorregulado o cámara de incubación. Los nectóforos y eudoxias se extrajeron a placas Petri de 60 o 100 mm mediante pipetas Pasteur de polietileno desechables, y mediante pinzas de acero inoxidable se limpiaron de epibiontes u organismos enganchados por los cnidocistos.

Paralelamente los sensores se calibraron dos horas antes de cada inicio de experimento respirométrico, detectando el 0% de saturación de oxígeno en una solución de agua destilada con tiosulfato de sodio, hasta el 100% de saturación de oxígeno con agua destilada aireada a temperatura ambiente.

II. RESPIROMETRÍA

La incubación de organismos se realizó en cámaras respirométricas a temperaturas constantes definidas de acuerdo con las observaciones in situ (aprox. 11°C-13°C), a través cámaras de aclimatación o por baños termorregulados.

Los experimentos de respirometría consistían en registrar cada 15 minutos la concentración de oxígeno disuelto por cámara sellada (crioviales de vidrio de 2 ml) mediante la inserción de un sensor de oxígeno robusto (PyroScience Optical Oxygen Logger 3319) en cada réplica más un sensor de temperatura por equipo sensor. No se incluyó mezcla por el tamaño de las cámaras y la turbulencia excesiva que perturbaría a los individuos.

Cada experimento se inició con la aclimatación a las condiciones de laboratorio (12°C) por cuatro horas. La durabilidad de cada incubación rondó entre las 12 y 48 horas. Los criterios de aclimatación de cuatro horas y no de 24 horas como se realiza en respirometría clásica, se basaron en la corta duración del ciclo de vida (antecedentes de 24 a 10 días del ciclo completo en *M. kochii*) en comparación a la longevidad de otros organismos del zooplancton propios del sistema. Adicionalmente se siguió la sugerencia del artículo de Møller & Riisgård (2007) de no continuar los experimentos después de 48 horas en cámaras de respirometría cerrada, evitando así la inanición excesiva y la bioacumulación de amonio (Chapelle & Peck, 1995).

Tabla 1: Tabla resumen de experimentos. Con C=Control, N=Nectóforo, E=Eudoxia.

FECHA	EXPERIMENTO	LATITUD	TRATAMIENTO	RÉPLICAS
30-08-2022	1	73°50' S	C-N	C-1N-0E
08-09-2022	2	73°50' S	C-E	C-0N-5E
12-09-2022	3	73°50' S	C-N	C-9N-0E
15-12-2022	4	73°50' S	C-N	C-3N-0E
15-03-2023	5	72°95' S	C-N-E	C-1N-0E
21-03-2023	6	73°50' S	C-N-E	C-4N-1E
23-03-2023	7	72°95' S	C-N-E	C-2N-2E
28-03-2023	8	72°95' S	C-N	C-4N-0E
30-03-2023	9	72°95' S	C-N	C-6N-0E

III. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño consistió en tres tratamientos:

1. Cámaras con cuatro Nectóforos o fase poligástrica adulta: Nectóforos más tallo sifosomal completo (FIG. 2 izquierda)
2. Cámaras con seis Eudoxias completas o fases reproductivas: Brácteas, tallo sifosomal completo, gonóforos reproductivos (FIG. 2 derecha)
3. Cámaras “Blanco” o de respiración microbiana: 0 individuos

El tratamiento 1 (Nectóforos) tuvo 30 réplicas, mientras que el tratamiento 2 (Eudoxias) tuvo 7 réplicas. Las 30+7 réplicas se obtuvieron de 9 set de datos (=días de recolección) (FIG. 6 y 7; TABLA 1).

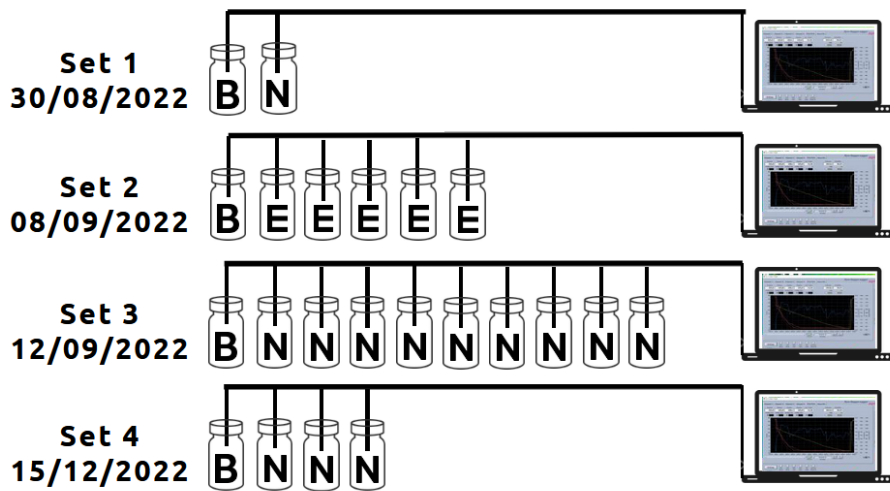


Figura 6: Diseño experimental de los primeros 4 set de datos obtenidos con diferente número de réplicas por tratamiento; donde B= Blancos (tratamiento 3), E= Eudoxias (tratamiento 2) y N= Nectóforos (tratamiento 1).

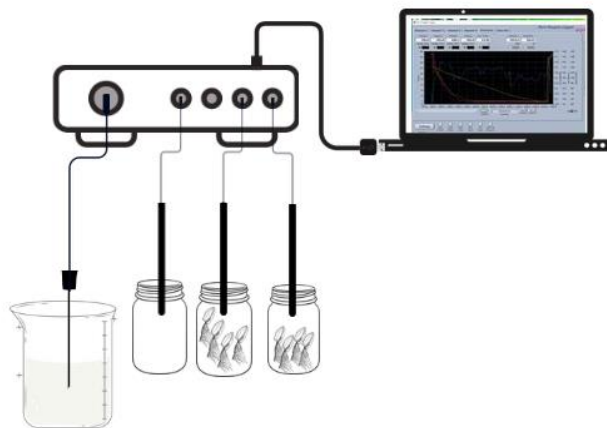


Figura 7: Esquema montaje de respirometría. Sensor de temperatura en agua de mar filtrada; sensor en tratamiento control de cámara respirométrica cerrada y sensor por tratamiento nectóforos y/o eudoxias en respirometría cerrada.

IV. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Al finalizar el tratamiento de respirometría, se extrajeron inmediatamente los individuos de sus cámaras, se colocaron en tubos centrífuga de polipropileno y se mantuvieron a -20°C hasta su extracción de proteína. Las muestras se descongelaron hasta los 0° y para la homogenización se adicionó un volumen conocido de tampón (PBS= Phosphate Buffered Saline) a cada muestra (TABLA 2), siguiendo la proporción de proteína corporal calculada en *Diphyes* sp. (Familia de *M. atlantica*) por Clarke et al. (1992). Todo el proceso se realizó en frío, con homogenizador Polytron 5000 durante 15 segundos por muestra y manteniendo el criovial en baño frío.

Se realizó, luego, la curva estándar con Bovine Serum Albumine (BSA) de 2 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, 2023). El protocolo de extracción proteica designado, según las indicaciones propuestas por Martínez et al. (2020), fue MicroBradford. Lo anterior basado en la reacción de unión del Azul de Coomassie G-250 a la proteína (Bradford, 1976). Se calculó la concentración de proteína por absorbancia mediante el espectrofómeto de microplaca SpectrostarNano de BMGLabtech. Detalles de los reactivos, procedimientos y volúmenes en el Anexo.

Tabla 2: Cálculo de tampón homogenizador (PBS) para ambos estadios de *M. atlantica* según su tamaño aproximado y peso húmedo. Peso húmedo extraído de datos preliminares y porcentaje de proteína extraído desde Clarke et al. (1992) para *Diphyes* sp. Con PH: Peso húmedo; y TH: Tampón homogenizador.

TAMAÑO M. ATLANTICA	LONGITUD (cm)	PH (g)	PROTEÍNA			TH (µl)
			(%gPH)	g	mg	
N- PEQUEÑO	<0.5	0.003	0.006	1.84e ⁻⁵	0.018	183.9 300
N-MEDIANO	0.5-0.7	0.024	0.006	0.001	0.144	144.0 500
N-GRANDE	>0.7	0.044	0.006	0.002	0.270	269.7 1000
E-MEDIANA	0.5-1	0.024	0.006	0.001	0.144	144.0 500

V. PROCESAMIENTO DE DATOS

La evolución del consumo de oxígeno por cámara en el tiempo se visualizó en el Software Pyro Oxygen Logger 3319, pero la tasa metabólica y su estandarización se calcularon en plantilla Microsoft Excel como presión de oxígeno en mmHg y kPa (PO₂) multiplicado por el factor de disolución (FD) y el volumen de la cámara respirométrica en litros (V) (Ec. 1a), resultando la concentración en micromolar de oxígeno por cámara. Paralelamente se calculó la tasa de oxígeno consumida por respiración microbiana, sacando la pendiente de la respiración y corrigiendo los datos de respiración total por hora.

Consecutivamente se calculó el delta (Δ) de μmolO_2 por cada una hora (Ec. 1b), se transformó a nmolO_2 y cada tasa se dividió en la cantidad de individuos por réplica (n) para obtener la tasa metabólica por individuo $\text{nmolO}_2\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Ec. 1d.1); o en la cantidad de proteína en mg (P), obteniendo peso específico $\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Ec. 1d.2).

Para la correcta comparación de tasas metabólicas, se estandarizó la tasa metabólica dividida en mgP a gWW (gramo peso húmedo) según la Ecuación 2. Para lo anterior se utilizó el mismo factor de 0.613 %gWW para calcular la proteína promedio y el peso húmedo promedio de la especie. El resultado final de aquella ecuación se entrega para efectos de discusión y conclusión. Se adiciona que no existe a la fecha la composición elemental (ni proteica) de *Muggiaea atlantica* (ni de otro miembro de la familia Diphyidae).

Ecuación 1: Fórmulas para cálculo de tasa metabólica por individuo por hora (d.1) y peso específico (d.2). Observe que se debió transformar a nanomol la respiración por presentar valores pequeños ($>0,01 \mu\text{molO}_2$). Con PO_2 : Presión de Oxígeno; FD: factor de disolución de O_2 en agua de mar; V: Volumen de cámara respirométrica; Δ : delta de consumo en μmolO_2 por cada hora; n : número de individuos por réplica.

$$(a) \text{PO}_2 * \text{FD} * V = \mu\text{molO}_2$$

$$(b) \Delta = \mu\text{molO}_{2(\text{min}60)} - \mu\text{molO}_{2(\text{min}15)} = \mu\text{molO}_2\text{h}^{-1}$$

$$(c) \mu\text{molO}_2\text{h}^{-1} * 1000 = \text{nmolO}_2\text{h}^{-1}$$

$$(d.1) \frac{\text{nmolO}_2\text{h}^{-1}}{n} = \text{nmolO}_2\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$$

$$(d.2) \frac{\text{nmolO}_2\text{h}^{-1}}{\text{mgProteína}} = \text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$$

Ecuación 2: Fórmulas para cálculo estandarizado de tasa metabólica peso específico por hora ($\mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$). Con peso proteína promedio de la especie de =2.4 mg; peso húmedo promedio (WW) de 0.39 g, desde la conversión de Clarke et al (1992) de 0.13 g Proteína del %WW.

$$(a) \text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1} * 2.4 \text{mgP} = \text{nmolO}_2\text{h}^{-1}$$

$$(b) \frac{\text{nmolO}_2\text{h}^{-1}}{0.39 \text{g WW}} = \text{nmolO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$$

VI. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Se clasificaron las réplicas según la tendencia de la tasa metabólica estandarizada por hora, dependiendo de su pendiente de estrés (ver sección VII) entre los 20 y 5 kPa. Las réplicas (N) con comportamientos no ajustados a alguna de las tres funciones principales fueron excluidas del análisis. Así de 50 réplicas medidas, solo se estudió el comportamiento de 37, siendo la población experimental final.

Se calculó la SMR con el percentil 10% menor de los datos entre la aclimatación y el doble de P_{CRIT} (Herrmann & Enders, 2000; Rosewarne et al, 2014; desde Chabot et al., 2016); mientras que éste último se calculó con el software RStudio mediante el paquete Segmented (Muggeo, 2008) para todas las réplicas reguladoras (Prinzing et al., 2021). Se incluyó, según Seibel et al., (2021) el cálculo de α (*alpha*) como toda la pendiente de conformación representada por $\alpha = \text{MR}/\text{PO}_2$ hasta su punto de quiebre P_{CRIT} .

VII. CUANTIFICACIÓN DE ESTRÉS

Se propone la existencia de una tasa metabólica máxima experimental llamada “Tasa de estrés progresivo experimental” (EMR) que consiste en las tasas metabólicas máximas alcanzadas por réplica sin aplicar factor de estrés propiamente tal en el diseño de respirometría, excluyéndolos de los comportamientos clásicos de regulación. A los individuos, entonces, con “estrés” se les calculó la EMR con el percentil 10% mayor, ya que no se pudo ejecutar el paquete recomendado por Prinzing et al. (2021) rollRegres

(Christoffersen, 2019) para tasas máximas por ser retirado de la biblioteca RStudio y no ser teóricamente el mismo parámetro. Así mismo, la pendiente de estrés (mE) resultante se calculó con el 80% de los datos entre SMR y EMR de los comportamientos no reguladores.

VIII. DATA OCEANOGRÁFICA

Los parámetros ambientales se obtuvieron de bases de datos satelitales, específicamente la temperatura superficial del mar (TSM en °C), salinidad superficial del mar (SSM en PSU), clorofila superficial (CHL en mg m^{-3}), producción primaria neta (PPN en $\text{mg m}^{-3} \text{d}^{-1}$), oxígeno disuelto superficial (OD en mmol m^{-3}) y profundidad de la capa de mezcla (OML en m) se extrajeron del recurso Global Ocean Physics / Biogeochemistry Analysis and Forecast de COPERNICUS (2023), mientras que el índice de surgencia calculado desde el transporte de Ekman ($IS = \text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{s}^{-1}$) se obtuvo del viento meridional extraído de Merge Windspeed, Stress, Curl, Divergence, and Ekman Upwelling, Metop-C ASCAT de NOAA (2023). Éste último parámetro se calculó con la ecuación Mx : estrés del viento (τ_y) / parámetro de coriolis (f); siendo τ_y : densidad del aire \times constante de degradado \times componente del viento; mientras que f : $2 \times$ velocidad angular \times seno(latitud). Estos componentes se extrajeron para cada quincena entre inicio de agosto de 2022 y marzo de 2023 para estudiar su variabilidad.

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas de normalidad y homocedasticidad, además de las comparaciones entre curvas respiratorias, parámetros fisiológicos y ambientales, se realizaron a través del software SigmaPlot 12.0, utilizando específicamente test de Shapiro-Wilk para normalidad y ANOVA de una vía para SMR, LN (SMR). Mientras que para EMR y α se utilizó Test de Kruskal-Wallis y las pendientes de estrés aeróbico (mE) se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Esto con fin de estudiar las medias y varianza de los parámetros entre cada conducta. P_{CRIT} no se comparó entre curvas por no aplicar el término teórico de punto de quiebre a las curvas con estrés. Se estudió la correlación de la masa con el P_{CRIT} , estudiando la existencia de diferencias significativas entre las variables para evaluar la segregación por tallas. Finalmente, en SYSTAT 12 se aplicaron análisis de varianza (ANOVA), test de homogeneidad (Levene), test de normalidad (Shapiro-Wilk) y modelos lineales generalizados (GML) tipo stepwise a cada parámetro fisiológico estandarizado: LN(SMR), Log (P_{CRIT}) + 1 y LN(α), para determinar así la influencia significativa de cada parámetro ambiental.

X. TEMPORALIDAD DEL EVENTO SURGENCIA

Adicionalmente se realizaron modelos aditivos generalizados (GAM) para suavizar los modelos lineales desde el software Primer 6 (2006). Del mismo software se realizaron los modelos multidimensionales (MDS) para maximizar las similitudes y diferencias entre los factores, y análisis de componentes principales (PCA) para ver la distribución y segregación

espacial de los factores (muestreos), y la relación directa o inversamente proporcional entre variable fisiológica y ambiental. Igualmente se aplicó estandarización y semejanza Euclidiana para SMR y para P_{CRIT} . En caso de α , se reestudió el modelo GAM por software R studio, obteniendo un gráfico de relación acople biótico-abiótico.

RESULTADOS

Los resultados se entregan en un manuscrito (ANEXOS) sometido a la revista *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY AND ECOLOGY*.

Recepción de “*submission*”:

METABOLIC ADAPTIVE RESPONSE OF THE SIPHONOPHORAE MUGGIAEA ATLANTICA TO VARIABLE OXYGEN CONDITIONS IN A COASTAL UPWELLING SYSTEM

Dear Professor Urbina,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. It has been assigned the following manuscript number: JEMBE-D-24-00065.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jembe/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

CAPÍTULO I: RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *MUGGIAEA ATLANTICA* A LA HIPOXIA

I.I. COMPORTAMIENTO RESPIRATORIO DE *M. ATLANTICA*

Al estandarizar y comparar los comportamientos de las 50 réplicas experimentales, 37 registraron respuestas respiratorias clasificables en: oxiregulación (N=12) de comportamiento hiperbólico, oxiregulación con estrés progresivo (N=7) de comportamiento logaritmo natural y estrés progresivo (N=18) de comportamiento gaussiano. El tratamiento eudóxico representó solo el 17% de la población experimental total, y sus comportamientos fueron de oxiregulación clásica con un 1 réplica y estrés progresivo con 6 réplicas. Por su parte la oxiregulación con estrés progresivo no se observó en ninguna réplica eudóxica (FIG. 8).

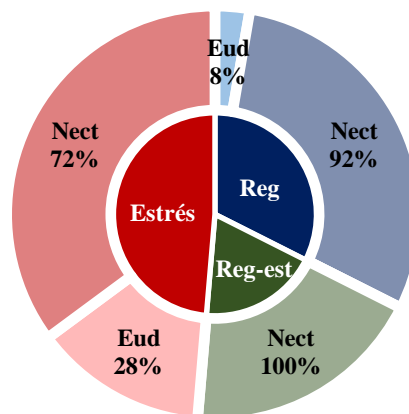


Figura 8: Proporción de conductas y réplicas resultantes de los experimentos de respirometría en *Muggiaea atlantica*. Con Reg= Oxiregulación; Reg-est= oxiregulación con estrés; Estrés= Estrés progresivo; Eud= Eudoxias; y Nect=Nectóforos.

Ninguna réplica de ningún tratamiento de la especie presentó oxiconformación. En cambio, presentaron comportamientos regulatorios clásicos y “pseudo-oxiregulatorios” definidos como “estrés” (FIG. 9), haciendo referencia a aquellas curvas respiratorias que no son estrictamente regulatorias, ya que existe un claro aumento del consumo de oxígeno sin aplicar métodos experimentales que lo justifiquen.

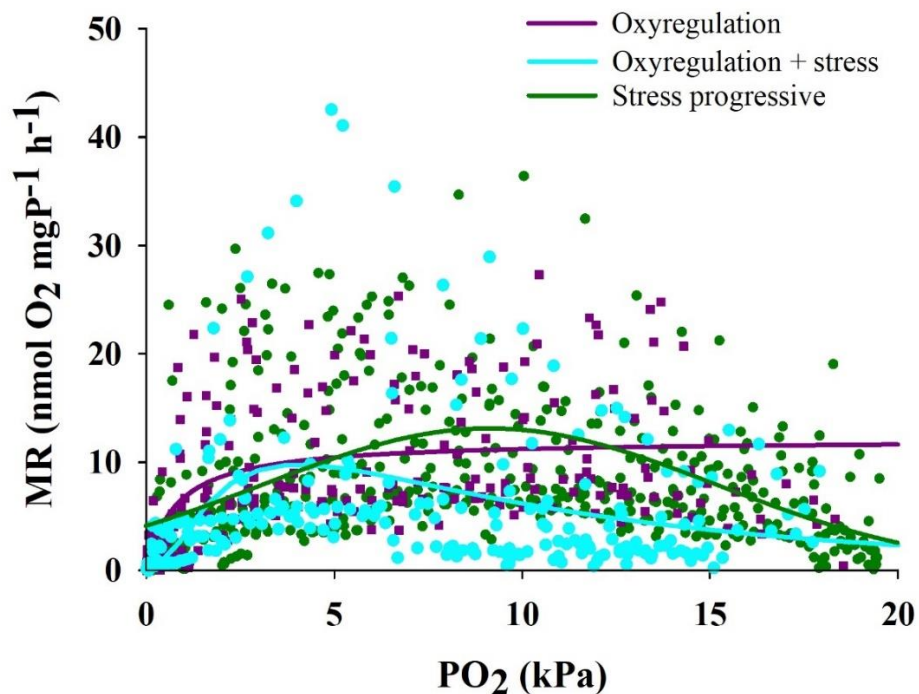


Figura 9: Tasas metabólicas de todos los tratamientos clasificados (población experimental). Con oxiregulación (morado), oxiregulación con estrés progresivo (cian) y estrés progresivo (verde). Se observa mayor dispersión hacia mayores MR en los comportamientos con estrés, sobrepasando a los 40 nmolO₂mgP⁻¹h⁻¹, aunque las curvas se ajustan alrededor de los 10 nmolO₂mgP⁻¹h⁻¹.

Se realizó el esfuerzo de hacer el mejor ajuste de curva para cada comportamiento (TABLA 3), siendo la oxiregulación representada por una hipérbola clásica, la oxiregulación con estrés progresivo en un logaritmo normal de tres parámetros y el comportamiento de estrés siendo ajustado a una curva gaussiana de tres parámetros. Sin embargo, la ecuación de b no coincidió entre los ajustes (ANEXO), no logrando una comparación entre ellas.

Tabla 3: Ecuación de mejor ajuste para los tres comportamientos. Con a =pendiente que tiende a 0, b =comportamiento de quiebre y x_0 = comportamiento en normoxia.

RESPUESTA	TIPO	ECUACIÓN	a	b	x_0
OXYREGULACIÓN	Hipérbola	$MR = a*x/(b+x)$	12,13	0,79	-
OXIREG + ESTRÉS	Log normal	$MR = a*\exp(-0,5*(\ln(x/x_0)/b)^2)/x$	73,83	1,10	14,38
ESTRÉS	Gaussiana	$MR = a*\exp(-0,5*((x/x_0)/b)^2)$	12,44	5,86	8,78

I.II. TASA METABÓLICA DE *M. ATLANTICA*

Las tasas metabólicas fueron evidentemente afectadas por el estrés experimental, obteniendo diferentes medias de SMR dependiendo de los comportamientos observados (TABLA 4). Así mismo se puede indicar la existencia de una tasa metabólica máxima experimental por respirometría (EMR) cuando existe una pendiente de estrés aeróbico reflejado en el consumo progresivo de oxígeno sin factores metodológicos adicionales que la propia hipoxia, y por consiguiente su pendiente (M_E).

Entre los tres comportamientos, la SMR fue casi el doble más alta en oxiregulación clásica que en comportamientos con estrés, lo que se ajusta a las curvas de la FIG. 4, y su valor promedio fue de $9.24 \pm 2.54 \text{ nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ ($\approx 0.06 \text{ } \mu\text{molO}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1}$); mientras que la EMR difiere en $1 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ entre los dos comportamientos con estrés (TABLA 4). Estadísticamente, los resultados de normalidad muestran que los datos de las SMR tienen una distribución normal ($P = 0.086$) y las varianzas pertenecen a un mismo grupo ($P = 0.112$). Así no las EMR y las mE , que resultan salirse de la normalidad ($P < 0.050$ ambos parámetros).

Sin embargo, las tasas medidas (SMR y EMR) ninguna fue significativamente distinta entre los comportamientos observados ($P = 0.078$ para SMR; $P = 0.056$ para LN(SMR); $P = 0.613$ para EMR; $P < 0.050$ para LN (EMR)). Exclusivamente la pendiente de estrés (mE) mostró diferencias significativas ($P = 0.043$), difiriendo el comportamiento de respiración entre ambas curvas de estrés.

Tabla 4: Parámetros calculados en los tres comportamientos observados como respuesta respiratoria, con N= número de réplicas (independiente del tratamiento); SMR= Tasa metabólica estándar ($\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$), EMR= Tasa de estrés progresivo ($\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$); mE=pendiente de estrés aeróbico ($(\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1})$) y α = Capacidad suplementaria de oxígeno ($(\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1})$).

RESPUESTA	N	SMR	EMR	mE	α
OXYREGULACIÓN	12	12.16 ± 5.91	-	-	7.27 ± 4.05
OXIREG + ESTRÉS	7	7.54 ± 7.49	16.62 ± 14.07	-0.46 ± 0.86	3.83 ± 2.02
ESTRÉS PROGRESIVO	18	8.04 ± 3.38	17.48 ± 8.18	-1.20 ± 0.94	5.09 ± 4.00
PROMEDIO	-	9.24 ± 2.54	17.05 ± 0.62	-0.82 ± 0.52	5.40 ± 1.74

El estudio entre SMR y EMR no arrojaron diferencias significativas ($P=0.06$). Teóricamente se excluye la existencia de una EMR en regulación, ya que por definición de regulación no debería presentar un grado de estrés o aumento injustificado del consumo de oxígeno y además que su valor medio con su desviación estándar no es significativamente diferente con la SMR en oxiregulación ($P = 0.141$).

I.III. DETERMINACIÓN DE P_{CRIT} Y α EN *M. ATLANTICA*

Por razones teóricas, como la eliminación de estrés como ruido de las tasas metabólicas, se trabajó con las tasas oxiregulatorias determinando un P_{CRIT} de 1.6 ± 0.60 para la especie durante todo el periodo de estudio (FIG. 10). Además, durante el análisis se diferenciaron dos grupos visualmente marcados de comportamientos respiratorios, respirando entre los 4 y 7.5 $\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ y el segundo por grupo sobre los 12 $\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Al comparar el peso con el valor crítico de forma estadística no mostraron diferencias significativas ($P = 0.069$). Este valor sumado a la existencia de una correlación positiva peso (mgP) – P_{CRIT} (FIG. 11), se sugiere que de aumentar el tamaño muestral en peso de *M. atlantica*, podrían verse una segregación de tamaños significativa.

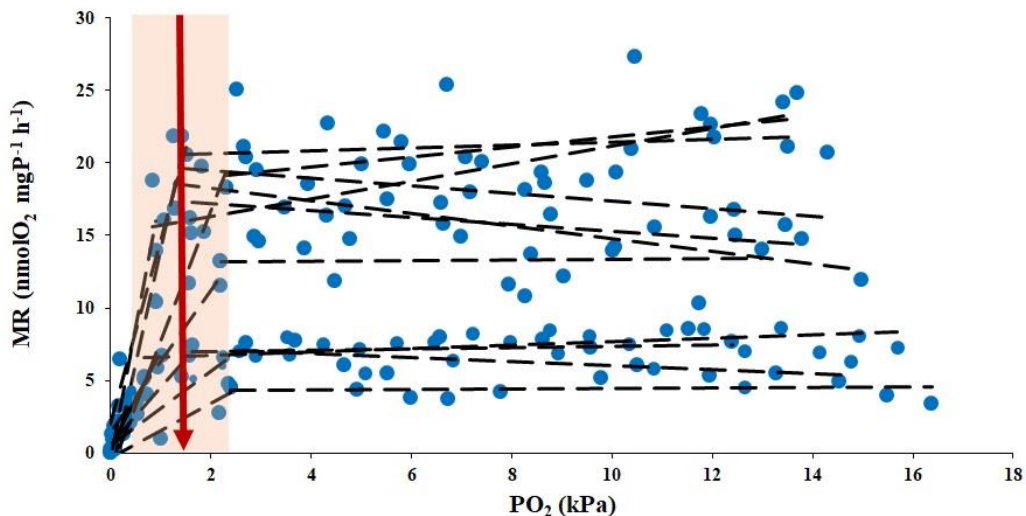


Figura 10: Representación de las tasas metabólicas reguladoras mostrando el rango de punto de quiebre en rojo (P_{CRIT}) y su valor con desviación estándar. Se observan los grupos marcados sobre y bajo de $10 \text{ nmolmgP}^{-1}\text{h}^{-1}$.

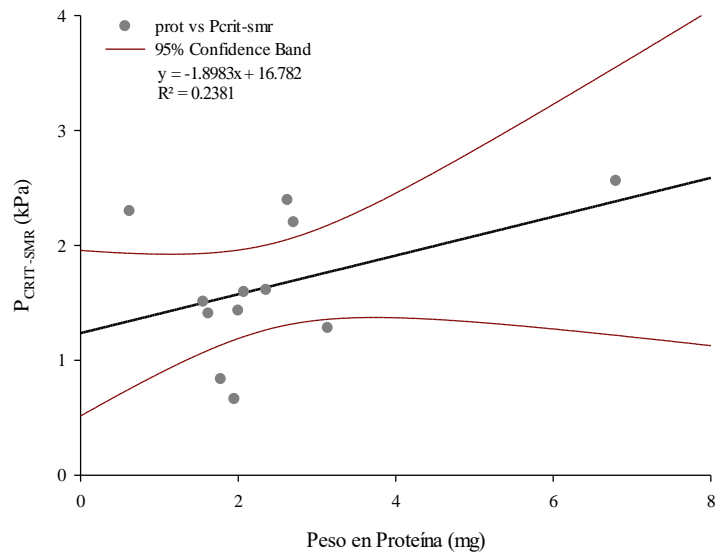


Figura 11: Relación del peso de proteína (mg) con el punto crítico (kPa). Se observa un bajo R^2 (20%).

Adicionalmente se obtuvo α como complemento de P_{CRIT} , el que no mostró tener diferencias significativas entre los tres comportamientos ($P = 0.062$), siendo un parámetro único para las repuestas respiratorias, con un promedio de $5.4 \pm 1.74 \text{ nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1} \text{ PO}_2^{-1}$ ($\approx 0.03 \text{ } \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1}$). Éste sería el primer valor de la capacidad suplementaria de oxígeno en Cnidaria, pudiendo sólo ser comparada con otros phyla.

CAPÍTULO II: VARIABILIDAD AMBIENTAL Y SU INFLUENCIA SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE *MUGGIAEA* *ATLANTICA*

II.I. CONDICIONES DEL EVENTO DE SURGENCIA 2022-2023

Entre los parámetros ambientales superficiales medidos se observa (FIG. 12) un aumento en la intensidad de la surgencia entre noviembre 2022 y enero 2023, con oscilaciones menores antes y después de este período. Así mismo en noviembre 2022 se observó el primer pico de temperatura superficial y en marzo 2023 el segundo y más fuerte llegando a los 16 °C. La capa de mezcla permaneció homogénea en profundidad entre los 10 y 11 m de profundidad durante el periodo, exceptuando en septiembre 2022 donde se profundizó a 13 m. La producción primaria neta (NPPV siglas en inglés) se observó en aumento desde septiembre 2022 hasta febrero 2023, con oscilaciones de por medio y al finalizar el verano; sin embargo, la clorofila (CHL) mostró un pico primario a fines de septiembre 2022 y otro pico entre diciembre 2022 y enero 2023, disminuyendo los meses posteriores. El oxígeno disuelto superficial en el océano fue oscilante cayendo a su mínima aprox. de 200 mmol m⁻³ en febrero 2023.

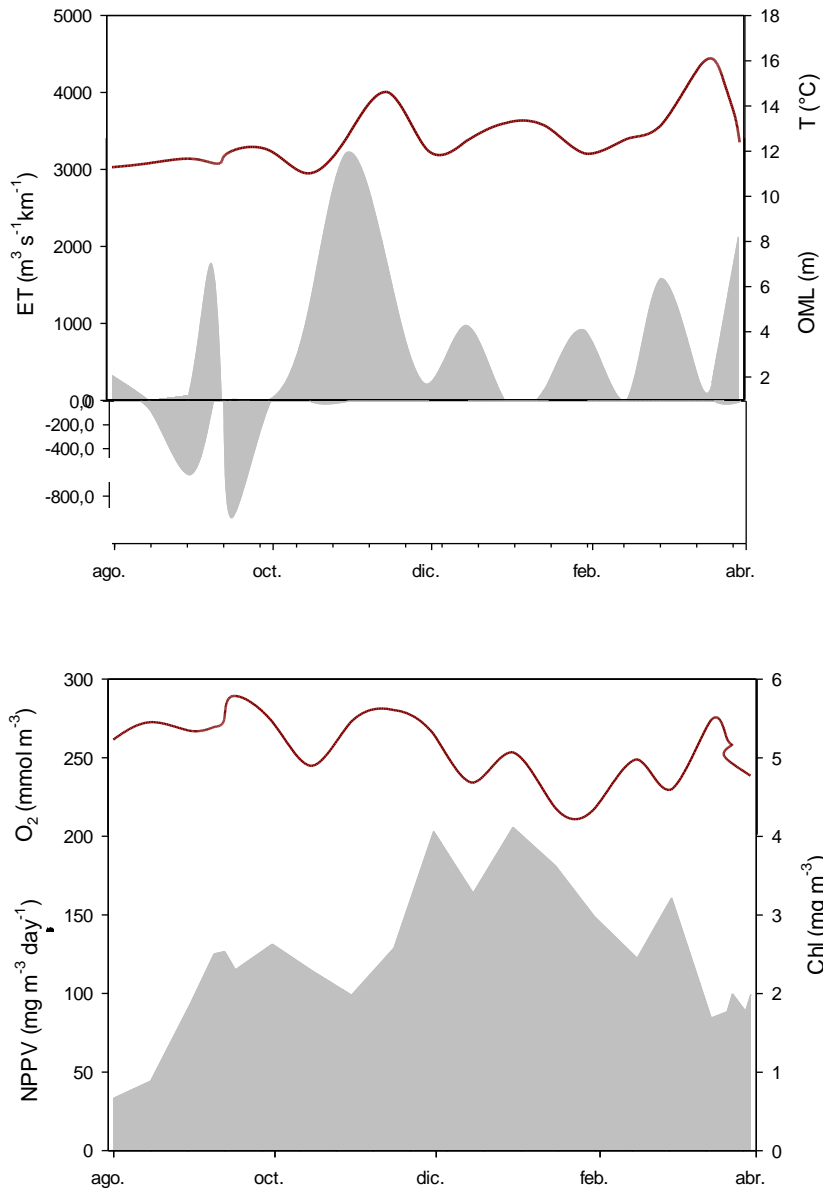


Figura 12: Fluctuación de la surgencia y de parámetros ambientales medidos. Con ET= Transporte de Ekman en $\text{m}^3\text{s}^{-1}\text{km}^{-1}$; T= Temperatura en $^{\circ}\text{C}$; OML= Profundidad de la capa de mezcla en m.; O_2 = Oxígeno superficial en mmol m^{-3} ; NPPV= Producción primaria neta ($\text{mg m}^{-3} \text{ día}^{-1}$) y Chl= Clorofila a en mg m^{-3} .

II.II. ACOUPLE BIOLÓGICO-AMBIENTAL

La ANOVA aplicada mostró que existen diferencias altamente significativas de SMR entre fechas (Tabla 5), con diferencias entre el tercer y cuarto muestreo (septiembre 2022 – diciembre 2022) (ANEXO). Mediante la ejecución del modelo lineal generalizado (GLM) se observa correlación de la SMR con todas las variables ambientales de forma significativa, explicando el 38% de la influencia ambiental sobre la tasa.

Estudiando detenidamente los parámetros ambientales forzantes de la SMR en función del tiempo (muestréos), se observa la Figura 13 una evidente separación de datos entre las semanas previas al evento de surgencia (agosto-septiembre 2023) y las posteriores (diciembre 2022 – marzo 2023), dividiendo al evento de surgencia en previa y surgencia misma; teniendo un bajo nivel de estrés ($0.05 < 1.0$), reafirmando la separación entre muestréos iniciales (1-3) a los consiguientes (4-9).

Tabla 5: ANOVA una vía para testear variabilidad de parámetros biológicos entre fechas (muestréos). G.L.=grados de libertad; F= Radio F; P=Probabilidad. **=altamente significativo.

VARIABLE	G.L.	F	P
SMR	8.28	3.18	0.01**
P _{CRIT}	5.6	5.08	0.036
ALPHA	8.28	6.70	<0.01**

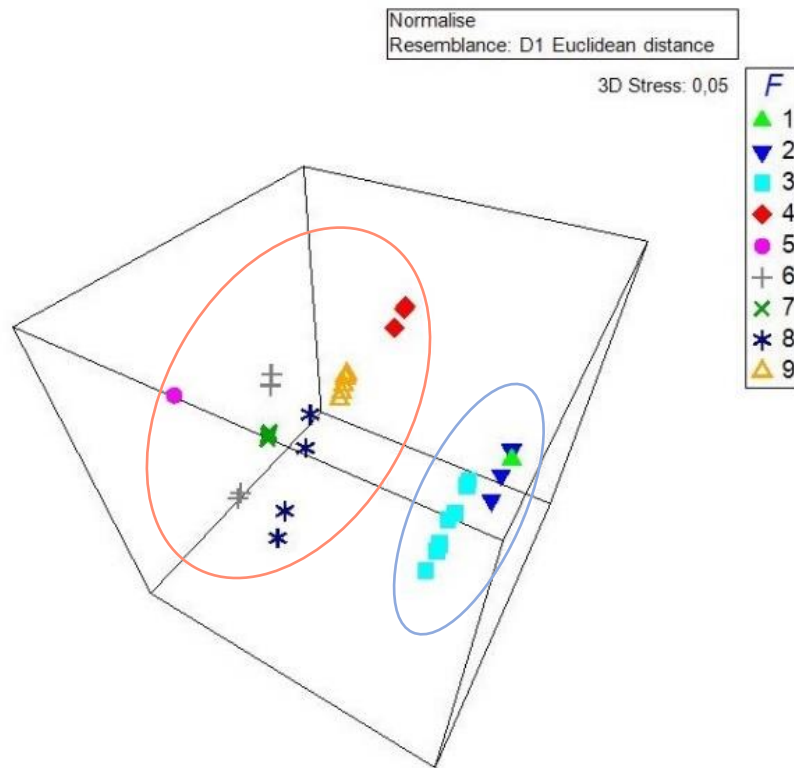


Figura 13: Escalamiento multidimensional (MDS) de SMR y parámetros ambientales. Con “F” Factor 1 al 9 como muestreos (agosto 2022 a marzo 2023). Se observa una clara separación de dos grupos indicando las condiciones particulares de semanas previas a la surgencia y otro grupo de transición y término de surgencia.

Luego, la realización de PCA (FIG. 14) indicó una relación directa de la SMR con el oxígeno superficial y la temperatura y una relación inversamente proporcional con el índice de surgencia. Este análisis segregó igualmente las fechas de inicio de surgencia de aquellas de surgencia activa y finalización (dimensión PC1 negativa y positiva respectivamente). Con esto se demuestra que SMR no es independiente de la variabilidad de surgencia.

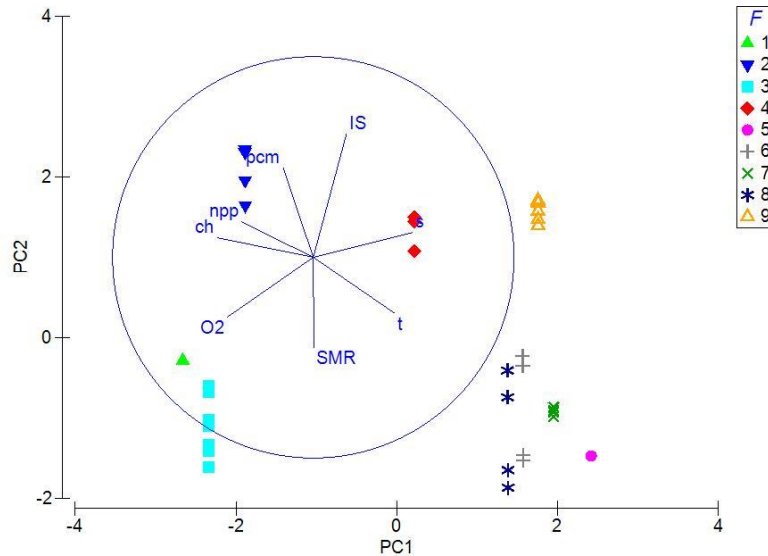


Figura 14: Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros ambientales influenciando sobre SMR. Se observa además la diferenciación de grupo entre los primeros 3 muestreos y el resto de los factores. Cada factor corresponde a un muestreo dentro del evento de surgencia.

Igualmente, la ANOVA de P_{CRIT} arrojó diferencias significativas entre muestreos (Tabla 5), difiriendo su magnitud en muestreo de 8 septiembre 2022 y el 28 marzo de 2023, del resto de valores iguales entre sí (ANEXO). Adicionalmente, el GLM mostró influencias significativas de la temperatura superficial, la salinidad superficial y la clorofila a superficial sobre el desarrollo de P_{CRIT} (FIG. 15). Los estudios dimensionales sobre el P_{CRIT} mediante MDS y PCA evidenciaron un leve agrupamiento del muestreo 2 y 8 (FIG. 16) anteriormente mencionado. Importante resaltar que los factores son los 6 muestreos que sí tuvieron respuestas regulatorias como tal, excluyendo en muestreo 1, 5 y 7.

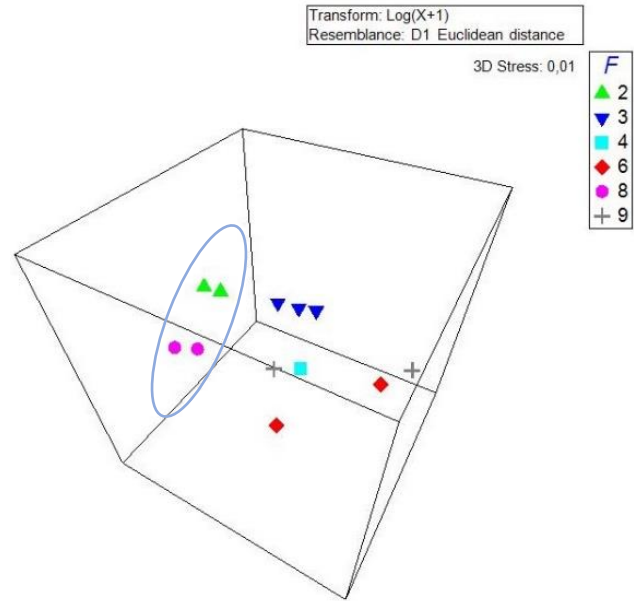


Figura 15: Escalamiento multidimensional (MDS) de P_{CRIT} bajo parámetros ambientales. Con factores como muestreos (septiembre 2022 a marzo 2023). El P_{CRIT} presenta similitud de grupos 2-8 en el modelo ocupado.

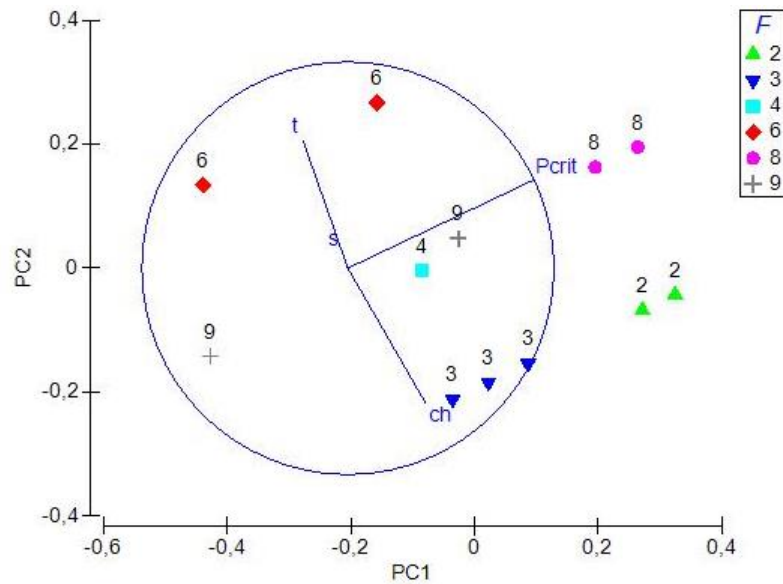


Figura 16: Análisis de Componentes Principales de los parámetros ambientales influenciando el P_{CRIT} . Se observa una relación inversamente

proporcional con la temperatura y salinidad, y directamente proporcional con la clorofila; los otros parámetros no mostraron influencias significativas (GLM). Se logra obtener una segregación visual de factores entre muestreo 2-8 y el resto de los valores.

Finalmente, α mostró diferencias significativas entre muestreos (TABLA 5), y mediante al modelo GLM se observó una relación significativa (positiva) con el oxígeno superficial ($F_{1,35}= 17,39$; $P<0,01^{**}$), siendo confirmado por el modelo GAM ($F_{2,18}= 9.03$; $P= <0.01^{**}$) (FIG. 17), explicando el 38.1% de la relación. Este resultado es discutible y abordado en las siguientes páginas de discusión.

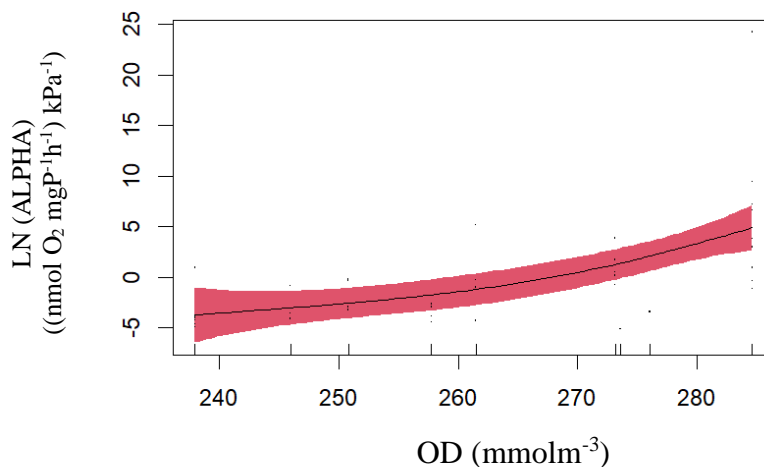


Figura 17: Modelo GAM de oxígeno disuelto superficial y α , mostrando una relación positiva significativa y de tipo exponencial. El α se encuentra como función LN con factor de suavizado de 1.78.

DISCUSIÓN

La presente investigación estudió detalladamente el comportamiento respiratorio de *Muggiaea atlantica*, junto a los parámetros de respuesta a la hipoxia, con el objetivo final de evaluar la capacidad de estos organismos para incursionar en aguas hipóxicas de surgencia, específicamente sobrepasando los límites de la ZMO. Al respecto, Rutterford & Thuesen (2005) describieron el comportamiento de *M. atlantica* como “oxiconformador”, con una estimación de un P_{CRIT} bajo (0.55 kPa), y sin calcular otros parámetros o aplicar otros modelos de ajuste que describan el comportamiento “anómalo” (paradoja de conformación con P_{CRIT}).

Es conocida la existencia de comportamientos experimentales adicionales a la regulación y conformación (ver Mangum & Winkle, 1973; Wood, 2018), así también se muestra en estudios sobre anémonas como *Bunodosoma cavernata* que tienden a tener un comportamiento de aumento y luego disminución del consumo de oxígeno con y sin exposición a la anoxia (Ellington, 1981). Esta tendencia de aumentar la tasa metabólica seguida a la conformación fue la predominante en muestras experimentales de la especie estudiada (Fig. 16A), donde aquel aumento de consumo de oxígeno pudo ser más o menos abrupto dependiendo del nivel de estrés que experimenten los individuos (variación en la pendiente).

Se confirma, entonces, la existencia de aumento en la tasa metabólica por estrés experimental asociado a respirometría, y estadísticamente se excluye

la hipótesis de existencia de otros comportamientos respiratorios, al menos en la especie estudiada en las condiciones descritas. También se excluye dentro del mismo trabajo la existencia de la tasa metabólica máxima teórica, ya que no se aplicaron factores de estrés ni alimentación más que la hipoxia por respirometría cerrada.

El comportamiento de estrés experimental observado puede deberse tanto a factores metodológicos como respuestas propias de cada individuo. Entre los métodos se discute el posible hacinamiento para la especie en particular y la exposición de tener cuatro nectóforos con colonias poligástricas (y monogástrica en eudoxias) en cada réplica; mientras que en las respuestas por individuo se puede mencionar la capacidad de huida y la frecuencia de ventilación. Previamente se ha reportado este comportamiento de “ventilación prolongada” en moluscos, cuyo comportamiento respiratorio se representa en una campana clásica de aumento progresivo de consumo hasta un P_{CRIT} que cae en conformación (Bayne, 1967); mientras que en medusozoa se ha propuesto la teoría de ventilación del velo (Rutherford & Thuesen, 2005) para afrontar la hipoxia, incrementando el área de intercambio gaseoso para realizar difusión simple como anémonas (Sassaman & Mangum, 1972)

Más recientemente, se ha descrito que las medusas y ctenóforos pueden almacenar oxígeno en el tejido mesogleal ante condiciones adversas, sustrayendo lentamente bajas concentraciones de oxígeno disponible en el ambiente (Thuesen et al., 2005). Sin embargo, se describe que la mesoglea decrece primero con la inanición (De Beer & Huxley, 1924), y el resultado siguiente a ella sería un aumento en el consumo de oxígeno, según las

observaciones de variabilidad de tasa-peso por Arai (1986) en *Aequorea victoria* y observaciones adicionales de inanición e hipoxia sobre Medusozoa por Thuesen & Childress (1994). Esto también podría justificar el aumento de consumo de oxígeno en normoxia e hipoxia en los individuos clasificados como “estrés”.

Cabe señalar que la metodología empleada fue a base de la optimización de los tiempos, recursos y conocimientos que hay de la especie. Por lo que, para resultados más precisos en cuanto a tasas metabólicas, se recomienda la innovación de medir individualmente ambas fases de los sifonóforos, para estudiar el comportamiento por individuo según los tamaños y la temporalidad.

Aquello describe una alta variabilidad intraespecífica en comportamientos individuales a las mismas condiciones de hipoxia, teniendo picos de “máximo estrés experimental” tanto en 10 kPa en el estrés progresivo. Sin embargo, los tres comportamientos observados y definidos, al llevarlos a comparaciones estadísticas, no varían significativamente, pudiendo esquematizar un comportamiento medio (Fig 16B) (el que se asemeja más al reportado por Rutherford & Thuesen (2005)) más que una oxiregulación.

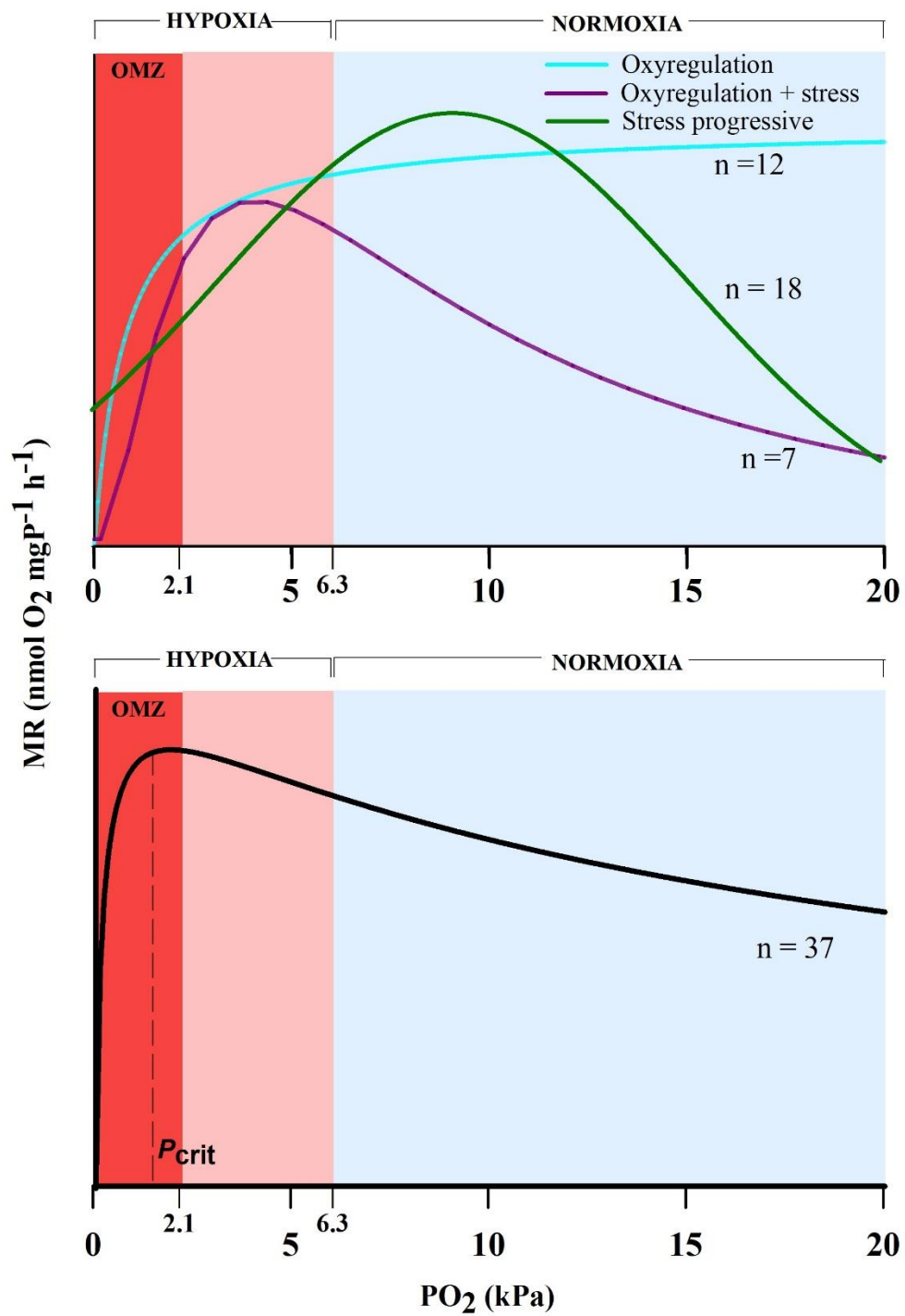


Figura 18: Diagrama teórico del comportamiento experimental de la respiración en *M. atlantica* (A) y su comportamiento promedio (B)

Las bases del conocimiento de fisiología en sifonóforos es escasa, aunque en medusozoa se han publicado varios estudios en función de determinar la tasa metabólica en algunas especies antes diferentes condiciones hipóxicas (Arai, 1986; Ikeda & Mitchell, 1982; Ikeda, 1970, 2014; Ikeda & Bruce, 1986; Ishii, & Tanaka, 2006; Kinoshita et al., 1997; Larson, 1987; Lilley & Lombard, 2015; Marshalonis & Pinckney, 2007; McCloskey et al., 1994; Morand et al., 1987; Purcell et al., 2010; Rajagopal, 1962;; Shimauchi & Uye, 2007; Thuesen & Childress, 1994; Verde & McCloskey, 1998). Únicamente se ha estudiado el metabolismo aeróbico y anaeróbico por Thuesen & Childress (1994) con fin de encontrar las proporciones de metabolismos enzimáticos y las vías alternativas a la respiración aeróbica en función a la profundidad, lo que puede dar una aproximación de las actividades enzimáticas en zonas oceánicas con bajo oxígeno disuelto.

En cuanto a los resultados aportados por la siguiente investigación, las SMR calculada en los experimentos (entre los comportamientos respiratorios) no fueron lo suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que la diferencia se debió a la variabilidad del muestreo aleatorio, concluyendo que existe solo un *pool* de SMR (de 7 a 12 $\text{nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1} = 0.043$ y $0.075 \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$), aunque se discute si corresponde incluir una SMR cuando se presenta una pendiente de estrés (M_E). Sin embargo, promediando los tres comportamientos, la SMR fue de $9.4 \pm 2.54 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$, lo que al estandarizar por la ecuación dos corresponde a $\sim 0.058 \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$, siendo éste el segundo valor más bajo reportado para Hydrozoa en sistemas de surgencia, y correspondiendo el mínimo a *Halitrephes maasi* con 0.046

$\mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$ en el Sistema de California (Thuesen & Childress, 1994).

De forma adicional, en esta investigación se incluyen nuevos parámetros para determinar estrés experimental: EMR y M_E , donde EMR no presentó diferencias significativas entre comportamientos (ni al evaluarlo con SMR), extendiéndose al máximo de estrés experimental y sobrepasando los $40 \text{ nmolO}_2\text{mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ en una réplica de regulación con estrés, sin que fuera significativamente distinto a la SMR.

Por otro lado, el P_{CRIT} reportado por Rutherford & Thuesen (2005) es la mitad del medido en esta investigación (a 10°C y 30 PSU versus 12°C y 33 PSU en la presente investigación), lo que mostraría que las diferentes poblaciones de *Muggiaea atlantica* tienen diferente tolerancia dependiendo de las condiciones oceanográficas asociadas a su nicho, siendo la especie más tolerante a la hipoxia estuarina que a la hipoxia traída por surgencia ($0.5 \neq 1.6 \text{ kPa}$). Importante es mencionar que los P_{CRIT} más bajos encontrados en aguas desoxigenadas traídas por surgencia corresponden a *Boreomysis californica*, *Pasiphaea emarginata* y *Euphausia mucronata* (0.42, 0.57 y 0.6 kPa respectivamente) (Wishner, 2018), ubicando a *Muggiaea atlantica* como tolerante a la hipoxia; presentando además variabilidad significativa de sus parámetros respiratorios entre muestreos (ANEXOS) lo que podría transformar a la especie más o menos hipoxia-tolerante dependiendo del momento del año que se estudie.

La capacidad suplementaria fisiológica de oxígeno “ α ” resultó ser la misma entre comportamientos. Y aunque α no se ha medido ni reportado

previamente en Hidrozoa (ni Medusozoa), Seibel & col. (2021) calcularon un valor medio de *M. atlantica* de 0.17 utilizando el P_{CRIT} de Rutherford & Thuesen (2005) en hPa y no kPa; lo cual corrigiéndolo sería de 1.27 $\mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1}$ al 35% de saturación de O_2 . Aquí, transformando el α medio resultante en el presente estudio ($\alpha=3.83$) a peso húmedo con el factor de la Ecuación 2, resulta $\alpha=0.03 \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1}$; siendo 0.09 $\mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}\text{PO}_2^{-1}$ el valor más bajo reportado en animales marinos en Seibel et al. (2021). Un α muy pequeño define una baja capacidad suplementaria de oxígeno lo que, junto a bajas tasas metabólicas, mejora la tolerancia a aguas frías (Pörtner et al., 2017). De forma adicional se propone que un valor muy bajo de α puede estar sujeto a la difusión simple, que morfológica y fisiológicamente incorpora menos oxígeno por unidad de tiempo y espacio que un metazoo con sistema circulatorio y/o branquial.

Temporalmente, se mostraron diferencias significativas en el α entre muestreos, lo que se contrapone a la teoría de Seibel & Deutsch (2001) que estandariza el valor de la capacidad suplementaria de oxígeno como pendiente única entre de las tasas metabólicas medidas. Sin embargo, teniendo un α variable durante el periodo de estudio, tampoco hay registros de la adaptabilidad morfológica específica o poblacional que pueda justificar la variabilidad de captación de oxígeno entre meses.

Respecto a la influencia ambiental en los parámetros medidos, se comprueba que tanto SMR, P_{CRIT} y α varían dentro del evento mismo de la surgencia, coincidiendo con la relación significativa de temperatura, salinidad y clorofila para las primeras dos. Estos datos ambientales son de suma

importancia ya que caracterizan las aguas emergentes (frías, salinas y nutritivas) desde el agua ecuatorial subsuperficial, las que suben desoxigenadas y extendiendo la ZMO en todas sus dimensiones. Y, aunque las relaciones lineales generalizadas y modelos aditivos muestran influencias significativas entre las variables ambientales, algunas no son consistentes con los paradigmas propios de la capacidad de suministro de oxígeno (Ver más en Seibel & Deutsch, 2020), principalmente α -O₂. Por definición a una alta presión de oxígeno existiría un bajo α (pendiente de conformación) por lo que obtenido por GML y GAM la relación directa entre estas variables, se declara que el oxígeno superficial puede no representar la condición in situ que experimentan los organismos y real concentración de oxígeno en la columna de agua (individuos extraídos de 80-0 m versus oxígeno disuelto (OD) superficial de 0-10 m).

Mencionado todo esto, la presente investigación entrega información trascendental para incluir a la especie al grupo de zooplancton hipóxico-tolerante, sobre todo siendo su presión crítica casi un 50% más baja que la presión de O₂ ambiental en la ZMO ($1.6 < 2.1$ kPa), y teniendo SMR tan bajas como las mencionadas anteriormente para un sistema de surgencia activo (Ver material suplementario desde Wishner et al., 2018). Finalmente, a determinados parámetros ambientales, por ejemplo frente a una mayor desoxigenación de la columna de agua, y una capa de mezcla y oxiclina más somera, la especie se comportaría de forma tolerante ante la extensión de la ZMO; además que los parámetros fisiológicos medidos son claves para aportar en el área de zooplancton presente en esta área y a futuro comprobar

la resistencia de la especie a las condiciones de desoxigenación proyectadas en un escenario futuro de calentamiento global.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio proveen evidencia que apoya la hipótesis de la presente investigación, ya que *M. atlantica*, en ambas fases de vida, posee comportamiento oxiregulador, llegando a tener un Punto crítico estimado en 1.6 ± 0.6 kPa (< 2.1 kPa).

El estudio también sugiere que *M. atlantica* tiene la capacidad aeróbica para incursionar en condiciones de hipoxia manteniendo tasa metabólica estándar de $9.4 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ ($0.058 \text{ } \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$), y junto a su P_{CRIT} , demuestran la tolerancia a zonas hipóxicas (30% saturación), e incluso a la ZMO del SCH (10% saturación).

Los resultados también sugieren una dependencia entre la respuesta metabólica de la especie y la variabilidad en condiciones oceanográficas modulada por la surgencia en una escala estacional e intra-estacional.

GLOSARIO

Bráctea: Palpos modificados con mesoglea engrandecida para la protección de gonóforos (sexuales) y boyantes.

Eudoxomas: Subunidades que forman o formarán parte de la eudoxia madura.

Fase Poligástrica: Estado de crecimiento entre larva y eudoxia, compromete nectosoma y sifosoma con grupos anclados de gastrozoides, palpos, brácteas y sacos de gonóforos (inmaduros).

Fase Eudoxia: Último estado antes de liberar los gonóforos medusoideos individuales maduros.

Gonóforo: Subunidad medusoidea sin tentáculos, en forma de cono que porta gametos femeninos o masculinos en desarrollo.

Hidroecio: cavidad hidroidal que aloja el vástago retraído con sus estructuras asociadas.

Hipoxia: Condiciones bajas de oxígeno. En el océano se considera que las zonas hipóxicas son aquellas que presentan concentraciones $<2\text{mlO}_2/\text{L}$.

Mesoglea: sustancia no celular, alojada entre el ectodermo y mesodermo de un hidrozooario. Éste forma el bulto de la umbrela de una hidromedusa

y una lamela como capa en hidroides.

Nectóforo: Estructura tipo campana natatoria, asexual, que está llena de gas y permite la flotabilidad del sifonóforo

Plánula: Larva propia de los cnidarios, ciliada, aplanada, con simetría bilateral, y de nado independiente

Somatocisto: parte cecal encontrada en la cavidad gástrica común de nectóforos calicofóridos.

Surgencia: Movimiento de aguas profundas hacia la superficie, las cuales son más frías y ricas en nutrientes que las aguas superficiales.

ABREVIACIONES

BSA = “Bovine Serum Albumine”, serum albúmina bovina

BSR = “Broken stick Regression”, regresión de punto de quiebre, asociado al cálculo de P_{CRIT}

CHL = “Chlorophyll a”, clorofila a superficial medida

EMR = “Stress metabolic rate”, tasa metabólica de estrés experimental

ET = “Ekman Transport”, transporte de Ekman (Surgencia)

GAM = “Generalized Additive Model”, modelo aditivo generalizado

GLM = “Generalized Linear Model”, modelo lineal generalizado

SCH = “Humboldt Current System”, Sistema de Corriente de Humboldt

LLO = “Line Low Oxygen”, función lineal de MO_2 medido a bajo PO_2

MDS = “Multidimensional Scaling”, Análisis multidimensional

MM = “Michaelis-Menten function”, función de Michaelis

MMR = “Maximum metabolic rate”, tasa metabólica máxima alcanzada por un individuo o especie

MO_2 = “Measured Oxygen”, tasa de consumo de oxígeno

NPPV = “Net Primary Production in the Vertical”, producción primaria neta a la vertical

SMR = “Standar Metabolic Rate”, tasa metabólica estándar

PCA = “Principal Component Analysis”, análisis de Componentes Principales

P_{CRIT} = “Critical oxygen tension”, presión crítica de oxígeno

$P_{\text{CRIT-SMR}}$ = “Critical oxygen tension associated to SMR”, presión crítica de oxígeno asociada a la tasa metabólica estándar

PO_2 = “Oxygen Partial Pressure”. Presión parcial de oxígeno

O_2 = Molécula de oxígeno

OD = Oxígeno disuelto

SST = “Sea Surface Temperature”

W= Función de Weibull, asociado al cálculo de P_{CRIT}

REFERENCIAS

- Alvariño, A. (1971) Siphonophores of the Pacific with a review of the world distribution. *Bulletin of Scripps Institution of Oceanography* 6: 1–432
- Alvariño, A. (1980) Reproduction seasons and day/night bathymetric distribution of three species of Diphyinae (Siphonophorae), off California and Baja California. In, *Developmental and cellular biology of coelenterates*, edited by P. Tardent & R. Tardent, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 33-38
- Arai, M. N. (1986). Oxygen consumption of fed and starved *Aequorea victoria* (Murbach and Shearer, 1902) (Hydromedusae). *Physiological zoology*, 59(2), 188-193
- Bayne, B. L. (1967). The respiratory response of *Mytilus perna* L. (Mollusca: Lamellibranchia) to reduced environmental oxygen. *Physiological Zoology*, 40(3), 307-313
- Blackett, M. (2016) Biology and ecology of the siphonophore *Muggiaea atlantica* in the northeast Atlantic (Doctoral dissertation, University of Southampton) 169 pp.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Carré, C., & Carré, D. (1991). A complete life cycle of the calyphoran siphonophore *Muggiaea kochi* (Will) in the laboratory, under different temperature conditions: ecological implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 334(1269), 27-32
- Chabot, D., Steffensen, J. F., & Farrell, A. P. (2016) The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 81-121
- Chappelle, G., & Peck, L. S. (1995). The influence of acclimation and substratum on the metabolism of the Antarctic amphipods *Waldeckia obesa* (Chevreux 1905) and *Bovallia gigantea* (Pfeffer 1888). *Polar Biology*, 15, 225-232.
- Christoffersen, B. (2019). rollRegres: Fast Rolling and Expanding Window Linear Regression. Version 0.1.3. <https://github.com/boennecd/rollRegres>
- Clarke, A., Holmes, L. J., & Gore, D. J. (1992). Proximate and elemental composition of gelatinous zooplankton from the Southern Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155(1), 55-68.
- Cunningham, J. T. (1892) On a species of siphonophore observed at Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United*

Kingdom, 2(3), 212-215

- D'Ambrosio, M., Primo, A.L., Pardal, M.A., Martinho, F., Guerrero, E. & S.C. Marques. (2019) Spatial distribution and seasonal patterns of the siphonophores *Muggiaea atlantica* and *Muggiaea kochii* in a temperate estuarine ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 218:179-187
- De Beer, G. R., and J. S. Huxley. (1924) Studies in de differentiation. V. De differentiation and reduction in Aurelia. *Quart.I. Microscop. Sci.* 68: 471-479.
- Decker, M. B., Breitbart, D. L., & Purcell, J. E. (2004) Effects of low dissolved oxygen on zooplankton predation by the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Marine Ecology Progress Series*, 280, 163-172
- Ekau, W., Auel, H., Pörtner, H. O., & Gilbert, D. (2010). Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7(5), 1669-1699
- Ellington, W. R. (1982). Metabolic responses of the sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc) to declining oxygen tensions and anoxia. *Physiological zoology*, 55(3), 240-249.
- Escribano, R., & Riquelme-Bugueño, R. (2015). Planktonic crustaceans: lifestyles in the water column. *Lifestyles and Feeding Biology*, 262

- Escribano, R., & Hidalgo, P. (2000). Spatial distribution of copepods in the north of the Humboldt Current region off Chile during coastal upwelling. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80(2):283-290
- Escribano, R., Hidalgo, P., & Krautz, C. (2009) Zooplankton associated with the oxygen minimum zone system in the northern upwelling region of Chile during March 2000. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16):1083-1094
- Granéli, E., & Turner, J. T. (2002) Top-down regulation in ctenophore-copepod-ciliate-diatom-phytoflagellate communities in coastal waters: A mesocosm study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 239: 57–68
- Hosia, A., Augustin, C.B., Dinasquet, J., Granhag, L., Paulsen, M.L., Riemann, L., Rintala, J.M., Setala, O., Talvitie, J., & Titelman, J. (2014) Autumnal bottom-up and top-down impacts of *Cyanea capillata* : A mesocosm study. *J. Plankton Res.* 37, 1042–1055
- Helly, J.J. & L.A. Levin. (2004) Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Research, Part I*, 51:1159-1168
- Herreid II, C. F. (1980) Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 67(3), 311-320
- Hydro-Bios Apparatebau GmbH (2024). Plastic Water Sampler PWS 5 L: Niskin-Type Plastic Water Sampler PWS. En línea:

https://www.hydrobios.de/en/product?product_id=114

- Ikeda, T. (1970). Relationship between respiration rate and body size in marine plankton animals as a function of the temperature of habitat. 北海道大學水産學部研究彙報, 21(2), 91-112.
- Ikeda, T. (1974). Nutritional ecology of marine zooplankton. Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 22(1), 1-97.
- Ikeda, T. (2014). Synthesis toward a global model of metabolism and chemical composition of medusae and ctenophores. Journal of experimental marine biology and ecology, 456, 50-64.
- Ikeda, T., & Bruce, B. (1986). Metabolic activity and elemental composition of krill and other zooplankton from Prydz Bay, Antarctica, during early summer (November–December). Marine Biology, 92, 545-555.
- Ikeda, T., & Mitchell, A. W. (1982). Oxygen uptake, ammonia excretion and phosphate excretion by krill and other Antarctic zooplankton in relation to their body size and chemical composition. Marine Biology, 71, 283-298.
- Ishii, H., & Tanaka, F. (2006). Respiration rates and metabolic demands of *Aurelia aurita* in Tokyo Bay with special reference to large medusae. Plankton and Benthos Research, 1(1), 64-67.
- Kinoshita, J., Hiromi, J., & Kadota, S. (1997). Do respiratory

metabolic rates of the scyphomedusa *Aurelia aurita* scale isometrically throughout ontogeny in a sexual generation?. *Hydrobiologia*, 347, 51-55.

- Muggeo, V. M. (2008). Segmented: an R package to fit regression models with broken-line relationships. *R news*, 8(1), 20-25.
- Kaartvedt, S., Rostad, A., & Klevjer, T. A. (2009) Sprat Sprattus sprattus can exploit low oxygen waters for overwintering, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 390:237–249
- Luo, J. Y. (2015) Gelatinous zooplankton in marine communities and ecosystems: Fine-scale horizontal and vertical distribution, trophic drivers, and contribution to global carbon cycling University of Miami. ProQuest Dissertations Publishing, 2015. 3746626
- Larson, R. J. (1987). Respiration and carbon turnover rates of medusae from the NE Pacific. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 87(1), 93-100.
- Lilley, M. K. S., & Lombard, F. (2015). Respiration of fragile planktonic zooplankton: extending the possibilities with a single method. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 471, 226-231.
- Mangum, C., & Winkle, W. V. (1973). Responses of aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. *American Zoologist*, 13(2), 529-541.

- Marshalonis, D., & Pinckney, J. L. (2007). Respiration rates of dominant hydromedusae in the North Inlet tidal estuary during winter and summer. *Journal of Plankton Research*, 29(12), 1031-1040.
- Martínez, I., Herrera, A., Tames-Espinosa, M., Bondyale-Juez, D. R., Romero-Kutzner, V., Packard, T. T., & Gómez, M. (2020). Protein in marine plankton: a comparison of spectrophotometric methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 526, 151357
- McCloskey, L. R., Muscatine, L., & Wilkerson, F. P. (1994). Daily photosynthesis, respiration, and carbon budgets in a tropical marine jellyfish (*Mastigias* sp.). *Marine Biology*, 119, 13-22.
- Møller, L. F. & Riisgård, H. U. (2007). Population dynamics, growth and predation impact of the common jellyfish *Aurelia aurita* and two hydromedusae, *Sarsia tubulosa* and *Aequorea vitrina*, in Limfjorden (Denmark). *Marine Ecology Progress Series*, 346, 153-165.
- Morand, P., Carré, C., & Biggs, D. C. (1987). Feeding and metabolism of the jellyfish *Pelagia noctiluca* (cyphomedusae, sемаеostomae). *Journal of Plankton Research*, 9(4), 651-665.
- Mueller, C. A. & Seymour, R. S. (2011). The regulation index: a new method for assessing the relationship between oxygen consumption and environmental oxygen. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 522-532.
- Muggeo, V. M. (2008). Segmented: an R package to fit regression models with broken-line relationships. *R news*, 8(1), 20-25.

- Pages, F. (1992). Mesoscale coupling between planktonic cnidarian distribution and water masses during a temporal transition between active upwelling and abatement in the northern Benguela system, *South African Journal of Marine Science*, 12:1, 41-52
- Pages, F., H. González, M. Ramón, M. Sobarzo & J.M. Gili. (2001). Gelatinous zooplankton assemblages associated with water masses in the Humboldt Current System, and potential predatory impact by *Bassia bassensis* (Siphonophora: Calycophorae). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 210: 13-24.
- Pages, F., & Orejas, C. (1999). Medusae, siphonophores and ctenophores of the Magellan region. *Scientia Marina*, 63(S1), 51-57
- Pages, F. & Gili, J. M. (1991a). Effects of large-scale advective processes on gelatinous zooplankton populations in the northern Benguela ecosystem. *Marine Ecology Progress Series* 75(2/3): 205-215
- Pages F. & Gili, J. M. (1991b). Vertical distribution of epipelagic siphonophores at the confluence between Benguela waters and the Angola Current over 48 hours. In: Williams R.B., Cornelius P.F.S.,
- Pages F. & Gili, J. M. (1992a). Siphonophores (Cnidaria, Hydrozoa) of the Benguela current (southeastern Atlantic). *Scientia Marina* 56(1): 65-112
- Pages F. & Gili, J. M. (1992b). Influence of Agulhas waters on the population structure of planktonic Cnidarians in the southern Benguela

Region. *Scientia Marina* 56(2-3): 109-123

- Palma, S. & Apablaza, P. (2004). Seasonal abundance and vertical distribution of the carnivorous gelatinous zooplankton in an upwelling area of the northern Humboldt Current System. *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 32: 49–70
- Palma, S. (2008). 7.1 Zooplankton distribution and abundance in the austral Chilean channels and fjords. N. Silva & S. Palma (eds.). 2008 Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 107-113
- Palma, S., & Rosales, S. (1997). Composition, distribution and seasonal abundance of macroplankton in Valparaíso Bay. *Investigaciones marinas*, 23: 49-66
- Palma, S. & Silva, N. (2004). Distribution of siphonophores, chaetognaths, euphausiids and oceanographic conditions in the fjords and channels of southern Chile. *Deep-Sea Research II* 51: 513–535
- Palma, S. & Silva, N. (2006). Epipelagic siphonophore assemblages associated with water masses along a transect between Chile and Easter Island (eastern South Pacific Ocean). *Journal of Plankton* 28(12): 1143-1151
- Palma, S., Apablaza, P., & Silva, N. (2007). Hydromedusae (Cnidaria) of the Chilean southern channels (from the Corcovado Gulf to the Pulluche-Chacabuco Channels). *Scientia Marina*, 71(1), 65-74

- Palma, S., Silva, N., Retamal, M. C., & Castro, L. (2011) Seasonal and vertical distributional patterns of siphonophores and medusae in the Chiloé Interior Sea, Chile. *Continental Shelf Research*, 31(3-4), 260-271
- Palma S., Retamal M.C., Silva N. & Silva C. (2014) Horizontal and vertical distributions of siphonophores in relation to oceanographic conditions in Chilean Patagonian fjords. *Scientia Marina* 78:339-351
- Pörtner, H. O., Bock, C., & Mark, F. C., 2017. Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*. 220(15): 2685-2696.
- Prinzing, T. S., Zhang, Y., Wegner, N. C., & Dulvy, N. K. (2021). Analytical methods matter too: Establishing a framework for estimating maximum metabolic rate for fishes. *Ecology and Evolution*, 11(15), 9987-10003.
- Prosser, C.L. (1973) *Comparative Animal Physiology*, 3rd ed. Saunders Company, Philadelphia, WB. 910 pp
- Purcell, J.E. (1982) Feeding and growth of the siphonophore *Muggiaea atlantica* (Cunningham 1893), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 62(1): 39-54
- Purcell, J. E. (2012) Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual review of marine science*, 4, 209-235

- Purcell, J.E. & Arai, M.N. (2001) Interactions of pelagic cnidarians and ctenophores with fish: a review. *Hydrobiologia*. 451:27–44
- Purcell, J. E., Uye, S. I., & Lo, W. T. (2007). Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series*, 350, 153-174
- Purcell, J. E., Fuentes, V., Atienza, D., Tilves, U., Astorga, D., Kawahara, M., & Hays, G. C. (2010). Use of respiration rates of scyphozoan jellyfish to estimate their effects on the food web. *Jellyfish Blooms: New Problems and Solutions*, 135-152.
- Rajagopal, P. K. (1962). Respiration of some marine planktonic organisms. In *Proceedings/Indian Academy of Sciences* (Vol. 55, No. 2, pp. 76-81). New Delhi: Springer India.
- Reemeyer, J. E., & Rees, B. B. (2019). Standardizing the determination and interpretation of P crit in fishes. *Journal of Experimental Biology*, 222(18), jeb210633
- Riquelme-Bugueño, R., Pérez-Santos, I., Alegría, N., Vargas, C. A., Urbina, M. A., & Escribano, R. (2020). Diel vertical migration into anoxic and high-p CO₂ waters: acoustic and net-based krill observations in the Humboldt Current. *Scientific Reports*, 10(1), 17181
- Roman, M. R., Brandt, S. B., Houde, E. D., & Pierson, J. J. (2019). Interactive effects of hypoxia and temperature on coastal pelagic zooplankton and fish. *Frontiers in Marine Science*, 6: 139

- Rutherford, Jr., L.D., & Thuesen, E.V. (2005) Metabolic performance and survival of medusae in estuarine hypoxia. *Marine Ecology Progress Series*, 294:189-200
- Sassaman, C., & Mangum, C. P. (1972). Adaptations to environmental oxygen levels in infaunal and epifaunal sea anemones. *The Biological Bulletin*, 143(3), 657-678
- Shimauchi, H., & Uye, S. I. (2007). Excretion and respiration rates of the scyphomedusa *Aurelia aurita* from the Inland Sea of Japan. *Journal of Oceanography*, 63, 27-34.
- Seibel, B. A., & Deutsch, C. (2020) Oxygen supply capacity in animals evolves to meet maximum demand at the current oxygen partial pressure regardless of size or temperature. *Journal of Experimental Biology*, 223(12), jeb210492
- Seibel, B. A., Andres, A., Birk, M. A., Burns, A. L., Shaw, C. T., Timpe, A. W., & Welsh, C. J. (2021) Oxygen supply capacity breathes new life into critical oxygen partial pressure (P crit). *Journal of Experimental Biology*, 224(8), 242210
- Schneider, W., Fuenzalida R., Garcés-Vargas J., Bravo, L. & Lange, C. (2006) Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern south Pacific Ocean. *Gayana (Concepción)*, 70(Supl. 1):79-82
- Stibor, H., Vadstein, O., Diehl, S., Gelzleichter, A., Hansen, T.,

Hantzsche, F., Katechakis, A., Lippert, B., Løseth, K., Peters, C., Roederer, W., Sandow, M., Sundt-Hansen, L. & Olsen, Y. (2004) Copepods act as a switch between alternative trophic cascades in marine pelagic food webs. *Ecol. Lett.* 7: 321–328

- Tang, P.-S. (1933) On the rate of oxygen consumption by tissues and lower organisms as a function of oxygen tension. *Quart. Rev. Biol.* 8, 260-274.

- Thermo Fisher Scientific, 2023. “New document for Bradford Protein Assay Kit.” Enlace: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011181_Coomassie_Bradford_Protein_Assay_UG.pdf

- Thibault-Botha, D., Johann R. E. Lutjeharms, & M. J. Gibbons (2004) Siphonophore assemblages along the east coast of South Africa; mesoscale distribution and temporal variations, *Journal of Plankton Research*, Volume 26 (9): 1115–1128

- Thiel, M., Macaya, E., Acuña, E., Arntz, W., Bastias, H., Brokordt, K., Thomas, A. Vargas; J. Vasquez & Vega, J. (2007). The Humboldt Current System of northern-central Chile: oceanographic processes, ecological interactions and socio-economic feedback. *Oceanography and Marine Biology*, 45:195–345

- Thuesen, E. V., & Childress, J. J. (1994) Oxygen consumption rates and metabolic enzyme activities of oceanic California medusae in

relation to body size and habitat depth. *The biological bulletin*, 187(1), 84-98

- Thuesen, E. V., Rutherford, L. D., & Brommer, P. L. (2005) The role of aerobic metabolism and intragel oxygen in hypoxia tolerance of three ctenophores: *Pleurobrachia bachei*, *Bolinopsis infundibulum* and *Mnemiopsis leidyi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(3), 627-633
- Totton, A. K. (1965) A synopsis of the Siphonophora. British Museum (Natural History), London. 232 pp.
- Ulloa, R., Palma, S., Linacre, L. & Silva, N. (2000) Seasonal changes in the bathymetric distribution of siphonophores, chaetognaths and euphausiids associated to water masses off of Valparaíso, Chile (Southeast Pacific). In Farber, J. (ed), *Oceanography of the Eastern Pacific I*. CICESE, Ensenada, pp. 72-83.
- Verde, E. A., & McCloskey, L. R. (1998). Production, respiration, and photophysiology of the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana* symbiotic with zooxanthellae: effect of jellyfish size and season. *Marine Ecology Progress Series*, 168, 147-162.
- West, E.J., Pitt, K., Welsh, D.T., Koop, K., & Rissik, D. (2009). Top-down and bottom-up influences of jellyfish on primary productivity and planktonic assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 54, 2058–2071
- Wishner, K. F., Seibel, B. A., Roman, C., Deutsch, C., Outram, D.,

Shaw, C. T., Birk, M. A., Mislán, K. A. S., Adams, T. J., Moore, D., et al. (2018) Ocean deoxygenation and zooplankton: Very small oxygen differences matter. *Sci. Adv.* 4, 12.

- Wood, C. M. (2018). The fallacy of the P crit—are there more useful alternatives?. *Journal of Experimental Biology*, 221(22), jeb163717.
- Wyrki, K. (1962) The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep-Sea Research* 9:11-23.

SATELITAL:

E.U. Copernicus Marine Service Information (2023) Global Ocean Physics Analysis and Forecast DOI: <https://doi.org/10.48670/moi-00016>
Sea water salinity[10⁻³]
Sea water potential temperature[°C]
Ocean mixed layer thickness defined by sigma theta[m]

E.U. Copernicus Marine Service Information (2023) Global Ocean Biogeochemistry Analysis and Forecast. DOI: <https://doi.org/10.48670/moi-00015>
Net primary production of biomass expressed as carbon per unit volume in sea water[mg/m³/day]
Mass concentration of chlorophyll a in sea water[mg/m³]
Mole concentration of dissolved molecular oxygen in sea water[mmol/m³]

NOAA/NESDIS/CoastWatch/West Coast Node,
NOAA/NMFS/SWFSC/ERD (Dataset ID: erdQCwindproducts1day) (2023) Merge Windspeed, Stress, Curl, Divergence, and Ekman Upwelling, Metop-C ASCAT, 0.25 degree, Global, Near Real Time, 2020-present, 1-Day Composite.
<https://coastwatch.pfeg.noaa.gov/erddap/griddap/erdQCwindproducts1day.html>
ekman_current_v (Meridional Wind Diffusivity Current, m s⁻¹) ?
wind_v (Meridional Wind, m s⁻¹)

ANEXOS

From: **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** <em@editorialmanager.com>

Date: Thu, 21 Mar 2024 at 13:50

Subject: JEMBE-D-24-00065 - Confirming your submission to Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

To: Mauricio Urbina <mauriciourbin@gmail.com>

This is an automated message.

METABOLIC ADAPTIVE RESPONSE OF THE SIPHONOPHORAE MUGGIAEA ATLANTICA TO VARIABLE OXYGEN CONDITIONS IN A COASTAL UPWELLING SYSTEM

Dear Professor Urbina,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. It has been assigned the following manuscript number: **JEMBE-D-24-00065**.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jembe/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).#AU_JEMBE#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.

METABOLIC ADAPTIVE RESPONSE OF THE SIPHONOPHORAE *MUGGIAEA ATLANTICA* TO VARIABLE OXYGEN CONDITIONS IN A COASTAL UPWELLING SYSTEM

Constanza Larson-Paredes¹, Mauricio Urbina^{2,4*}, Rubén Escribano^{3,4}

1 Graduate Program of Oceanography, Department of Oceanography, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, Universidad de Concepción, Chile

2 Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, Universidad de Concepción, Chile

3 Department of Oceanography, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, Universidad de Concepción, Chile

4 Millennium Institute of Oceanography, Universidad de Concepción, Chile

*Corresponding author e-mail: mauriciourbina@udec.cl

ABSTRACT

Muggiaea atlantica is one of the most abundant species of the gelatinous zooplankton in coastal upwelling systems with highly variable oxygen conditions upon presence of a shallow oxygen minimum zone (OMZ). The respiratory behavior of this species and its adaptive responses to fluctuating hypoxic/normoxic conditions in such upwelling zones are however unclear. In this work, individuals (nectophore as polygastric phase, and eudoxia as monogastric phase) were captured in central-southern Chile (36°30' S) during August 2022 and March 2023 and subjected to respirometry measurements in laboratory conditions. The physiological

parameters standard metabolic rate (SMR), the critical oxygen partial pressure (P_{crit}), and the oxygen supply capacity (α) were estimated and their potential relationship with sea surface temperature, surface oxygen, surface salinity, surface chlorophyll-a, and the mixing layer depth, obtained from satellite data, was assessed. Mean SMR was $9.4 \pm 2.54 \text{ nmolO}_2 \text{ mg Proteins}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\sim 0.06 \mu\text{mol O}_2 \text{ g WW}^{-1} \text{ h}^{-1}$), P_{CRIT} was $1.6 \pm 0.60 \text{ kPa}$, and mean α was $5.4 \pm 1.74 \text{ nmol O}_2 \text{ mg Proteins}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ ($\sim 0.03 \mu\text{mol O}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ PO}_2^{-1}$). SMR as a function of oxygen partial pressure showed oxyregulation, although with several replicates having oxygen consumption above the SMR (68% of the measurements), implying a "stress" response. SMR was significantly correlated to all the environmental variables, including the upwelling intensity, while P_{crit} was correlated to temperature, oxygen, and Chlorophyll-a. The parameter α was only found associated with *in situ* oxygen (superficial oxygen). Our findings indicated that *M. atlantica* can tolerate severe hypoxia in the upwelling zone, but this capacity varies extensively seasonally and intra-seasonally due to a highly fluctuating wind-driven upwelling. In scenarios of deoxygenation due to climate change, *M. atlantica* could potentially dominate the water column more extensively and persistently.

Key Words: Metabolic Rate, Hypoxia, Gelatinous Zooplankton, Upwelling, Oxygen Minimum Zone, Chile

GLOSARY

Critical oxygen tension (P_{CRIT}): It is defined as the level of ambient oxygen at which an organism is unable to sustain oxygen consumption independently of the environment and decreases as a function of ambient oxygen. Quantified as the critical oxygen

pressure (kPa).

Hypoxia: It refers to a condition in which the environment experiences insufficient levels of oxygen to support life. In marine environments, hypoxia is defined as oxygen concentrations lower than $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (30% oxygen saturation), and severe hypoxia occurs at $0.67 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (10% oxygen saturation).

Metabolic rate (MR): The rate of aerobic energy usage, estimated from oxygen consumption. Quantified as the mass-specific metabolic rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Oxygen supply capacity (α): The maximum amount of oxygen that can be supplied per unit time and oxygen pressure. Quantified as the mass-specific metabolic rate at the critical oxygen pressure ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$).

Standard Metabolic Rate (SMR): refers to the fasted and resting metabolic rate at a specified temperature. Quantified as the 10% percentile of the data between acclimation and twice the P_{CRIT} .

Stress metabolic rate (EMR): Experimental stress metabolic rate measured without applying stress factors that increase metabolic activity in the experimental design. It is calculated with the top 10% percentile of each MR. Quantified as the mass-specific metabolic rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

1. INTRODUCTION

Ongoing climate change is favoring a gradual decrease of dissolved oxygen in the world ocean (Schmidtko et al., 2018), with mayor ecological consequences for aquatic animals (Breitburg et al. 2018). Climate driven ocean deoxygenation also exacerbate the seasonal and intra-seasonal coastal hypoxia due to a highly fluctuating wind-driven upwelling, particularly in coastal areas having a shallow oxygen minimum zone (OMZ), which has also been suggested to become vertically expanded in the future ocean (Stramma et al.

2012). Under these projected conditions, understanding potential physiological and adaptive responses of marine organisms to future hypoxia is critical. However, studies of metabolism in coastal upwelling regions are scarce or of limited scope, especially for basal components of the marine food web, such as planktonic organisms (Riquelme-Bugueño et al. 2020).

Gelatinous zooplankton have been predicted to increase in abundance upon ocean warming (Purcell, 2012), yet it is not clear how they can cope with projected low-oxygen conditions in upwelling zones. For instance, some gelatinous zooplankton (e.g. Siphonophora, Hydromedusae, and Ctenophora,) are known to avoid low-oxygen waters (Palma & Apablaza, 2004), although other species (*Aequorea aequorea* and *Clytia gregaria* observed in the Saanich Inlet of British Columbia) appear to be well adapted to withstand stable hypoxic conditions ($DO < 60 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$, ~ 30% saturation of O_2) (Davis, 1975; Mackie & Mills, 1983). Some other species appear as permanent residents within OMZ's ($DO < 20 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$, ~10% saturation of O_2) (Childress & Seibel, 1998), exhibiting low metabolic rates compared to other invertebrates (Arai, 1986; Ishii, & Tanaka, 2006; Schneider, 1992; Shimauchi & Uye, 2007), and thus being able to maintain their growth and reproduction under hypoxic conditions (Grove & Breitburg, 2005; Ishii et al., 2008).

The metabolic response to hypoxia in gelatinous organisms is not well understood in areas subjected to a shallow OMZ, and therefore it is extremely difficult to Metabolic rate (MR), the critical oxygen partial tension (P_{CRIT}), and the existence of metabolic suppression in 12 species of medusae subjected to estuarine hypoxia has been studied (Rutherford & Thuesen, 2005), providing the bases to assess the capacity of this group to withstand low oxygen water. In these

studies, the authors describe an oxygen-regulatory behavior i.e. individuals that maintain a low MR down to their P_{CRIT} (Prosser, 1973), as found in *Aurelia labiata*, *Cyanea capillata*, *Phacellophora camtschatica*, *Aquorea victoria*, *Polyorchis penicillatus*, and *Proboscidactyla flavicirrata*. Contrastingly, other hydromeduses were found to be oxygen-conformers (i.e. they reduce the oxygen consumption with decreasing oxygen levels (Prosser, 1973)), such as *Euphysa flammaea*, *Halitholus sp.*, *Sarsia sp.*, *Clytia gregaria*, *Eutonina indicans*, and also *Muggiaea atlantica*. Even that, how these species can adjust their MR and P_{CRIT} to changing hypoxia caused by upwelling continues to be an open question.

The siphonophore *Muggiaea atlantica* (Cunningham, 1892) is a dominant gelatinous species in the highly productive Humboldt Current system (Pages et al., 2001; Palma & Silva, 2006; Ulloa et al., 2000), Benguela Current (Pages & Gili, 1992) and Agulhas Current (Thibault-Botha et al., 2004). This species prevails during active upwelling periods (spring-summer), but also remaining abundant throughout the winter in lower densities. The species is considered a major predator in near-surface water, mostly preying on copepods (Purcell, 1982). This species also tends to aggregate above the thermocline and hence above the OMZ without performing diel vertical migration (Palma & Apablaza, 2004), and therefore apparently avoiding the OMZ. However, Rutherford & Thuesen (2005) estimated their P_{CRIT} as low as 5.5 hPa (0.55 kPa = 3% saturation) in estuarine conditions. A low P_{CRIT} , (≤ 4 kPa), according to Childress & Thuesen (1998), along with a low oxygen consumption under hypoxia (mean MR in Hydromedusae of $0.78 \mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, Rutherford & Thuesen, 2005), would indicate a high tolerance to hypoxia, and hence a potential capacity to enter the OMZ. This potential capacity however has not been assessed in upwelling zones in which the upper border of the OMZ can intrude

near-surface water (upper 20 m) upon intense upwelling (Gilly et al., 2018). Thus, the metabolic response of *M. atlantica* as environmental oxygen decreases, is crucial to assess in the context of gradual deoxygenation of the ocean, and the OMZ expansion towards predicting their population dynamics under a changing ocean.

In this work, we experimentally assessed the metabolic response of *M. atlantica* to variable oxygen levels in the coastal upwelling system of central-southern Chile between August 2022 and March 2023, mostly during the austral spring-summer conditions (upwelling season). We aimed at evaluating whether this species has developed a metabolic adaptation to hypoxia by adjusting either their MR or P_{CRIT} , or both. Ultimately, we addressed the question on whether this species will have the ability to cope with increasing hypoxia, and thus having the capacity to become a dominant gelatinous component in the upwelling zone upon a potentially expanded OMZ.

2. METHODS AND MATERIALS

2.1. Field sampling and experimental design

Individuals of *M. atlantica* were obtained in the Bay of Coliumo (36°30' S – 73°00' W) in the upwelling zone of central-southern Chile during 2022 and 2023 (Fig. 1). Sampling was performed using a 0.5 m opening diameter WP-2 zooplankton net, equipped with a 200 microns mesh-size net. The net was vertically towed at low speed ($<0.5 \text{ m s}^{-1}$) from either 80 m or 40 m to surface. A total number of 9 field trips were carried out between August 2022 and March 2023. The samples were maintained in coolers and

transported to the laboratory within less than one hour.

Individuals *M. atlantica* of the two reproductive phases of, nectophores and eudoxias were sorted and identified from the samples under a microscope and kept in filtered seawater (0.2 μm) in a cold room at dark. Thereafter incubations for close respirometry experiments were performed in glass respirometric chambers (2 ml).

The experimental design consisted in incubations in respirometric chambers with 4 nectophores or 6 eudoxias each, and a control without animals. Experiments with nectophores were replicated 30 times ($n=30$), while eudoxias were replicated 7 times ($n=7$) with their corresponding control each time. Sensors were calibrated prior to each day of measurement (9d) by measuring 0% oxygen saturation in a solution of water with sodium tiosulphite, and up to 100% saturation with aerated distilled water at room temperature. A robust sensor (PyroScience Optical oxygen) was inserted inside each respirometry chamber, along with a temperature sensor, on the main water bath, allowing oxygen concentration recordings every 15 minutes. A mixing device was not applied because of the size of the chambers and the fragility of the individuals. Each experiment began with a 4 hours acclimatation to laboratory conditions (12°C; ~34.5 PSU), followed by respirometry incubations ranging from 12 to 48 hours. The incubations were carried out in thermoregulated baths with temperature kept at 12 ± 0.5 °C.

At the end of incubation, individuals were kept at -20°C until protein quantification performed at ambient temperature using the MicroBradford method (Bradford, 1976). Previously, a standard curve was obtained by serial dilutions of a Bovine Serum Albumine (BSA) standard at 2 $\mu\text{g m L}^{-1}$. Samples were homogenated on a known volume of homogenizing buffer (PBS = Phosphate Buffered

Saline), following the protein ratio calculated in *Diphyes* sp. (Family Calycophorae) by Clarke et al. (1992). The volume of each sample together with the dye was mounted on microplates in a 1:1 ratio, and after 10 minutes the absorbance (590 nm) was read using BMG Labtech's Spectrostar Nano Microplate Spectrometer. The protein concentration of each sample was calculated using the BSA calibration curve.

Data were visualized in Pyro Oxygen Logger 3319 Software, while oxygen consumption (=MR) was calculated in Microsoft Excel template as the slope of oxygen respiration in time, accounting for the chamber volume in liters, giving the micromolar concentration of oxygen per chamber. In parallel, the rate of oxygen consumed by microbial respiration was calculated from the control chambers, deriving the slope of respiration, and subtracting it from the hourly sample oxygen consumption. The result was recalculated at nanomolar concentration and standardized by individuals (n) or by biomass estimated in mg of proteins (mg P).

2.2. Data Processing and Analyses

The standard metabolic rate (SMR) was calculated using the lowest 10th percentile of the data between the start of the experiment and a PO_2 twice the P_{CRIT} (Chabot et al., 2016). The P_{CRIT} was calculated using the RStudio software with the Segmented package (Mugeo, 2008) for all regulatory replicates (Toro-Chacon et al., 2021; Prinzing et al., 2021). Following Seibel et al. (2021), the alpha (α) calculation for the entire conformity slope was included as $\alpha=MR/PO_2$ up to its P_{CRIT} .

Due to respirometry stress in some replicates, we found an experimental maximum metabolic rate called the 'Experimental Progressive Stress Rate (EMR), which was assumed as representing

the maximum metabolic rate reached by a replicate without applying a specific stress factor in the respirometry design. EMR for non-oxyregulation individuals was calculated using the highest 10th percentile, while the resulting stress slope (ME) was calculated using the 80% of data between SMR and EMR

2.3.Environmental Setting

Environmental information from the sampling area was obtained from satellite databases for the sea surface temperature (SST in $^{\circ}\text{C}$), sea surface salinity (PSU), surface chlorophyll-a (Chla in mg m^{-3}), net primary production (NPP in $\text{mg m}^{-3} \text{d}^{-1}$), surface dissolved oxygen (DO in mmol m^{-3}), and mixed layer depth (MLD in m). These data were extracted from the Global Ocean Physics/Biogeochemistry Analysis and Forecast resource from COPERNICUS (2023). Additionally, the upwelling index was calculated from Ekman transport (UI in $\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{s}^{-1}$) as obtained from meridional wind data extracted from Merge Windspeed, Stress, Curl, Divergence, and Ekman Upwelling, Metop-C ASCAT from NOAA (2023). The latter parameter was calculated using the following equation: $\text{UI} = \text{wind stress (ty)} / \text{Coriolis parameter (f)}$, where ty is $\text{air density} \times \text{gradient constant} \times \text{wind component}$, and f is $2 \times \text{angular velocity} \times \sin(\text{latitude})$. These components were extracted for each fortnight from the beginning of August 2022 to the end of April 2023 to assess the complete variability of the 2022-2023 upwelling period (austral spring-summer). Additionally, the criteria to define of normoxia, hypoxia and OMZ conditions based on oxygen concentrations were assumed as those suggested by Ekau et al. (2010).

2.4. Statistical Analyses

Analysis of variance (ANOVA) was used to test differences between respiration behaviors, also to compare sampling dates. Previously, normality and homoscedasticity tests were applied to data utilizing specifically the Shapiro-Wilk test for normality and Levene test for homogeneity of variances. A one-way ANOVA test allowed comparisons for SMR and LN (SMR), whereas for EMR and α , the non-parametric Kruskal-Wallis test was employed, and the slopes of aerobic stress (mE) were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test. The latter was performed to study the means and variance of the parameters among each behavior. P_{CRIT} was not compared between non-regulating behavior curves. It was decided that, in the presence of classical regulation or conformation (without stress), parameters would be correlated with environmental data. This included correlating the biomass with P_{CRIT} , studying significant differences between variables to assess size segregation. A stepwise generalized linear model (GLM) and a general additive model (GAM) were applied to each standardized physiological parameter: LN(SMR), $\text{Log}(P_{\text{CRIT}} + 1)$, and LN(α) to assess the influence of environmental variables. Finally, to assess multivariate effects on metabolism, a Principal Component Analysis (PCA) and multidimensional analysis (MDS) were performed.

3. RESULTS

3.1. Metabolic responses

The best fitted equations for each behavior resulted in a classical regulation which was fitted as a hyperbola, regulation with progressive stress fitted as a three-parameter normal logarithm, and progressive stress behavior fitted with a three-parameter Gaussian

function (details in S1 Suppl. Mat.). The functions, equations and parameters are shown in Table 2.

The plot of fitted functions are shown in Fig. 2. It is important to note that estimated parameters of the three equations represent different terms of the functions and therefore they are not statistically comparable. A greater dispersion towards a higher MR was observed in oxyregulation plus stress, exceeding 40 nmolO₂ mgP⁻¹h⁻¹ although the curve was adjusted to a maximum of nearly 10 nmolO₂ mgP⁻¹h⁻¹. Regarding the oxyconformation phase, it aligns close to 2 kPa on the oxyregulation curve and the oxyregulation plus stress, while the progressive stress phase tended to conform around the mean of 8 kPa. The proportion of each behavior was 32% for oxyregulation, 19% for oxyregulation plus stress, and 49% for stress progressive. Regarding the treatments 83% corresponded to individual nectophores. For the effects of respiratory behaviors, the two treatments are not excluded in the parameter analysis.

The metabolic rate in normoxic conditions showed a variation around 10 nmol (4 to 40 nmolO₂ mgP⁻¹ h⁻¹) in experimental data (Fig. 2), with a mean SMR of 9.24 ± 2.54 across the three behaviors. In addition, during the oxyregulation, two groups of respiratory behaviors were distinguished, a first group with a SMR between 4 and 7.5 nmolO₂ mgP⁻¹ h⁻¹, and a second group over 12 nmolO₂ mgP⁻¹ h⁻¹ (Fig. 3).

α had a mean of 5.4 nmolO₂ mgP⁻¹h⁻¹PO₂⁻¹ among the three responses, whereas the stress slope (m_E) was evidently stronger in progressive stress than in oxyregulated plus stress. The physiological parameters (SMR, EMR, α) were not significantly different among the three behaviors according to ANOVA (P= 0.078; 0.414; 0.078, respectively). Only the stress slope (m_E)

showed significant differences ($P = 0.043$). Mann-Whitney test showed no significant differences between SMR and EMR ($P=0.06$) (details shown in S2 Suppl. Mat.).

3.2. Environmental influences

An intensified upwelling ($ET \sim 2000 \text{ m}^3 \text{kg}^{-1} \text{s}^{-1}$) was observed between November 2022 and January 2023, with minor oscillations before and after this period. Likewise, the first peak of surface temperature was observed in November (14.6°C) and the second and strongest in March 2023 (15.9°C). The mixing layer remained homogeneous at depth between 10 and 11 m depth during the period, except in September 2022 when it deepened down to 13 m. Net primary production increased from September 2022 to February 2023 ($126 - 205 \text{ mg m}^{-3} \text{ day}^{-1}$), with fluctuations in between and at the end of the summer 2023; however, chlorophyll (Chla) showed a primary peak of 4.2 mg m^{-3} in late September 2022 and another peak of 4.9 mg m^{-3} between December 2022 and January 2023, decreasing in the subsequent months. Dissolved oxygen in the ocean oscillated, falling to its minimum of about 200 mmol m^{-3} in February 2023.

The conditions of the study period were correlated to the SMR through the MDS analysis (Fig. 4). This analysis shows an evident grouping of data between the initial sampling (August-September 2022) and the subsequent samplings (December 2022 - March 2023), and so splitting the environmental conditions into the beginning and mid-end of the study period. The same analysis for P_{CRIT} yielded no data segregation. When applying GLM/GAM methods to correlate physiological parameters with environmental variables, the best model applied explained 38% of the variability in metabolic rate due environmental drivers.

A Principal Component Analysis (PCA) indicated an association of SMR with surface oxygen and surface temperature, and an inversely proportional relationship with the upwelling index and the mixing layer depth. This analysis also segregated the onset dates of upwelling from those of active upwelling and ending (negative and positive PC1 dimensions, respectively). It was found that SMR was modulated by upwelling variability. At the same time, the PCA for P_{CRIT} showed a inversely proportional relationship with temperature and salinity, and directly proportional with CH; the other variables did not show significant influences (GLM).

In addition, α showed only a significant and positive relationship with surface oxygen ($P < 0.01$) according to the GLM, being confirmed by the GAM analysis (smoothed). All the other environmental variables did not show significant effects on α . Since surface oxygen may not represent the actual oxygen below the mixed layer where animals were captured, a correlation with α was not performed.

4. DISCUSSION

The present study is the first one exploring the respiratory responses to hypoxia in *M. atlantica*. It also provides the first estimates of respiratory responses (oxyregulation) and metabolic rate of the group medusozoa, with the goal of evaluating their capacity to incursion into hypoxic upwelling waters and so exceeding the limits of the OMZ.

Regarding adaptation to hypoxia, Rutherford & Thuesen (2005) described the behavior of *M. atlantica* as "conforming" to the lowest P_{CRIT} in their experiments (0.5 kPa), although their data as shown in

their graphs show a regulation behavior with a marked P_{CRIT} . Furthermore, other authors have reported "stress" behaviors (Mangum & van Winkle, 1973; Herreid, 1980), although they did not provide other quantitative parameters, such as "stress rate" or a "maximum experimental stress" when adjusting their models. In our work, the behavior of *Muggiaea atlantica* as regulatory is described, although 68% of the replicates presented some degree of stress (Fig. 6). The stress behavior observed in some replicates may obey to some variation in physiological responses at the individual level, but they could also be the result of overcrowding in the experimental containers, as densities were higher than those found in their natural environment, and the exposure of having four nectophores with polygastric colonies (and monogastric in eudoxia) in each replicate. A high density can lead to friction due to stinging zooids among individuals within the same chamber. Although cannibalism has not been reported in the species, the proximity of cnidobands from the tentacles could lead to additional stress. At individual level, a double ventilation system due to the jellyfish velum has been described (Thuesen et al. 2005), which could also explain the increase in oxygen consumption (or stress) increasing swimming rate and muscular movement. This mechanism has indeed been proposed as a response to deal with hypoxia, by increasing the area of gas exchange to perform simple diffusion as in anemones (Sassaman & Mangum, 1972) and in ctenophores (Thuesen et al. 2005). It is also possible that oxygen consumption can increase since jellyfish and ctenophores can store oxygen in mesoglea tissue under adverse conditions, and so slowly subtracting low concentrations of available oxygen (Thuesen et al. 2005; Rutherford & Thuesen, 2005). In parallel, the depression of the metabolic rate is hypothesized to reach lethargy in fishes (Barham, 1971), reducing energy demands and limiting the motion until

energy is obtained from anaerobic respiration. Our data show that there may exist a hyperventilation of the velum in individuals, reflected in an increase in the metabolic rate until a maximum stress can be reached prior to conformation, while other specimens seem to resist hypoxia by maintaining a low and constant metabolic rate. This also explains the intraspecific variability in behavior among individuals. All these potential processes would explain the observed diversity of respiratory responses in the studied species, which should be viewed as high intraspecific variability in behaviors in response to hypoxia.

Depending on the oxygen partial pressure in the environment, three behavioral responses in respiration were found in our experiments, as shown in Fig. 6. In A) the tendency towards oxyregulation and oxyregulation plus stress in the hypoxic range is shown. The lack of statistical differences in parameters among the fitted curves (Table S1 Mat. Sup.) suggests the existence of a unique response, oxyregulation, but also reflecting stress or gradual increase of the metabolic rate up to P_{CRIT} . This unique behavior can be illustrated in the conceptual model shown in Fig. 6B.

Quantitatively, the average SMR was $9.4 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$, which after standardizing by the protein/WW equation (Equation 1 Suppl. Mat.) resulted in $0.058 \text{ } \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$, being the second lowest metabolic rate reported after *Halitrephes maasi* ($0.046 \pm 0,006 \text{ } \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$) and followed by *Periphylla periphylla* ($0.094 \pm 0.017 \text{ } \mu\text{molO}_2\text{gWW}^{-1}\text{h}^{-1}$), both reported by Thuesen & Childress (1994). Our SMR values are below those mentioned by Wishner et al., (2018) (in Supplementary Material), confirming that the Siphonophora group (Hydrozoa: Medusozoa) has one of the lowest metabolic rates among the zooplankton studied to date.

The other two metrics used here as an experimental physiological quantification of stress were EMR and mE , extending to its maximum stress and exceeding $40 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the progressive stress without regulation replicates. However, this issue is in debate, since statistically the curves are not different, exhibiting stress, but with no significant differences.

The present research confirms the existence of increases in the metabolic rate due to experimental stress associated with respirometry procedures/confinement, although, we lack statistical support for the existence of other respiratory behaviors different to the classic and expected oxyregulation. Considering the statistical evidence, and acknowledging procedural stress, we think it is best to focus physiological descriptions and environmental correlations using the data pertaining to that response (e.g., SMR, P_{CRIT} , α).

Regarding the statistical data, we concluded that there is only a large (initial) SMR pool (7 to $12 \text{ nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$), although it is debated whether it is appropriate to define an SMR when the stress slope (mE) is positive. The P_{CRIT} (10°C and 30 PSU) reported by Rutherford & Thuesen (2005) is half of what was measured in the present study (12°C and 33 PSU), indicating that different populations of *Muggiaea atlantica* have varying tolerance depending on the oceanographic conditions associated with their habitat. In this case, it seems more tolerant to estuarine hypoxia than to upwelling-induced hypoxia ($0.5 \neq 1.6 \text{ kPa}$). It is important to mention that the lowest P_{CRIT} found in deoxygenated waters from upwelling correspond to *Boreomysis californica*, *Pasiphaea emarginata*, and *Euphausia mucronata* (0.42 , 0.57 , and 0.6 kPa respectively) (Wishner, 2018), placing *Muggiaea atlantica* as tolerant to hypoxia. Finally, α was found to be the same across behaviors, and although α has not been measured or reported previously in Hydrozoa (nor Medusozoa), Seibel et al. (2021)

calculated a mean value for *M. atlantica* (in hPa and not kPa). Here α is $0.03 \mu\text{mol O}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ PO}_2^{-1}$, with 0.09 being the lowest reported value in marine animals in Seibel et al. (2021). A small α denotes a low oxygen supply capacity likely due to a lack of a circulatory system. This low α along with low metabolic rates, enhances tolerance to cold waters (Pörtner et al., 2017). Additionally, a low value of α may be the consequence of simple diffusion, which morphologically and physiologically incorporates less oxygen per unit of time and space than a metazoan with a circulatory and/or branchial system.

Regarding the environmental influence on the measured parameters, it is evident that both SMR and P_{CRIT} varied within the same upwelling event, coinciding with the significant relationship of temperature, salinity, and chlorophyll for the first two. These environmental couplings are of paramount importance as they relate subsurface equatorial waters (cold, saline, nutrient-rich, and OMZ forming) with low metabolic rates, high tolerance, and low oxygen supply capacity in *M. atlantica*.

Our findings indicate that *M. atlantica* is highly tolerant to hypoxia, being capable of resisting waters with less than $20 \mu\text{molO}_2/\text{L}$ (10% saturation), either maintaining an extremely low oxygen demand reflected in the mean SMR or exhibiting a P_{CRIT} below the oxygen concentrations found within the OMZ, and so maintaining the aerobic metabolism down to severe hypoxia. It must be stressed however that our findings also suggest a strong environmental influence on such tolerance. Such influences appear clearly modulated by fluctuations in upwelling intensity with can affect both P_{CRIT} and α . Even that, it was shown that the species may have the capacity to persist, migrate and even occupy low-oxygen waters, and due to its high feeding rate preying on other planktonic components (Purcell, 1982) might be able to modify the plankton

community within the few days of its rather short life cycle (14 days) (Carré & Carré, 1991)

Our findings can partly explain the physiological capacity of the *M. atlantica* as to prevail and relatively justifies the dominance reported by various authors in different marine systems (upwelling and fjords), as well as its ability to inhabit and withstand deoxygenated waters. This could be further complemented in the future with the study of hypoxia resistance and OMZ of other predatory gelatinous species, thus allowing our capacity to project the changes in trophic structure under the scenario of climate change (Clerc et al., 2023; Purcell, 2012).

5. CONCLUSION

M. atlantica exhibit a stress behavior during close respirometry, evidenced in 68% of the experimental replicates. The confinement and limited swimming space with the respirometer might partially explain this response, and so we recommend having a rather big replication in order to properly assess the respiratory behavior in these species and likely also other gelatinous species.

A P_{CRIT} of 1.6 kPa, the low metabolic rate ($9.4 \text{ nmol O}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $0.058 \text{ } \mu\text{molO}_2 \text{ gWW}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and an α of 5.4 ($\text{nmol mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$) PO_2^{-1} would justify the physiological capacity of the species to venture into the ZMO brought by coastal upwelling. Given the background from the literature and climate projections, it is announced that this species could effectively dominate the OMZ in extension.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been funded by ANID Chile Grant FONDECYT 1210071 to MU and RE and the Instituto Milenio de Oceanografía (IMO) from Grant ANID ICN12_019.

7. REFERENCES

- Arai, M. N., 1986. Oxygen consumption of fed and starved *Aequorea victoria* (Murbach and Shearer, 1902) (Hydromedusae). *Physiological zoology*, 59(2), 188-193.
- Barham, E. G., 1971. Deep-sea fishes: lethargy and vertical orientation. In *Proc. Int. Symp. Biological Sound Scattering in the Ocean* (ed. G. B. Farquhar), pp. 100–118.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Breitburg, D., L. A. Levin, A. Oschlies, M. Gregoire, F.P. Chavez, D.J. Conley, V. Garcon, D. Gilbert, D. Gutierrez, AND K. Isensee., 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science* 359: eaam7240.
- Carré, C., & Carré, D., 1991. A complete life cycle of the calycofhoran siphonophore *Muggiaea kochi* (Will) in the laboratory, under different temperature conditions: ecological implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 334(1269), 27-32.
- Childress, J. J., & Seibel, B. A., 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *Journal of experimental biology*, 201(8), 1223-1.
- Clarke, A., Holmes, L. J., & Gore, D. J., 1992. Proximate and elemental composition of gelatinous zooplankton from the Southern Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 155(1), 55-68.

Clerc, C., Aumont, O., & Bopp, L., 2023. Filter-feeding gelatinous macrozooplankton response to climate change and implications for benthic food supply and global carbon cycle. *Global Change Biology*, 29(22), 6383-6398.

Chabot, D., Steffensen, J. F., & Farrell, A. P., 2016. The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 81-121.

Clerc, C., Aumont, O., & Bopp, L., 2023. Filter-feeding gelatinous macrozooplankton response to climate change and implications for benthic food supply and global carbon cycle. *Global Change Biology*, 29(22): 6383-6398.

Davis, J.C., 1975. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 32, 2295–2332.

Ekau, W., Auel, H., Pörtner, H. O., & Gilbert, D., 2010. Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences*, 7(5), 1669-1699.

Grove, M., & Breitburg, D. L., 2005. Growth and reproduction of gelatinous zooplankton exposed to low dissolved oxygen. *Marine Ecology Progress Series*, 301, 185-198.

Herreid II, C. F., 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 67(3), 311-320.

Ishii, H., & Tanaka, F., 2006. Respiration rates and metabolic demands of *Aurelia aurita* in Tokyo Bay with special reference to large medusae. *Plankton and Benthos Research*, 1(1), 64-67.

Ishii, H., Ohba, T., & Kobayashi, T., 2008. Effects of low dissolved

oxygen on planula settlement, polyp growth and asexual reproduction of *Aurelia aurita*. *Plankton & Benthos Research*, 3, 107–113.

Mackie, G.O. & Mills, C.E., 1983. Use of the Pisces IV submersible for zooplankton studies in coastal waters of British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries Science* 40, 763–776

Mangum, C., & Winkle, W. V., 1973. Responses of aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. *American Zoologist*, 13(2), 529-541.

Muggeo, V. M., 2008. Segmented: an R package to fit regression models with broken-line relationships. *R news*, 8(1), 20-25.

Palma, S. & Apablaza, P., 2004. Seasonal abundance and vertical distribution of the carnivorous gelatinous zooplankton in an upwelling area of the northern Humboldt Current System. *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 32: 49–70.

Prosser, C.L., 1973. *Comparative Animal Physiology*, 3rd ed. Saunders Company, Philadelphia, WB. 910 pp.

Pagés F. & Gili, J. M., 1992. Influence of Agulhas waters on the population structure of planktonic Cnidarians in the southern Benguela Region. *Scientia Marina* 56(2-3): 109-123.

Pagès, F., H. González, M. Ramón, M. Sobarzo & J.M. Gili., 2001. Gelatinous zooplankton assemblages associated with water masses in the Humboldt Current System, and potential predatory impact by *Bassia bassensis* (Siphonophora: Calycothorae). *Marine Ecology Progress Series*, 210: 13-24.

Palma, S. & Apablaza, P., 2004. Seasonal abundance and vertical distribution of the carnivorous gelatinous zooplankton in an

upwelling area of the northern Humboldt Current System. *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 32: 49–70.

Palma, S. & Silva, N., 2006. Epipelagic siphonophore assemblages associated with water masses along a transect between Chile and Easter Island (eastern South Pacific Ocean). *Journal of Plankton* 28(12): 1143-1151.

Pörtner, H. O., Bock, C., & Mark, F. C., 2017. Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*. 220(15): 2685-2696.

Prinzing, T. S., Zhang, Y., Wegner, N. C., & Dulvy, N. K., 2021. Analytical methods matter too: Establishing a framework for estimating maximum metabolic rate for fishes. *Ecology and Evolution*, 11(15), 9987-10003.

Purcell, J. E., 1982. Feeding and growth of the siphonophore *Muggiæa atlantica* (Cunningham 1893). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 62(1), 39-54.

Purcell, J. E., 2012. Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual review of marine science*, 4, 209-235.

Rutherford, Jr., L.D., & Thuesen, E.V., 2005. Metabolic performance and survival of medusae in estuarine hypoxia. *Marine Ecology Progress Series*, 294:189-200.

Sassaman, C., & Mangum, C. P., 1972. Adaptations to environmental oxygen levels in infaunal and epifaunal sea anemones. *The Biological Bulletin*, 143(3), 657-678.

Schneider, G., 1992. A comparison of carbon-specific respiration

rates in gelatinous and non-gelatinous zooplankton: a search for general rules in zooplankton metabolism. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 46, 377-388.

Seibel, B. A., Andres, A., Birk, M. A., Burns, A. L., Shaw, C. T., Timpe, A. W., & Welsh, C. J., 2021. Oxygen supply capacity breathes new life into critical oxygen partial pressure (P crit). *Journal of Experimental Biology*, 224(8), jeb242210.

Shimauchi, H., & Uye, S. I., 2007. Excretion and respiration rates of the scyphomedusa *Aurelia aurita* from the Inland Sea of Japan. *Journal of Oceanography*, 63, 27-34.

Schmidtko, S., L. Stramma, AND M. Visbeck., 2017. Decline in global oceanic oxygen content during the past five decades. *Nature*. 542: 335–339.

Stramma, L., E. Prince, S. Schmidtko, J. Luo, J. P. Hoolihan, M. Visbeck, D. W. R. Wallace, P. Brandt, AND A. Körtzinger., 2012. Expansion of oxygen minimum zones may reduce available habitat for tropical pelagic fishes. *Nature Clim Change* 2: 33–37.

Thibault-Botha, D., Johann R. E. Lutjeharms, & M. J. Gibbons., 2004. Siphonophore assemblages along the east coast of South Africa; mesoscale distribution and temporal variations, *Journal of Plankton Research*, Volume 26 (9): 1115–1128.

Thuesen, E. V., Rutherford, L. D., & Brommer, P. L., 2005. The role of aerobic metabolism and intragel oxygen in hypoxia tolerance of three ctenophores: *Pleurobrachia bachei*, *Bolinopsis infundibulum* and *Mnemiopsis leidyi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(3), 627-633.

Toro-Chacon, J., Tickell, F., González, R., Victoriano, P. F.,

Fernández-Urruzola, I., & Urbina, M. A., 2021. Aerobic and anaerobic metabolic scaling in the burrowing freshwater crayfish *Parastacus pugnax*. *Journal of Comparative Physiology B*, 191(4), 617-628.

Ulloa, R., S. Palma, L. Linacre & N. Silva., 2000. Seasonal changes in the bathymetric distribution of siphonophores, chaetognaths and euphausiids associated to water masses off Valparaíso, Chile (Southeast Pacific). En: J. Farber (ed.). *Oceanography Eastern Pacific*. CICESE, Ensenada, 1: 72-83.

Wishner, K. F., Seibel, B. A., Roman, C., Deutsch, C., Outram, D., Shaw, C. T., & Riley, S., 2018. Ocean deoxygenation and zooplankton: Very small oxygen differences matter. *Science advances*, 4(12), eaau5180.

E.U. Copernicus Marine Service Information., 2023. Global Ocean Physics Analysis and Forecast DOI: <https://doi.org/10.48670/moi-00016>

E.U. Copernicus Marine Service Information., 2023. Global Ocean Biogeochemistry Analysis and Forecast. DOI: <https://doi.org/10.48670/moi-00015>

NOAA/NESDIS/CoastWatch/West Coast Node, NOAA/NMFS/SWFSC/ERD (Dataset ID: erdQCwindproducts1day)., 2023. Merge Windspeed, Stress, Curl, Divergence, and Ekman Upwelling, Metop-C ASCAT, 0.25 degree, Global, Near Real Time, 2020-present, 1-Day Composite. <https://coastwatch.pfeg.noaa.gov/erddap/griddap/erdQCwindproducts1day.html>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Larson-Paredes Constanza: Conceptualization and Methodology, Investigation, Resources, Visualization and Writing original draft preparation. **Urbina Mauricio:** Conceptualization and Methodology, Supervision, Writing review and editing. **Escribano Rubén:** Formal analysis, Software, Writing original draft preparation, Writing review and editing.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DECLARATION OF AI

The manuscript's analysis, processing and writing were not assisted by AI.

ETHICAL STATEMENT

Ethical review and approval were not required for the study on *M. atlantica* in accordance with the institutional (Universidad de Concepción) protocol.

REPORTING SEX- AND GENDER-BASED ANALYSIS

Sex was neither analyzed nor determined in the replicates with eudoxic phase in *M. atlantica*. The poligastric phase corresponds to asexual nectophores.

Table 1: Summary of experiments carried out to measure respiration rate of *M. atlantica*. C=Control, N= Nectophore, E= Eudoxia. Location is the cross-shelf position (longitude W) while the latitude ranged between 36°29' and 36°30'. Number is the number of experiments and Replicates represent the number of respirometry chambers.

Date (mm-dd-yy)	Number	Location (Long. W)	Treatment	Replicates
08-30-2022	1	73°50' S	C-N	C-1N-0E
09-08-2022	2	73°50' S	C-E	C-0N-5E
12-09-2022	3	73°50' S	C-N	C-9N-0E
12-15-2022	1	73°50' S	C-N	C-3N-0E
03-15-2023	1	72°95' S	C-N	C-1N-0E
03-21-2023	1	73°50' S	C-N	C-4N-0E
03-23-2023	2	72°95' S	C-N-E	C-2N-2E
03-28-2023	2	72°95' S	C-N	C-4N-0E
03-30-2023	2	72°95' S	C-N	C-6N-0E

Table 2: Best fitted equations for the three respiratory behaviors of *M. atlantica* under experimental conditions. The parameter a =slope, b =inflection point, and x_0 = parameter of behavior during normoxia.

Respiratory Response	Function type	Equation	Parameters		
			a	b	x_0
Oxyregulation	Hyperbola	$MR = a \cdot x / (b + x)$	12.13	0.79	-
Oxyregulation plus stress	Normal Log	$MR = a \cdot \exp(-0,5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2) / x$	73.826	1.09	14.37
Progressive stress	Gaussian	$MR = a \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x/x_0)/b)^2)$	12.44	5.85	8.77

Table 3: Values of physiological parameters calculated in the three behaviors observed as respiratory response. With RR= respiratory response; Oxyreg = Oxyregulation; Oxyreg + Stress = Oxyregulation plus stress; Stress = stress progressive; N = number of replicas; SMR= Standard metabolic rate ($\text{nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$); EMR= experimental stress metabolic rate ($\text{nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$) P_{CRIT} = Critical Pressure in Regulation; mE = stress slope ($\text{nmolO}_2 \text{ mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$) PO_2^{-1} ; α = oxygen supply capacity ($\text{nmol mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$) PO_2^{-1} .

RR	n	SMR	EMR	P_{crit}	mE	α
Oxyreg.	12	12.2 ± 5.90	NA	1.6 ± 0.60	NA	
		7.27 ± 4.05				
Oxyreg + Stress	7	7.5 ± 7.48	16.6 ± 14.07	NA	-0.5 ± 0.86	3.8 ± 2.02
Stress	18	8.0 ± 3.37	17.5 ± 8.18	NA	-1.2 ± 0.93	5.1 ± 7.0
Mean		9.24 ± 2.54	17.05 ± 0.615	1.64 ± 0.60	-0.82 ± 0.52	5.40 ± 1.74

Figure captions

Fig. 1: Sampling location for zooplankton at Station 18 (black symbol), and at the entrance of Bay of Coliumo (white box) in the upwelling zone of central-southern Chile in the southeast Pacific.

Fig. 2: Metabolic rates of *M. atlantica* representing three different respiratory behaviors: Oxyregulation, Oxyregulation plus stress, and Progressive Stress. These functions were fitted with different equations shown in Table 2.

Fig. 3: Representation of the metabolic rates of regulation showing the breaking point for each replicate and the resulting P_{CRIT} . Groups marked above and below $10 \text{ nmol mgP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ are observed.

Fig. 4: Multidimensional scaling (MDS) of the SMR (left) and P_{CRIT} (right) under environmental parameters. With Factor 1 to 9 as samplings (August 2022 to March 2023). (A) The SMR shows a clear separation of two groups indicating the particular conditions of upwelling onset compared to transition (December) and end of the period (March) (grouped in oval). (B) The P_{CRIT} did not show segregation of groups in the MDS model.

FIG 5: SMR (left) and P_{CRIT} (right) Principal Component Analysis (PCA) based on significant environmental parameters. The group differentiation between the first 3 and the rest of the factors (sampling date) and the direct and inversely proportional relationship to SMR are again observed. On the other hand, the component analysis for P_{CRIT} does not show segregation of samplings and a significant relationship with only three environmental variables.

Fig.6: The three respiratory behaviors of *M. atlantica* according to experimental data (A), and the theoretical expected respiratory behavior (B).

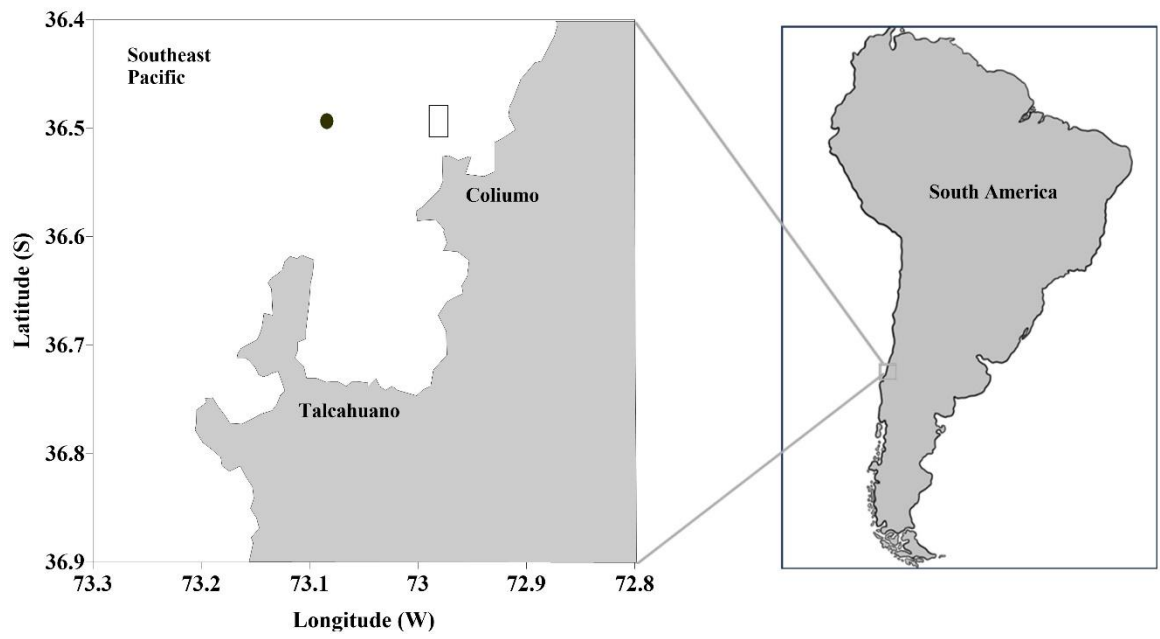


FIGURE 1

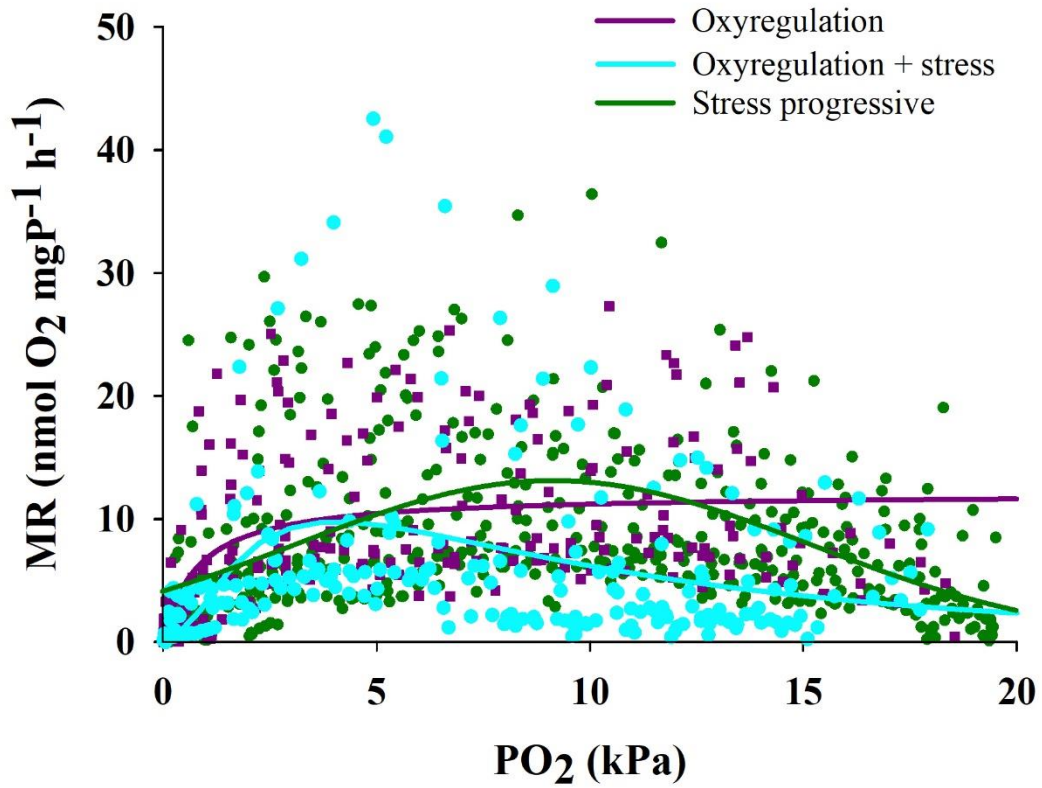


FIGURE 2

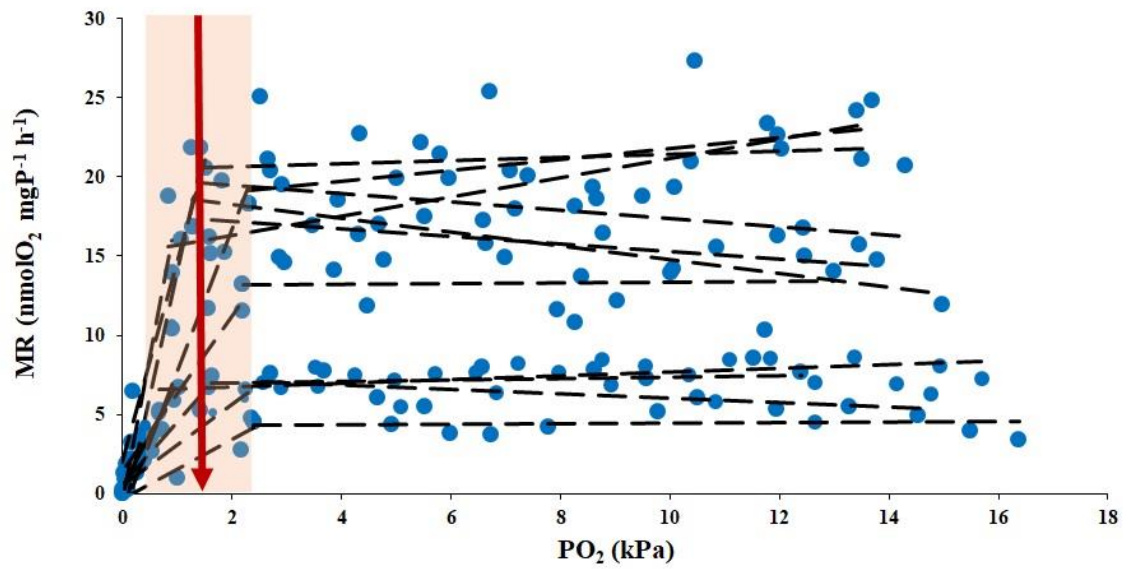


FIGURE 3

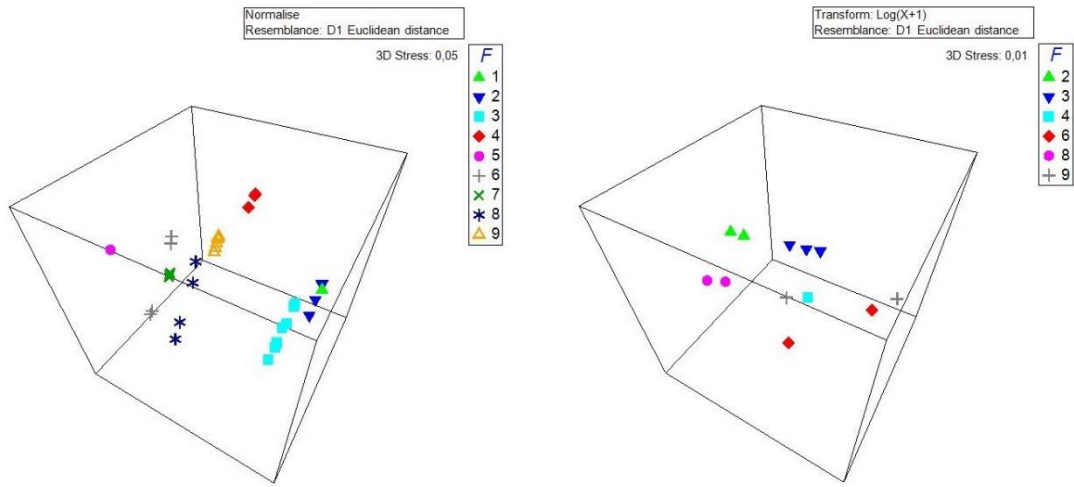


FIGURE 4

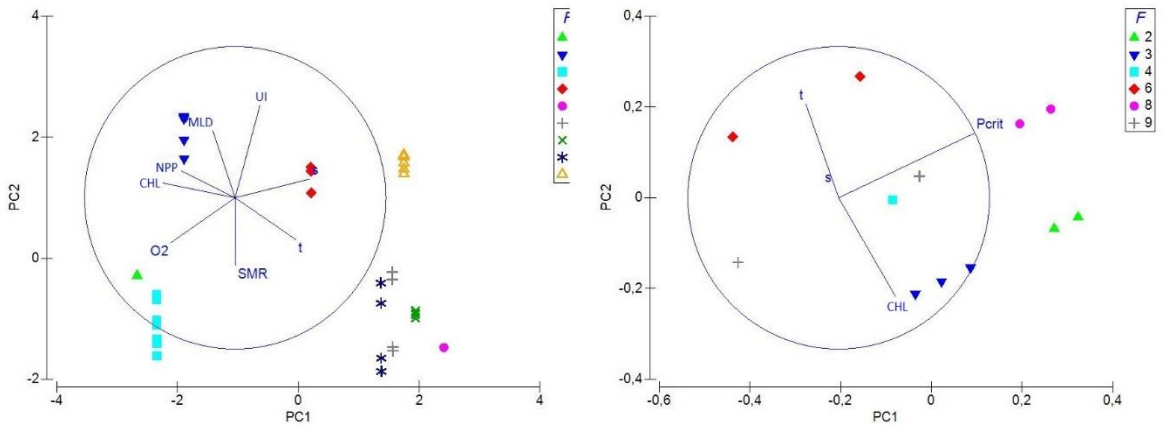


FIGURE 5

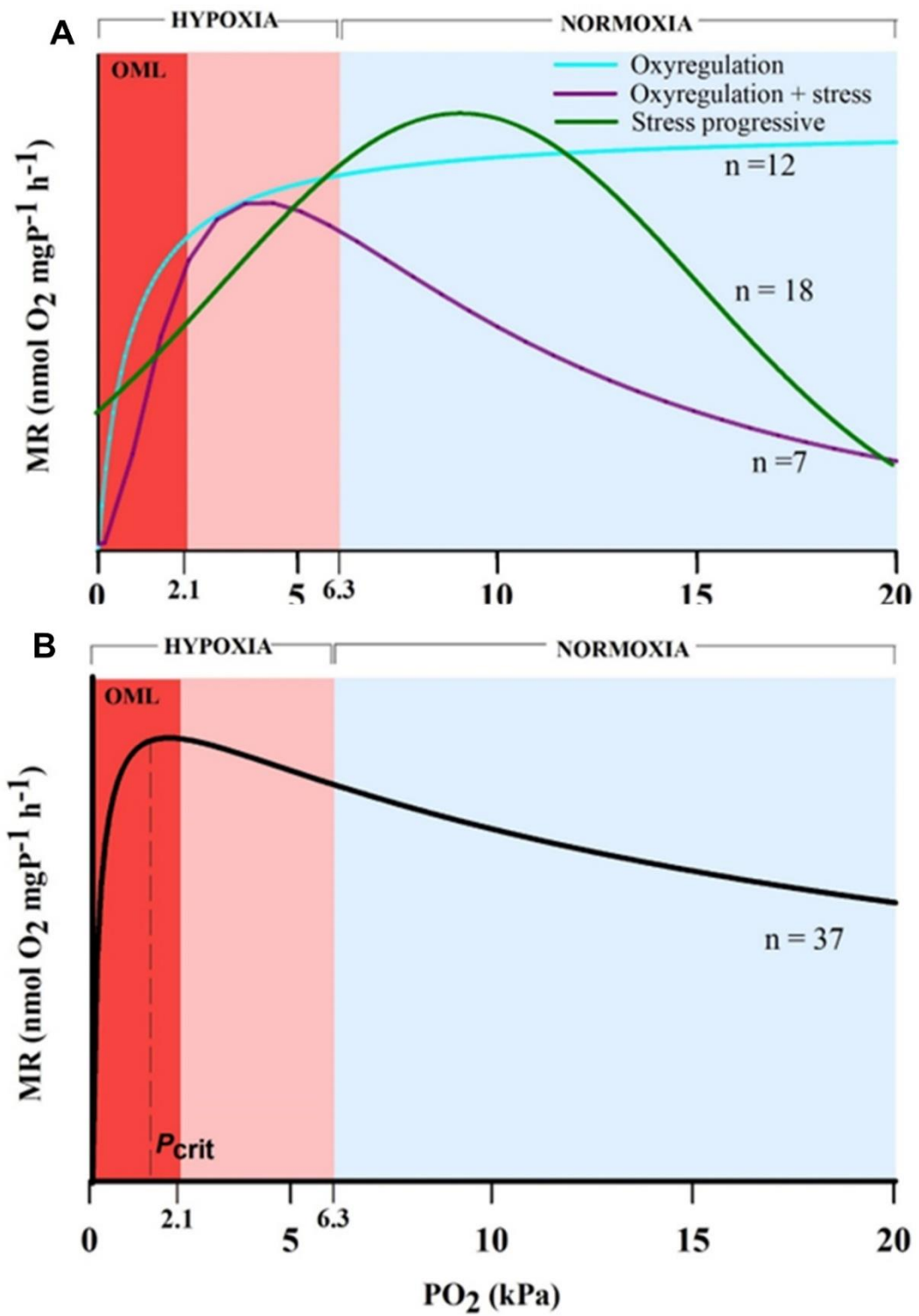


FIGURE 6

ANEXO 2: Protocolos de métodos y resultados estadísticos complementarios

PROTOCOLO MICROBRADFORD (THERMOFISHER.COM)

Prepare BSA standards from Thermo Fisher Scientific (2023)

Test tube procedures: Micro test tube protocol. Working range = 1-25 µg/mL

1. Pipette 1.0 mL of each standard or unknown sample into appropriately labeled test tubes.
2. Add 1.0 mL of the Bradford reagent to each tube, then mix well.
3. Incubate samples for 10 minutes at RT.
4. With the spectrophotometer set to 595 nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water.
5. Measure the absorbance of all the samples.
6. Subtract the average 595 nm measurement for the blank replicates from the 595 nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
7. Prepare a standard curve by plotting the average blank-corrected 595 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Microplate procedures: Micro microplate protocol. Working range = 1-25 µg/mL

1. Pipette 150 µL of each standard or unknown sample into the appropriate microplate wells.
2. Add 150 µL of the Bradford reagent to each well, then mix with plate shaker for 30 seconds.
3. Remove plate from shaker.
4. Incubate plate for 10 minutes at room temperature (RT).
5. Measure the absorbance at or near 595 nm on a plate reader.
6. Subtract the average 595 nm measurement for the blank replicates from the 595 nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
7. Prepare a standard curve by plotting the average blank corrected 595 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Using the standard curve, determine the protein concentration estimate for each unknown sample.

Note: If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

MODELOS DE MEJOR AJUSTE DE TRES CURVAS RESPIRATORIAS POR SIGMAPLOT

(1) AJUSTE DE CURVA REGULACIÓN CLÁSICA

Equation: Hyperbola; Single Rectangular, 2 Parameter: $f = a \cdot x / (b + x)$

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0,5789 0,3351 0,3324 5,4655

Parámetro	Coefficient	Error std	t	P	Description
a	12,1303	0,6812	17,8079	<0,0001	a = max(y)
b	0,7935	0,2342	3,3879	0,0008	b = if(x50(x;y,0,1)<>0; x50(x;y,0,1); 1)

(2) AJUSTE DE CURVA REGULACIÓN CON ESTRÉS

Equation: Peak; Log Normal, 3 Parameter: $f = \text{if}(x \leq 0; 0; a \cdot \exp(-0,5 \cdot (\ln(x/x_0)/b)^2) / x)$

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0,3067 0,0941 0,0859 7,2465

Parámetro	Coefficient	Error std	t	P	Description
a	73,8261	11,3389	6,5109	<0,0001	a = if(peaksign(y)>0; max(y); min(y))
b	1,0982	0,1783	6,1600	<0,0001	b = if(fwhm(ln(x);abs(y))<>0; fwhm(ln(x);abs(y))/2; 1)
x0	14,3790	5,4795	2,6242	0,0093	x0 = if(peaksign(y)>0; xatymax(x;y); xatymmin(x;y))

(3) AJUSTE DE CURVA ESTRÉS PROGRESIVO

Equation: Peak; Gaussian, 3 Parameter: $f = a \cdot \exp(-0,5 \cdot ((x-x_0)/b)^2)$

R Rsqr Adj Rsqr Standard Error of Estimate

0,4833 0,2336 0,2304 5,9166

Parámetro	Coefficient	Error std	t	P	Description
a	12,4433	0,5238	23,755	<0,0001	a = if(peaksign(y)>0; max(y); min(y))
b	5,8583	0,3073	19,0632	<0,0001	b = if(fwhm(x;abs(y))<>0; fwhm(x;abs(y))/2,2; 1)
x0	8,7745	0,2627	33,3959	<0,0001	x0 = if(peaksign(y)>0; xatymax(x;y); xatymmin(x;y))

TEST DE PARÁMETROS MEDIDOS SIGMAPLOT

(1) SMR y LN (SMR)

One Way Analysis of Variance

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,086)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,112)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
SMR1	12	0	12,158	5,905	1,705
SMR2	7	0	7,537	7,487	2,830
SMR3	18	0	8,043	3,375	0,795

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	148,252	74,126	2,759	0,078
Residual	34	913,443	26,866		
Total	36	1061,695			

there is not a statistically significant difference (P = 0,078).

One Way Analysis of Variance

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,223)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,156)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
LN SMR1	12	0	2,367	0,562	0,162
LN SMR2	7	0	1,673	0,866	0,327
LN SMR3	18	0	1,979	0,512	0,121

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	2,292	1,146	3,138	0,056
Residual	34	12,417	0,365		
Total	36	14,710			

there is not a statistically significant difference (P = 0,056)

(2) EMR

One Way Analysis of Variance

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing	Median	25%	75%
EMR2	7	0	9,198	6,808	36,395
EMR3	18	0	17,022	9,554	24,000
¿EMR1?	12	0	16,840	7,913	23,409

H = 0,980 with 2 degrees of freedom. (P = 0,613)

no hay una diferencia estadísticamente significativa (P = 0,613)

(3) **t-test (comparación tasas)**

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,332)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
SMR	12	0	13,162	6,328	17,984
MMR2	18	0	8,747	4,769	10,732

Mann-Whitney U Statistic= 63,000

T = 231,000 n(small)= 12 n(big)= 18 (P = 0,060)

there is not a statistically significant difference(P = 0,060)

(4) M=pendiente de estrés entre 2 comportamientos con estrés

t-test

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
mE2	7	0	-0,417	-0,584	0,212
mE3	18	0	-0,890	-1,764	-0,544

Mann-Whitney U Statistic= 29,000

T = 125,000 n(small)= 7 n(big)= 18 (P = 0,043)

there is a statistically significant difference (P = 0,043)

(5) Test EMR SMR en regulacion

t-test

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, Rank Sum Test begun

Mann-Whitney Rank Sum Test

Group	N	Missing	Median	25%	75%
SMR	12	0	16,840	7,913	23,409
EMR	12	0	13,162	6,328	17,984

Mann-Whitney U Statistic= 46,000

T = 176,000 n(small)= 12 n(big)= 12 (P = 0,141)

there is not a statistically significant difference (P = 0,141)

(6) M=Alpha=pendiente de conformación entre 3 comportamientos

One Way Analysis of Variance

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing	Median	25%	75%
m reg	12	0	5,886	4,709	10,399
m reg est	7	0	4,431	1,995	5,321
m estres	18	0	2,451	1,250	6,371

H = 5,365 with 2 degrees of freedom. (P = 0,068)
 there is not a statistically significant difference (**P = 0,068**)

(7) Analysis of Variance ALPHA (SYSTAT)

Variables	Levels		
ALPHA (3 levels)	1,000	2,000	3,000

Dependent Variable	VAR_2
N	37
Multiple R	0,234
Squared Multiple R	0,055

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
ALPHA	60,064	2	30,032	0,983	0,385
Error	1.038,975	34	30,558		

MODELOS LINEALES GENERALIZADOS POR SYSTAT 12

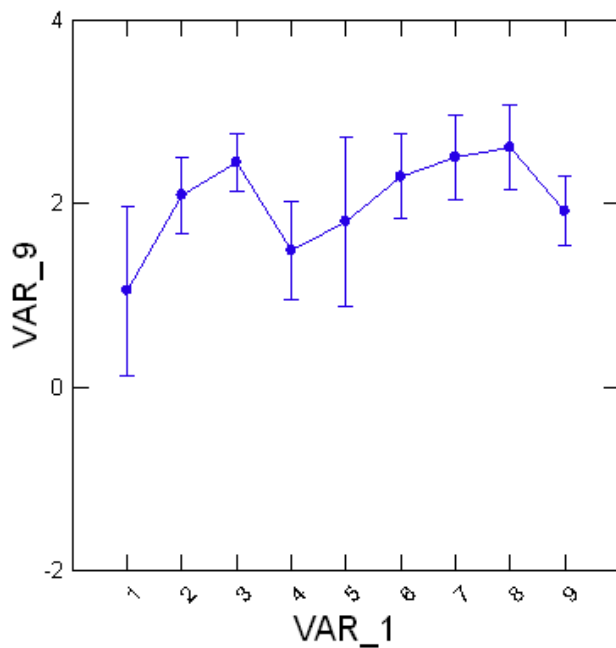
(1) Analysis of Variance SMR

Variables	Levels (sampling)								
SMR	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Dependent Variable	SMR
N	37
Multiple R	0,690
Squared Multiple R	0,476

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
SMR	5,196	8	0,649	3,177	0,011
Error	5,724	28	0,204		

Least Squares Means



VAR1= Muestreos; VAR_9= SMR (log)

(2) GLM stepwise SMR - ambiental

Dependent Variable	SMR
N	37
Multiple R	0,669
Squared Multiple R	0,448
Adjusted Squared Multiple R	0,337
Standard Error of Estimate	0,448

Regression Coefficients B = (X'X)⁻¹X'Y					
Effect	Coefficient	Standard Error	Std. Coefficient	Tolerance	p-value
CONSTANT	-209,315	62,065	0,000		3,373 0,002
t	0,545	0,146	1,713	0,088	3,737 0,001
s	4,762	1,452	5,144	0,007	3,280 0,003
Ch	2,661	0,662	3,549	0,024	4,019 0,000
O2	0,163	0,045	5,025	0,010	3,612 0,001
pcm	-0,921	0,225	-1,523	0,133	4,092 0,000
IS	0,001	0,000	2,251	0,054	3,868 0,001

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Regression	4,887	6	0,814	4,050	0,004
Residual	6,033	30	0,201		

TODAS LAS VARIABLES AMBIENTALES SE CORRELACIONAN CON MR

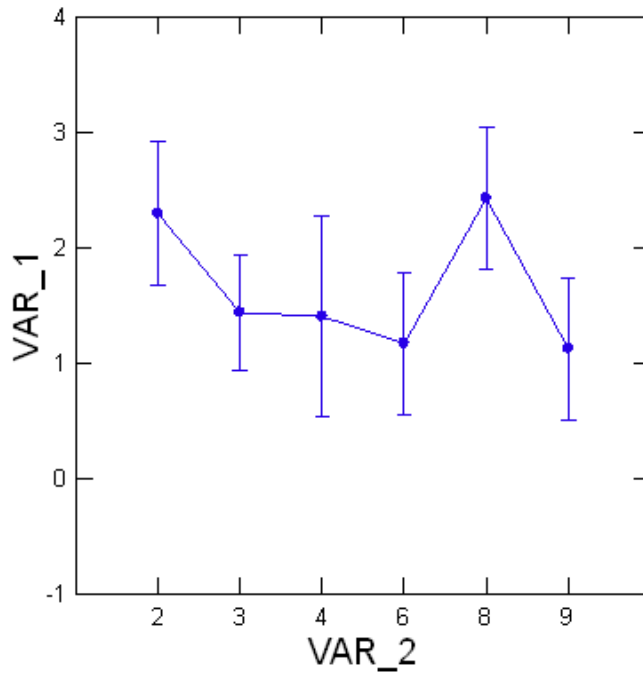
(3) **Analysis of Variance PCRIT: ONE-WAY ANOVA**

Variables	Levels (sampling)					
P _{CRIT}	2	3	4	6	8	9

Dependent Variable	VAR_1
N	12
Multiple R	0.899
Squared Multiple R	0.809

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
VAR_2	3.250	5	0.650	5.082	0.036
Error	0.767	6	0.128		

Least Squares Means



VAR1= Muestreos; VAR_9= PCRIT (log)

(4) GLM stepwise P_{CRIT}-ambiental

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Regression	3.097	3	1.032	8.977	0.006
Residual	0.920	8	0.115		

Dependent Variable	P _{CRIT}
N	12
Multiple R	0.878
Squared Multiple R	0.771
Adjusted Squared Multiple R	0.685
Standard Error of Estimate	0.339

Regression Coefficients $B = (X'X)^{-1}X'Y$						
Effect	Coefficient	Standard Error	Std. Coefficient	Tolerance	t	p-value
CONSTANT	-80.550	17.644	0.000		-4.565	0.002
t	0.525	0.138	1.514	0.182	3.820	0.005
s	1.897	0.427	1.917	0.153	4.438	0.002
chl	3.284	0.649	3.338	0.066	5.063	0.001

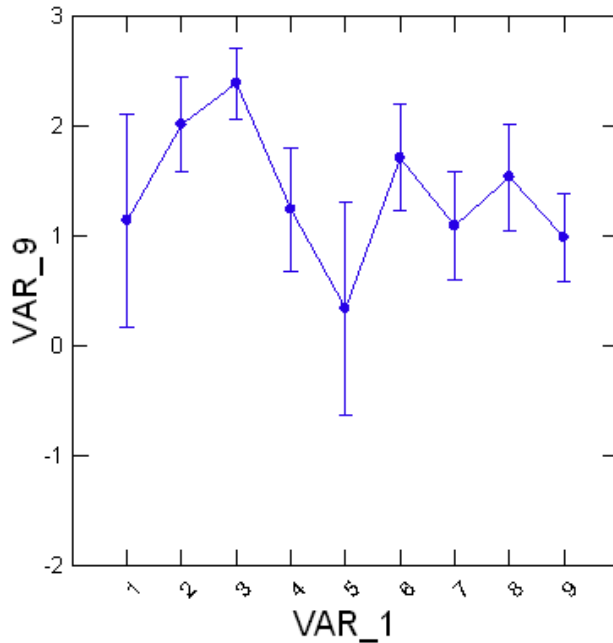
(5) Analysis of Variance ALPHA

Variables	Levels (sampling)								
ALPHA	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Dependent Variable	ALPHA
N	37
Multiple R	0,810
Squared Multiple R	0,657

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
ALPHA	12,039	8	1,505	6,695	<0,001
Error	6,294	28	0,225		

Least Squares Means



VAR1= Muestras; VAR_9= Alpha

EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN ALFA ENTRE FECHAS

(6) GLM stepwise ALPHA-AMBIENTAL

Dependent Variable	ALPHA
N	37
Multiple R	0,576
Squared Multiple R	0,332
Adjusted Squared Multiple R	0,313
Standard Error of Estimate	4,580

Regression Coefficients $B = (X'X)^{-1}X'Y$					
Effect	Coefficient	Standard Error	Std. Coefficient	Tolerance	p-value
CONSTANT	-43,739	11,848	0,000		0,001
O2	0,188	0,045	0,576	1,000	0,000

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Regression	364,782	1	364,782	17,388	0,000
Residual	734,256	35	20,979		

SOLO OXÍGENO SE ASOCIA AL VALOR DE ALFA, LAS OTRAS VARIABLES AMBIENTALES NO SON SIGNIFICATIVAS.

ANÁLISIS DE MODELOS LINEALES Y ADITIVOS POR PRIMER

Normalise SMR-ambiental: Normalise variables

Variable	Mean	SD
t	13,08	1,7312
s	33,997	0,59497
ch	3,2307	0,73436
npp	115,07	20,074
O2	262,78	16,966
pcm	11,028	0,91069
IS	806,63	839,53
SMR	9,2818	5,4306

Resemblance SMR: Create lower triangular resemblance matrix

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Analyse between: Samples

Resemblance measure: D1 Euclidean distance

MDS SMR: Non-metric Multi-Dimensional Scaling

Resemblance worksheet

Name: Resem1

Data type: Distance

Selection: All

Parameters

Kruskal stress formula: 1

Minimum stress: 0,01

3-d : Minimum stress: 0,05 occurred 15 times

2-d : Minimum stress: 0,1 occurred 18 times

PCA SMR

PC	Eigenvalues	%Variation	Cum.%Variation
1	3,64	45,5	45,5
2	1,98	24,8	70,3
3	0,966	12,1	82,4
4	0,718	9,0	91,4
5	0,491	6,1	97,5

Eigenvectors (Coefficients in the linear combinations of variables making up PC's)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
t	0,406	-0,279	0,197	0,512	0,128
s	0,495	0,124	-0,136	-0,113	0,248
ch	-0,479	0,097	0,053	-0,315	-0,189
npp	-0,358	0,177	-0,376	0,144	0,804
O2	-0,428	-0,298	0,161	0,364	-0,117
pcm	-0,149	0,445	0,634	0,384	0,153
IS	0,165	0,614	0,244	-0,223	-0,032
SMR	0,002	-0,450	0,558	-0,525	0,449

Normalise P_{CRIT}-ambiental: Normalise variables

Variable	Mean	SD
t	12,961	1,7424
s	33,995	0,61072
ch	3,3197	0,6142
Pcrit	1,648	0,6043

Overall Transform: Downweight high abundance species

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Transform: Log(X+1)

Resemblance P_{CRIT}: Create lower triangular resemblance matrix

Sample selection: All

Variable selection: All

Parameters

Analyse between: Samples

Resemblance measure: D1 Euclidean distance

MDS P_{CRIT}: Non-metric Multi-Dimensional Scaling

Resemblance worksheet

Name: Resem1

Data type: Distance

Parameters

Kruskal stress formula: 1

Minimum stress: 0,01

3-d : Minimum stress: 0,01 occurred 25 times

2-d : Minimum stress: 0,01 occurred 23 times

PCA PC_{CRIT}: Principal Component Analysis

PC	Eigenvalues	% Variation	Cum.% Variation
1	6,38E-2	69,7	69,7
2	2,59E-2	28,3	98,0
3	1,79E-3	2,0	100,0
4	2,84E-5	0,0	100,0

Eigenvectors (Coefficients in the linear combinations of variables making up PC's)

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4
t	-0,218	0,620	-0,744	-0,118
s	-0,026	0,075	0,224	-0,971
ch	0,378	-0,654	-0,623	-0,204
Pcrit	0,900	0,427	0,088	0,029