



**Comportamiento respiratorio de un cetáceo
de buceo profundo**

(Globicephala macrorhynchus):

¿Por qué hiperventila el calderón tropical?

Breathing behavior of a deep-diving cetacean

(Globicephala macrorhynchus):

Why do short-finned pilot whales hyperventilate?



Trabajo de Fin de Grado

Vicente Fernández Rodilla

Tutorizado por Natacha Aguilar de Soto

Grado en Biología. Junio 2020

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
La respiración	3
Adaptaciones a la apnea.....	5
El calderón de aleta corta o tropical.....	6
Objetivos.....	7
Material y métodos	8
Toma de datos	8
Identificación de las respiraciones	9
Determinación de la frecuencia respiratoria	10
Análisis estadístico	10
Resultados.....	12
Comportamiento de buceo	12
Tiempo de recuperación post-inmersión.....	14
Frecuencia respiratoria.....	14
Discusión	18
Conclusiones.....	21
Bibliografía.....	22

Resumen

La respirometría es una técnica no invasiva cada vez más empleada para estimar el gasto energético de los animales, pero su aplicación a los cetáceos aún no está muy desarrollada. Esto se debe a las dificultades intrínsecas a la calibración de la técnica y al diseño experimental para esta megafauna marina en libertad, en contextos relevantes a nivel ecológico. Este trabajo constituye uno de los primeros que realiza un estudio del comportamiento respiratorio de un cetáceo de buceo profundo. La especie es el calderón de aleta corta o tropical (*Globicephala macrorhynchus*), con una población residente en Canarias. El estudio se dirige a determinar qué factores influyen en su frecuencia respiratoria (FR), con el fin de comprender cómo maneja su respiración antes y después de una inmersión para prepararse y recuperarse de la misma.

Para ello, primero se localizaron las respiraciones de cinco calderones en base al análisis de datos obtenidos con dispositivos adheridos a los cetáceos con ventosas. Este instrumento no invasivo, la DTag, es capaz de grabar una variedad de datos de múltiples sensores de cetáceos en libertad. Se analizaron la profundidad, que indica cuándo los animales suben a superficie a respirar, y el sonido de los soplos. Después se calculó la frecuencia respiratoria para cada minuto (FR) y se interpretaron los resultados.

Se observó que los calderones incurren en una deuda de oxígeno cuando bucean, y que esta varía con la profundidad/duración de las inmersiones, de modo que la deuda es mayor tras buceos profundos. Para enfrentarse a este reto, presentan dos estrategias respiratorias principales: i) ajustan la duración de sus períodos de recuperación en superficie a la profundidad/duración de las inmersiones profundas, de modo que, cuanto más profundo y duradero es el buceo que realizan, mayor es el tiempo de reposo en superficie tras el mismo; ii) regulan su tasa respiratoria voluntariamente, preparándose para los buceos con un incremento de la FR que es especialmente elevado antes de las inmersiones profundas, e hiperventilando tras los mismos, siendo esta hiperventilación más rápida y duradera tras los buceos profundos.

Abstract

Respirometry is a non-invasive technique increasingly used to estimate the energetic expenditure of animals. This technique is still not very developed for cetaceans due to the difficulties inherent to the calibration of the measurements, and to the experimental design of research on free-ranging megafauna, in contexts that are ecologically relevant. This work performs a study of the breathing behavior of a deep-diving cetacean, the short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*), with a resident population in the Canary Islands, to determine which factors influence its respiratory rate, in order to understand how pilot whales manage their respiration before and after a dive to prepare for and recover from it.

For this purpose, breaths were first located using data gathered with a non-invasive instrument, the DTag, capable of recording a variety of data from multiple sensors from wild cetaceans. We analysed the depth of the animal indicating when the whale comes up to the surface to breath, and the sounds of the blows. The respiratory rate for each minute (FR) was then calculated and the results were interpreted, showing that whales incur in an oxygen debt after dives, and this debt changes depending on the depth and duration of the dives. To confront this challenge, pilot whales have developed two main respiratory strategies: i) to adjust the duration of their recovery periods at the surface to the depth / duration of deep dives, so that the deeper and longer their dive, the longer the surface rest time after it; ii) voluntarily regulating their respiratory rate, preparing for diving by increasing their respiratory rate, which is especially high before deep dives, and hyperventilating after dives, this hyperventilation being faster and more durable after deep dives.

Introducción

El estudio de la respiración en los seres vivos es un tema clave en fisiología animal y ecofisiología del comportamiento, dado que el oxígeno es el combustible de la vida. Su consumo se relaciona directamente con la actividad de los animales y, de hecho, la respirometría se emplea para cuantificar el gasto energético de distintos comportamientos animales (Lighton, 2008; Calderón, 2011; Hickman et al., 2013; Rodgers et al., 2016).

En el caso de los mamíferos buceadores, el consumo de oxígeno durante los períodos en superficie debe no únicamente satisfacer el gasto metabólico basal durante estos períodos, sino también compensar el consumo de las inmersiones en apnea (Miller y Roos, 2018). Es más, si la apnea es muy larga o se incurre en ejercicio anaeróbico, se debe compensar a posteriori el uso de rutas metabólicas anaeróbicas, procesando el ácido láctico generado durante el buceo (Kooyman y Ponganis, 2017).

Los cetáceos de buceo profundo se encuentran entre los mamíferos más desconocidos del planeta y se ha sugerido que sus hábitos de buceo, potencialmente al límite de sus capacidades fisiológicas, los hacen especialmente vulnerables a perturbaciones (Aguilar de Soto, 2006).

Este trabajo se centra en el análisis de respirometría de una especie de cetáceo de buceo profundo residente en Canarias, el calderón tropical o de aleta corta (*Globicephala macrorhynchus* Gray, 1846). A continuación, se introducen los conceptos básicos de fisiología de la respiración necesarios para plantear el estudio de respirometría.

La respiración

La necesidad de oxígeno (O_2) como aceptor final de electrones para la producción de energía en el metabolismo aerobio ha determinado en los animales más desarrollados la especialización de un aparato que permita su captación y entrega a la circulación. Al mismo tiempo, y como resultado del metabolismo, se produce dióxido de carbono (CO_2), que necesariamente debe ser eliminado al exterior (Calderón, op. cit.).

Debido a la baja solubilidad del O_2 , muchos animales poseen pigmentos respiratorios para transportar los gases respiratorios en su sangre, siendo el más común en el reino animal la hemoglobina (Hb), que posee una elevada afinidad por el O_2 .

Por otra parte, en los vertebrados, la mioglobina (Mb) se encarga de almacenar el O_2 en los músculos, por lo que su afinidad por éste es mucho mayor que la de la hemoglobina (Calderón, op. cit.; Hickman et al., op. cit.).

Entre los sistemas respiratorios se encuentra el pulmonar, cuya función es la ventilación, la cual lleva a cabo en combinación con el sistema circulatorio, de modo que el O_2 en un vertebrado homeotermo se almacena en tres compartimentos (fig. 1): los sistemas respiratorio (pulmones) y circulatorio (ligado a la hemoglobina) y los músculos (ligado a la mioglobina) (revisado en Butler, 2004).

La frecuencia respiratoria (FR) viene determinada en función de las necesidades metabólicas y del equilibrio ácido-base de la sangre, manteniendo las presiones parciales de los gases respiratorios dentro de límites muy estrechos, incluso en circunstancias fisiológicas muy extremas, como sucede en el ejercicio intenso o la permanencia en grandes alturas (Hill, 1979; Calderón, op. cit.).

Curiosamente, es el CO_2 , y no el O_2 , el gas que más afecta a la FR, ya que, al combinarse con el agua, aumenta la acidez de la sangre, estimulando los quimiorreceptores respiratorios, lo que conlleva un aumento tanto del ritmo como de la profundidad de la respiración (Hickman et al., op. cit.).

Es bien conocido que los buceadores humanos pueden permanecer sumergidos y sin respirar mucho más tiempo si previamente hiperventilan vigorosamente sus pulmones.

La hiperventilación, que consiste en respiraciones rápidas y profundas, permite una eliminación del CO_2 más rápida que su producción, reduciendo así la concentración de CO_2 en sangre y aumentando el pH (alcalosis respiratoria) (Hickman et al., op. cit.; Hill, op. cit.). Todo ello podría sugerir que los cetáceos hubieran adaptado su fisiología a hiperventilar antes de los buceos, para con ello aumentar la duración de los mismos.

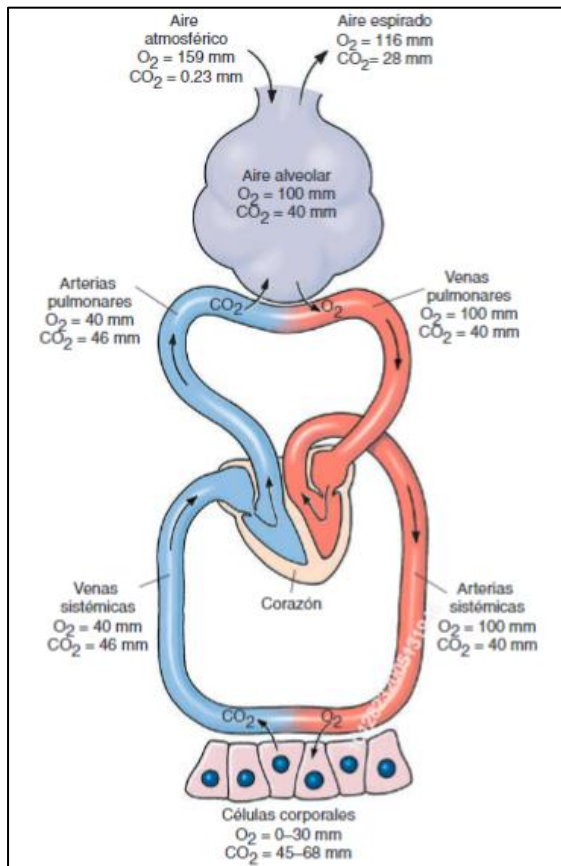


Figura 1 Intercambio de gases respiratorios en los pulmones y en las células. Los números indican las presiones parciales en milímetros de mercurio (mm Hg) (Hickman et al., 2013).

Adaptaciones a la apnea

Los pulmones son estructuras especialmente adaptadas al medio terrestre. En cambio, algunos grupos pulmonados retornaron evolutivamente al agua, como es el caso de algunas aves, reptiles y mamíferos marinos (Hickman et al., op. cit.; Fordyce, 2018). Allí se enfrentaron a un problema logístico clave, la separación espacial de dos recursos vitales: el O₂ en la superficie, y el alimento en la columna de agua (Kramer, 1988).

Durante sus inmersiones, los vertebrados buceadores que respiran aire están expuestos habitualmente a una asfixia progresiva, debida a la combinación de hipoxia, hipercapnia y acidosis (Elsner y Gooden, 1983). Por este motivo, se han adaptado anatómicamente y fisiológicamente (Stewart, 2018), desarrollando dos mecanismos principales que les permiten tolerar períodos prolongados de apnea y aumentar su capacidad de buceo, para minimizar el tiempo necesario en superficie y maximizar la duración de sus buceos y, por tanto, de búsqueda y captura de presas: i) reducir su consumo durante las inmersiones; y ii) aumentar su capacidad de almacenamiento de O₂ (Scholander, 1940; Butler y Jones, 1982; Butler, 2004).

Al contrario que las aves y reptiles marinos, los mamíferos buceadores se enfrentan a un problema adicional: sus cerebros, de mayor tamaño que en otra fauna, requieren mucho más O₂. Los mamíferos buceadores desarrollan una deuda de O₂ mientras cazan bajo el agua, ya que las reservas internas de O₂ se utilizan para alimentar el metabolismo aeróbico, que es el único que puede darse en el cerebro (Fahlman et al., 2017; Fahlman et al., 2008a; Kooyman y Ponganis, 1998; Scholander, op. cit.). Es por ello que las adaptaciones de estos mamíferos al buceo son únicas entre los vertebrados (Kooyman y Ponganis, 2017).

Además de ajustes cardiovasculares como episodios cíclicos de isquemia selectiva y reperfusión (Zenteno-Savín et al., 2012), los mamíferos buceadores permiten el colapso progresivo de sus pulmones al incrementarse la presión en profundidad (Ridgway y Howard, 1979), de modo que el intercambio gaseoso con la sangre está limitado a menos de 100 m desde la superficie. A mayores profundidades, estos animales dependen del O₂ almacenado en los tejidos y por ello han desarrollado la capacidad de almacenar más del 80% de las reservas en la sangre y los músculos (Kooyman y Ponganis, 1998).

Dichas reservas dependen del volumen pulmonar, el volumen sanguíneo, la concentración de Hg, su afinidad por el O₂, la masa muscular, la concentración de Mg y

la cantidad de O₂ extraíble durante el buceo (Kooyman y Ponganis, op. cit.; Elsner, 1999; Ramírez et al., 2007).

Las especies pulmonadas buceadoras de menor tamaño compensan sus reducidos volúmenes con mayores concentraciones de Mg, como sucede en los pingüinos emperadores adultos (*Aptenodytes forsteri*), que presentan una de las mayores concentraciones de Mg conocidas (Ponganis et al., 1997; Ponganis, 2015). De manera similar, las especies de buceo profundo aumentan el O₂ disponible a través de una mayor concentración de Mg, ya que un mayor volumen pulmonar aumentaría la cantidad de nitrógeno absorbido durante las inmersiones, incrementando así el riesgo de enfermedad descompresiva (Piscitelli et al., 2010).

El calderón de aleta corta o tropical

Los problemas de separación de recursos y costo del transporte son especialmente graves para las especies de buceo profundo (Aguilar de Soto et al., 2008), y si en algo coinciden todos los modelos de depredación en apnea es en la importancia de nadar a velocidades moderadas y de mantener una tasa metabólica baja durante el buceo para optimizar / reducir las reservas de O₂ (Thompson et al., 1993; Williams et al., 1999; Reina et al., 2005; Wallace et al., 2005).

Aun así, existe una excepción interesante: el calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*), ya que no sólo depreda a grandes profundidades en apnea (profundidad máxima de 1018m), sino que su estrategia de depredación implica en muchos casos la realización de esprints de hasta 9 m s⁻¹ que consumen un alto porcentaje (10-36%) del costo energético del buceo, lo cual le ha conferido el sobrenombre de “guepardo de aguas profundas” (Aguilar de Soto et al., op. cit.).

Ridgway y Howard (op. cit.) descubrieron que, debido al colapso pulmonar en profundidad y el consecuente cese del intercambio gaseoso, el contenido de O₂ en la primera espiración después de una inmersión profunda en delfines mulares (*Tursiops truncatus*) es mayor que después de una somera, y, por la misma razón, lo contrario sucede con el CO₂ (Miller y Roos, op. cit.).

En base a esto, si el CO₂ fuera el parámetro más influyente en la FR, esperaríamos que ésta fuera mayor después de un buceo somero que uno profundo.

En cambio, se ha determinado que la FR a menudo muestra una correlación positiva con el aumento de la actividad (Blix y Folkow, 1995; Sumich, 1983) y la profundidad y / o duración de la inmersión (Dolphin, 1987b; Würsig et al., 1986). Esta correlación

también ha sido observada en calderones tropicales (Aguilar de Soto, op. cit.), pero es necesario verificarla y profundizar en el estudio de los parámetros que influyen en la tasa respiratoria (Fahlman et al., 2016).

Por lo tanto, los postulados de Ridgway y Howard (op. cit.) podrían no ser aplicables a cetáceos de buceo profundo, especialmente cuando éstos realizan esfuerzos aeróbicos y quizá anaeróbicos durante los mismos. Todavía sabemos muy poco acerca de cómo los cetáceos manejan sus reservas de O₂ (Fahlman, op. cit.; Sumich, 2001; Kooyman et al., 1975; Wahrenbrock et al., 1974), pero se sabe que el perfil de inmersión de los calderones se caracteriza por presentar conjuntos de buceos profundos separados por períodos relativamente largos en superficie en los cuales permanecen frecuentemente sin sumergirse o “aboyados” (logging) (Aguilar de Soto, op. cit.; Olson, 2009).

Todo ello nos lleva a plantearnos las siguientes cuestiones: ¿hiperventilan los calderones antes y / o después de sus inmersiones? ¿Recuperan la deuda de O₂ mediante un aumento en la FR, un mayor tiempo de descanso en superficie, una prolongación de la hiperventilación, o una combinación de dichas estrategias?

La hipótesis que plantea este trabajo es que los calderones aumentan su FR antes de los buceos para llenar sus reservas de O₂ en los músculos y la sangre, y después de los mismos, para liberar rápidamente el CO₂ acumulado y saldar la deuda de O₂. También plantea que la duración y la profundidad de los buceos determinan la rapidez y prolongación de la hiperventilación posterior al buceo, y que los períodos más largos en superficie se dan después los buceos profundos.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de respirometría del calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) para determinar qué factores influyen en su frecuencia respiratoria, con el fin de comprender cómo maneja su respiración antes y después de una inmersión para prepararse y recuperarse de la misma.

Material y métodos

Toma de datos

Se han realizado estudios de respirometría en otros cetáceos, tales como ballenas grises (Summich, 2001) o rorcuales comunes (Lafortuna et al., 2003), y en el caso del presente estudio, la aplicación del método se ve favorecida por el seguimiento de la frecuencia respiratoria en el mismo animal durante muchas horas y en distintos estados de comportamiento.

Tenerife (Islas Canarias) cuenta con una población residente de unos 350 calderones tropicales en la costa suroeste de la isla, principalmente en aguas de 800 a 2000 m de profundidad y alejadas entre 1 y 8 km de la costa (Heimlich-Boran, 1993; Aguilar de Soto, op. cit.). Este estudio analiza los datos de cinco calderones instrumentados en una campaña realizada en 2019 en el suroeste de Tenerife.



Figura 2 DTag empleada para la toma de datos en calderones tropicales (*Globicephala macrorhynchus*).

Los datos fueron tomados con DTags multisensor (fig. 2) (Johnson y Tyack, 2003) unidos con ventosas, que registraron: (i) sonido con 12 resoluciones de 16 bits y a frecuencias de muestreo entre 32 y 96 kHz, (ii) profundidad en metros basada en la presión hidrostática, y (iii) orientación por medio de acelerómetros y magnetómetros triaxiales que proporcionan datos sobre el cabeceo, balanceo y rumbo de la ballena.

La orientación y la profundidad se muestrearon a 50 Hz y se diezmaron a 5 Hz para su análisis. Para este estudio únicamente se hizo uso de los datos de sonido y profundidad.

La duración media de las marcas analizadas fue de 15,35 horas, con un máximo de 37,53 horas, sumando un total de 75,7 horas de marcaje.

Identificación de las respiraciones

Aunque, como muchos animales, los cetáceos también podrían graduar el volumen respiratorio durante su recuperación del ejercicio (Fahlman et al., 2017), hay otros estudios que proponen que los cetáceos intercambian normalmente todo su volumen de intercambio, y por ello este estudio asume la existencia de un solo tipo de soplo. (Olsen et al., 1969).

La extracción de los soplos se realizó en base a la escucha en las grabaciones de cada soplo del animal, mediante la herramienta RespAudit (Mark Johnson, www.soundtags.org), programada específicamente para el estudio en Matlab R2014a y adecuada a los requerimientos de almacenaje de datos y visualización en tiempo real de los mismos (fig. 3).

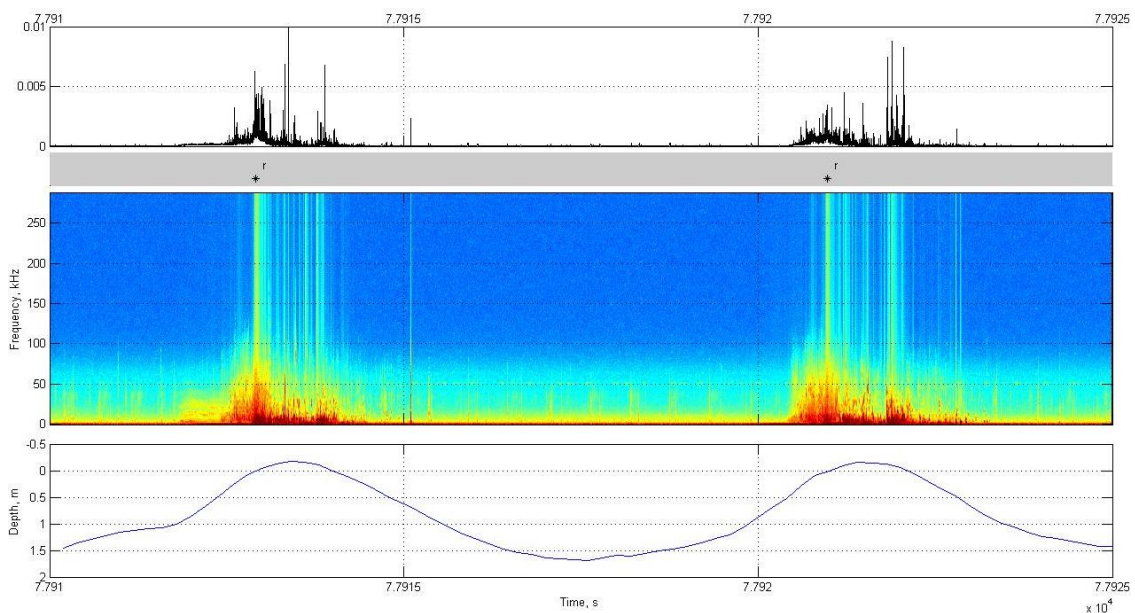


Figura 3 Ejemplo de la gráfica producida por la herramienta RespAudit, que sirve para la escucha y visualización de secciones sucesivas de 15 segundos de la grabación. Se muestran dos respiraciones, marcadas con un asterisco (*r). De arriba a abajo: Gráfica de la onda (amplitud versus tiempo); Espectrograma (frecuencia versus tiempo); Profundidad del animal en cada momento.

Como demostró Aguilar de Soto (op. cit.), se hizo evidente que los soplos se podían relacionar con los movimientos del animal rompiendo la superficie, lo cual se observa en el registro de profundidad. Esto permitió contabilizar las respiraciones con mayor facilidad y rapidez a través de la revisión visual de las gráficas de profundidad.

En cambio, los períodos en los que los animales estaban descansando quietos en superficie (“aboyamiento”), la profundidad no podía ser un indicador de la respiración, por lo que se procedió a escuchar sus correspondientes grabaciones para marcar las respiraciones.

Determinación de la frecuencia respiratoria

A la hora de definir las inmersiones, se escogió el valor de 20 m establecido por Aguilar de Soto (op. cit.) como la profundidad definitoria de inmersión.

Tras contrastar el umbral definitorio del tipo de inmersión que distingue entre inmersiones someras y profundas a partir de los 500 m (Aguilar de Soto, op. cit.), se mantuvo este criterio durante todo el estudio.

Se calculó el número de respiraciones de cada minuto antes y después de cada inmersión y se aisló la frecuencia respiratoria media de los períodos en superficie más alejados de cualquier buceo (a partir de los 10 min). Esta frecuencia la denominamos “frecuencia respiratoria en reposo” o FRr.

También se calcularon las FR previas y posteriores a los buceos, distinguiendo entre inmersiones profundas y someras.

Por otra parte, se midió la duración de cada período en superficie antes y después de cada inmersión, distinguiendo entre buceos profundos y someros.

Finalmente, se calculó la media de cada una de las frecuencias y de la duración de los distintos tipos de período en superficie, para cada individuo, y para el conjunto de individuos.

Análisis estadístico

Se realizaron diferentes correlaciones entre distintos parámetros y se obtuvo el correspondiente coeficiente de Pearson (R).

Se comprobó si los datos eran paramétricos examinando si seguían una distribución normal mediante la variación de Liliefords del test de Kolmogorov-Smirnov, y si su varianza era homogénea mediante el test de Barlett (programado en Matlab por Trujillo-Ortiz y Hernández-Walls, 2003).

Debido al reducido tamaño muestral de este estudio, la mayoría de los datos no cumplían los requisitos paramétricos, por lo que se bajó el nivel de significación de los test hasta 0,01 (Underwood, 1981).

Los análisis estadísticos, así como las gráficas del presente trabajo, se realizaron utilizando el programa Matlab R2014a. El autor de este trabajo aprendió a programar scripts en Matlab para ello.

Se consideró que podían existir diferencias entre los individuos influenciando los resultados totales, dado que el número de réplicas (buceos) de cada individuo no es

homogéneo. Por ello, en este análisis preliminar se graficaron los buceos de cada individuo de un color para evaluar visualmente si seguían las mismas tendencias.

Dado que fueron las mismas, en la continuación del estudio, que desarrollarán el mismo autor de este trabajo y su directora, se ampliará el tamaño muestral para permitir proceder a un análisis estadístico más sofisticado, considerando el individuo como factor de anidación. El presente estudio se centra en un análisis descriptivo y de tendencias de los datos obtenidos.

Resultados

Comportamiento de buceo

Se registraron un total de 211 inmersiones, 166 de las cuales fueron someras, y 45 profundas (tabla 1), con una profundidad máxima registrada de 957 m y duración máxima de 18,56 minutos.

Tabla 1 Datos descriptivos generales (arriba) y de cada individuo (debajo) de los dos tipos de inmersiones analizadas en este estudio.

Tipo de inmersión	Número de inmersiones analizadas	Duración media (min)	Duración máxima (min)	Profundidad media (m)
somera	166	6 (\pm 2,84)	13	118 (\pm 102)
profunda	45	15 (\pm 5,22)	47	688 (\pm 131)

Individuo	Inmersiones someras	Duración media (min)	Profundidad media (m)
1	14	6,63 (\pm 2,58)	112,86 (\pm 77,32)
2	20	5,55 (\pm 3,34)	77,21 (\pm 75,47)
3	12	3,11 (\pm 1,86)	53,28 (\pm 68,79)
4	54	5,41 (\pm 2,76)	72,08 (\pm 58,21)
5	66	7,39 (\pm 2,29)	181,49 (\pm 113,09)

Individuo	Inmersiones profundas	Duración media (min)	Profundidad media (m)
1	10	14,19 (\pm 2,21)	635,38 (\pm 97,44)
2	11	17,88 (\pm 9,97)	647,00 (\pm 102,46)
3	2	15,18 (\pm 0,11)	811,93 (\pm 205,65)
4	19	16,02 (\pm 1,53)	749,19 (\pm 131,51)
5	3	11,94 (\pm 0,50)	543,76 (\pm 25,24)

Se constató que los buceos profundos son los más duraderos, existiendo una fuerte correlación directa entre la profundidad y la duración de las inmersiones (fig. 4), con un índice de correlación de Pearson (R) de 0,94 ($p=0,0000$), de modo que se puede afirmar que la profundidad influye sobre la duración de la inmersión.

En base a la agrupación de los datos en dicha correlación, se confirma la hipótesis del umbral definitorio del tipo de inmersión a partir de los 500 m de profundidad propuesto por Aguilar de Soto (op. cit.), quedando demostrado que los calderones tropicales del suroeste de Tenerife realizan dos tipos de inmersión: las someras, por debajo de los 500 m, que son más cortas; y las profundas, por encima de dicha cota, que son más duraderas. En la gráfica, los puntos indican buceos realizados por animales diferentes.

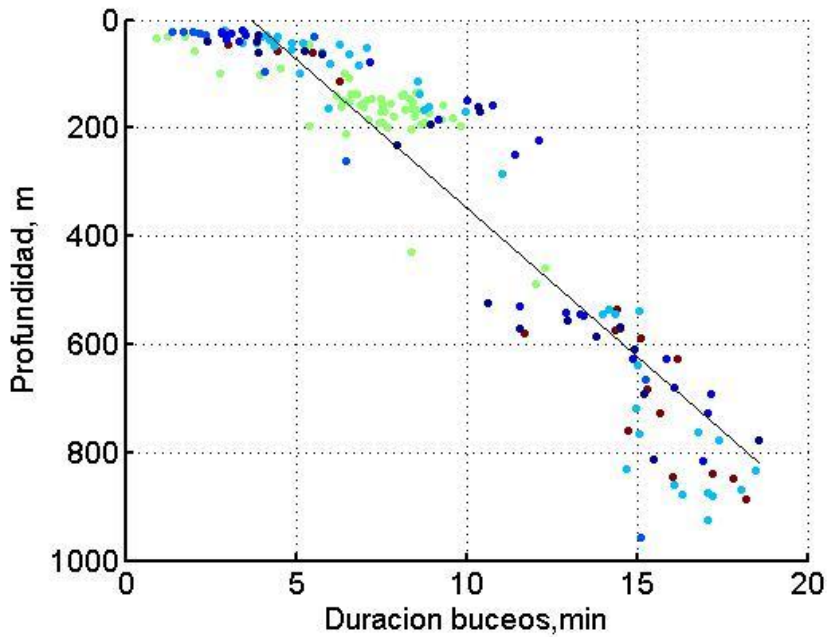


Figura 4 Regresión lineal entre la profundidad (m) y la duración (min) de los buceos, donde cada punto representa una inmersión y su color, el individuo que la realizó. Se observa una fuerte correlación ($R=0,9381$, $p=0,0000$) entre los parámetros y se aprecia una diferenciación a partir de los 500 m entre los buceos, evidenciando que existen dos tipos de inmersión: somera y profunda.

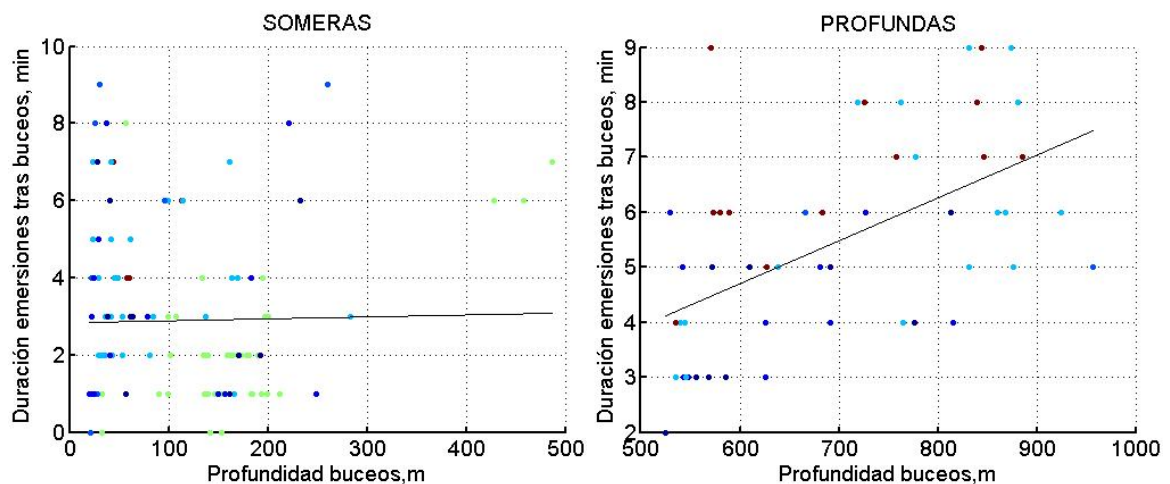


Figura 5 Regresión lineal entre la profundidad de los buceos (m) y la duración (min) del período en superficie posterior o de emersión para inmersiones someras (izquierda) y profundas (derecha), en la que cada punto representa un buceo y su color, el individuo que la realizó. Se observa que no existe una correlación en las inmersiones someras ($R=0,0188$; $p=0,8357$), pero sí en las profundas ($R=0,5484$; $p=0,0000$).

Tiempo de recuperación post-inmersión

Como se muestra en la figura 5, existe una correlación directa entre la duración del período en superficie tras los buceos profundos y la profundidad de los mismos, con un valor R de 0,5484 ($p=0,0000$). Es decir, la profundidad de un buceo influye positivamente sobre el tiempo que el animal se recupera en superficie tras el mismo.

En el caso de las inmersiones someras, esta correlación es casi nula, con un valor R de 0,0188 ($p=0,8357$).

Frecuencia respiratoria

Se describió que los calderones hacen series de buceos, considerándose como 10 minutos entre buceos el umbral para que se considere que dichos buceos pertenecen a una serie (Aguilar de Soto, 2006). Por ello, aquí se midió la FR media cuando los calderones se encuentran alejados al menos 10 min de un buceo, para definir la FR de reposo (FRr), que presenta una media de 2 soplos min^{-1} .

A medida que el animal se acerca a un buceo, la FR comienza a elevarse, alcanzando sus valores máximos antes y después de las inmersiones profundas, concretamente en el primer minuto tras la emersión (FR máxima registrada de 14 soplos min^{-1}).

Ya en el perfil de buceo resultante del análisis respirométrico de cada individuo analizado se pudo intuir a simple vista que existe una mayor concentración de las respiraciones antes y especialmente después de las inmersiones, siendo particularmente apreciable después de los buceos profundos, como se muestra en la figura 6.

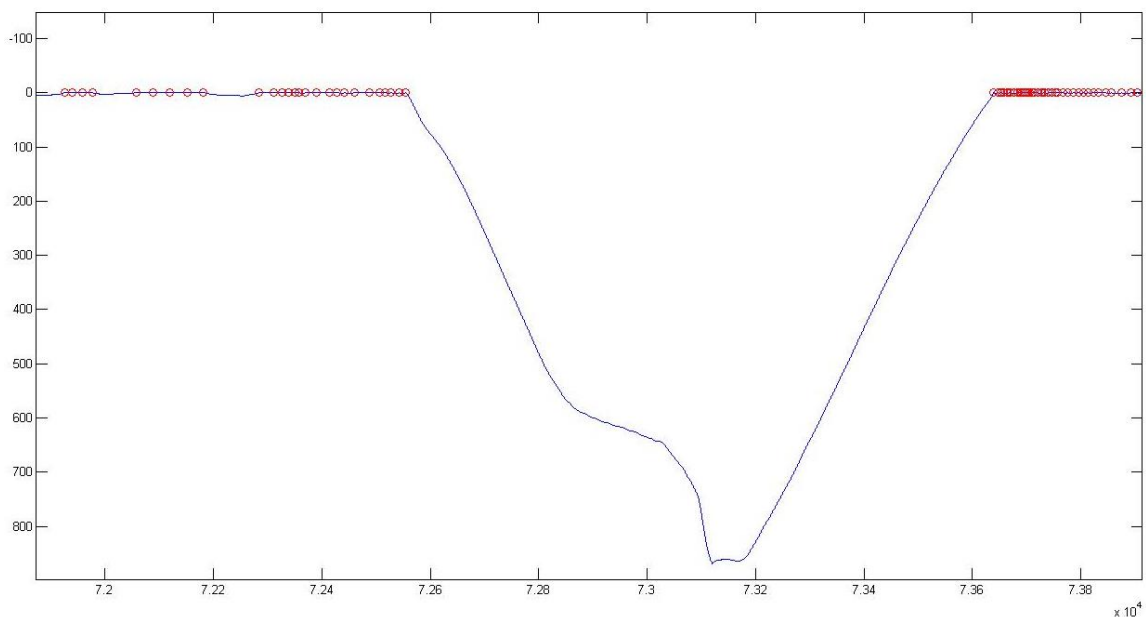


Figura 6 Ejemplo del perfil de buceo (profundidad en metros versus tiempo en segundos) de una inmersión profunda. Las respiraciones se muestran marcadas con un círculo rojo. Se aprecia que existe una mayor concentración de las respiraciones antes y especialmente después del buceo.

Entre los períodos considerados para la regresión lineal entre la FR y el tiempo previo y posterior a un buceo (50 y 10 minutos), la correlación fue significativa 50 minutos antes de las inmersiones profundas ($R=-0,1621$; $p=0,0004$), y especialmente a partir de los 10 minutos antes y después del buceo (fig. 7), siendo ésta más fuerte durante los 10 minutos posteriores a las mismas.

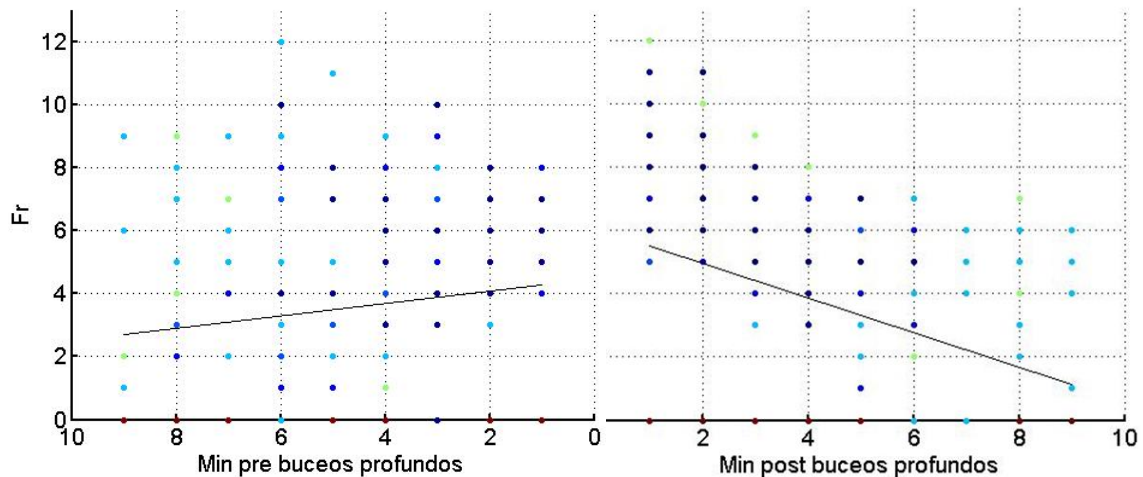


Figura 7 Regresión lineal entre la FR (n° soplos/min) y la distancia temporal (min) antes (izquierda) y después (derecha) de los buceos profundos, en la que cada punto representa una muestra de FR en ese minuto y su color, el individuo del que se obtuvo. Se observa que la FR aumenta ligeramente a medida que el animal se acerca a la inmersión ($R= - 0,1430$; $p = 0,0070$), alcanzando sus valores máximos justo después de la misma. A medida que el animal se aleja de la emersión, la FR desciende ($R= - 0.3697$; $p=0,0000$).

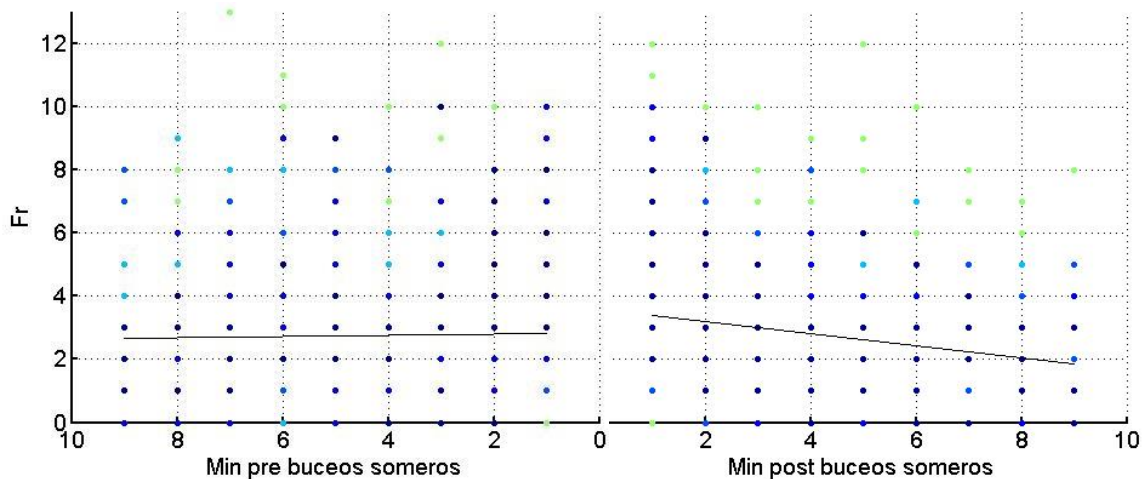


Figura 8 Regresión lineal entre la FR (n° soplos/min) y la distancia temporal (min) antes (izquierda) y después (derecha) de los buceos someros, en la que cada punto representa una muestra de FR en ese minuto y su color, el individuo del que se obtuvo. Se observa que la FR apenas aumenta a medida que el animal se acerca a la inmersión ($R= - 0,0178$; $p = 0,6200$). Tras la emersión, la FR está aumentada, pero normalmente no alcanza valores muy elevados y desciende ($R= - 0,1908$; $p=0,0000$).

Así, en este período de tiempo, el período temporal previo al buceo influye negativamente sobre la FR del minuto correspondiente, de modo que la FR disminuye a medida que hay más tiempo antes del buceo, es decir, que aumenta ligeramente ($R=-0,1430$; $p=0,0070$) en los 10 minutos previos a una inmersión profunda.

De igual manera, el período temporal tras la emersión durante este período influye sobre la FR del minuto en cuestión, por lo que la FR disminuye a lo largo de los 10 minutos posteriores a un buceo profundo ($R=-0,3697$; $p=0,0000$).

En cambio, en el caso de las inmersiones someras, la correlación sólo fue significativa en los 10 minutos posteriores a la emersión, con una influencia mucho más baja (fig. 8).

La FR media resultó ser siempre superior durante los primeros 10 minutos antes y después de una inmersión profunda frente a las inmersiones someras, como se observa en la figura 9.

En esta figura también se aprecia que la FR previa a un buceo profundo aumenta antes y más rápido, para establecerse en una media de 6 soplos min^{-1} justo antes de sumergirse frente a los 3,7 soplos min^{-1} que presentan de media para el minuto previo a las inmersiones someras. Antes de una inmersión somera, la FR se mantiene por debajo de 2 soplos min^{-1} hasta el cuarto minuto previo al buceo, mientras que, en los 10 minutos previos a una inmersión profunda, la FR media siempre es superior a este valor y, además, alcanza los 4 soplos min^{-1} en torno a los 5 minutos antes de que el animal se sumerja.

Algo similar sucede tras la emersión, ya que, tras los buceos profundos, la FR media se establece en 8 soplos min^{-1} frente a los 5 soplos min^{-1} que presentan de media para el minuto posterior a las inmersiones someras. A continuación, la FR desciende rápidamente tras las inmersiones someras, cayendo a los 3,2 soplos min^{-1} ya en el segundo minuto y llegando a la FRr en el tercer minuto. En el caso de las inmersiones profundas, la FR no baja de los 3 soplos min^{-1} hasta pasados 5,5 minutos y sólo se acerca a la FRr media pasados los 10 minutos.

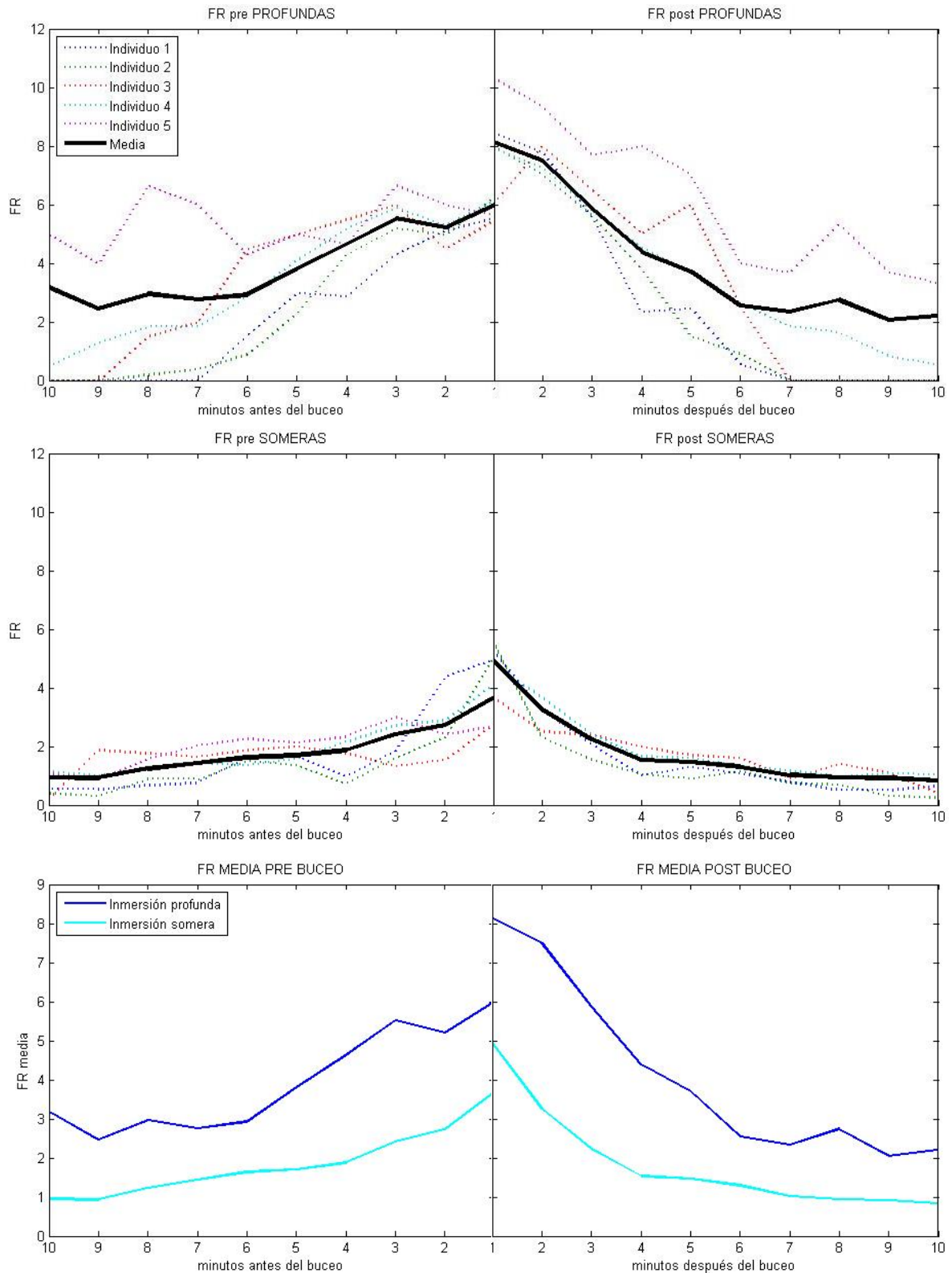


Figura 9 Frecuencias respiratorias (FR) medias antes (izquierda) y después (derecha) de una inmersión profunda y somera. Arriba se muestran las medias individuales y debajo una superposición entre las medias totales para las inmersiones someras y profundas. Se observa que la curva siempre asciende ligeramente antes del buceo y alcanza sus valores máximos el primer minuto tras la emersión, siendo esto más evidente en las inmersiones profundas.

Discusión

Si bien el uso de medidas fisiológicas como la respirometría para la investigación de cuestiones a gran escala en la ecología y la biología de la conservación es cada vez más frecuente en toda la comunidad científica (Wikelski y Cooke, 2006; Seebacher y Franklin, 2012), actualmente existen pocas referencias sobre estudios respirométricos en cetáceos de buceo profundo (Aguilar de Soto, 2006).

Examinando las respuestas fisiológicas de los organismos a los estresores ambientales, los científicos cada vez son más capaces de establecer vínculos importantes entre las condiciones ambientales y el rendimiento del animal (Cooke et al., 2013).

A medida que los humanos continúan ejerciendo mayor presión sobre el medio ambiente, ahora más que nunca, es importante poder comprender los efectos de los estresores externos sobre los organismos (Wikelski y Cooke, op. cit.).

El análisis de respirometría presentado en este trabajo describe el comportamiento respiratorio de una especie de cetáceo de buceo profundo catalogada desde 2018 en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Minton et al., 2018): el calderón tropical o de aleta corta.

Cuando estos animales se encuentran en reposo, su FR es relativamente baja (FRr media de 2 soplos min⁻¹). Este dato puede servir a modo de referencia para hacerse una idea de la FR en ausencia de estrés y de eventos de inmersión, y así poder compararla con el aumento de la FR antes y después de un buceo, y con posibles efectos de estresores. No obstante, cabe mencionar que un análisis más profundo debe evaluar el registro acústico para descartar la existencia de algún factor que pudiera alterar o estresar al animal durante el período establecido como tiempo de reposo.

Como describió Aguilar de Soto (op. cit.), este estudio confirma que los calderones realizan dos tipos de inmersiones: las someras y las profundas, a partir de los 500 m.

Su consumo de O₂ durante los períodos en superficie debe no únicamente satisfacer el gasto metabólico basal durante estos períodos, sino también compensar el consumo de las inmersiones en apnea (Miller y Roos, op. cit.).

Dado que, además, su estrategia de depredación más común durante el día se basa en esprints a profundidades superiores a los 600 m, es muy probable que estos animales estén incurriendo en ejercicio anaeróbico, debiendo compensar a posteriori el uso de rutas metabólicas anaeróbicas, procesando el ácido láctico generado durante el buceo (Aguilar de Soto et al., op. cit.; Kooyman y Ponganis, 2017).

Esta deuda de O₂ parece ser saldada por los calderones mediante la acción combinada de dos estrategias respiratorias principales.

En primer lugar, los resultados de este estudio indican que existe un ajuste de la duración de los períodos de recuperación en superficie a la profundidad / duración de las inmersiones profundas, de modo que, cuanto más profundo y duradero es el buceo que realizan, mayor es el tiempo de reposo en superficie tras el mismo.

Por el contrario, cuando la inmersión es somera, no existe esa correlación, lo cual se puede interpretar como una evidencia de que, en los buceos someros, los calderones no incurren en ninguna deuda de O₂, por lo que no deben pasar más tiempo en superficie tras los mismos, independientemente de su duración y / o profundidad. En cambio, en el caso de los buceos profundos, sí estarían desarrollando una deuda de O₂, la cual incrementaría con la profundidad y duración del buceo, llevando a los calderones a saldarla mediante un aumento en la duración del período en superficie posterior a la inmersión.

En segundo lugar, se ha comprobado que regulan su tasa respiratoria voluntariamente, preparándose para los buceos con un incremento de la FR que sólo resultó significativo antes de las inmersiones profundas, e hiperventilando tras los mismos, siendo esta hiperventilación más rápida y duradera tras las inmersiones profundas.

A pesar de que el aumento en la FR durante los 10 minutos previos a una inmersión somera no fuera significativo, se aprecia en la figura 9 que podría deberse a que la hiperventilación preparatoria en las someras parece comenzar mucho después, concretamente en los cuatro minutos previos al buceo. Esto no se pudo confirmar debido a un tamaño muestral insuficiente para esos minutos en concreto. Por este motivo, debe continuar la investigación al respecto para poder determinar con exactitud en qué momento comienza la hiperventilación antes de las inmersiones someras.

La hiperventilación preparatoria previa a los buceos profundos podría indicar que los calderones están asegurando un repostaje completo de O₂ en las reservas musculares en forma de oxi-Mg, además de una eliminación del CO₂ más rápida que su producción, reduciendo así la concentración de CO₂ en sangre y aumentando el pH, forzando una alcalosis respiratoria para ganar cierto margen frente a la acidosis e hipercapnia que conlleva la inmersión profunda y así aumentar su capacidad de buceo.

Tras los buceos, la FR alcanza sus máximos valores, produciéndose una hiperventilación que cesa 3 minutos después de la emersión en el caso de las

inmersiones someras, pero que se mantiene hasta pasados 10 minutos tras la emersión después de las profundas.

La razón de esta hiperventilación post-inmersión podría ser un desajuste en el equilibrio ácido-base sanguíneo. Esto explicaría que la hiperventilación sea mucho más breve y lenta tras las inmersiones someras, ya que este desequilibrio se debería exclusivamente a la acumulación de CO₂ en los tejidos y la sangre.

La recuperación de un ejercicio aeróbico es corta y se realiza a corto plazo tras el mismo, pero el uso del metabolismo anaeróbico requiere de períodos de recuperación largos (Kooyman, 1989; Butler y Jones, 1997), que se pueden realizar inmediatamente tras el esfuerzo anaeróbico, o bien tras una serie de esfuerzos durante los cuales se acumula el ácido láctico (Baker y Gleeson, 1999).

De hecho, la hiperventilación en la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) puede continuar durante una hora después de que las presiones parciales de O₂ y CO₂ vuelvan a los niveles de reposo, lo que indica que ésta es mantenida, más bien, por cambios inducidos por el ácido láctico en el equilibrio ácido-base sanguíneo (Miller y Roos, op. cit.).

Por lo tanto, la hiperventilación más rápida y duradera tras las inmersiones profundas podría estar indicando no sólo una mayor acumulación de CO₂, sino la realización de ejercicio anaeróbico durante el buceo, con la consecuente producción de ácido láctico.

Conclusiones

Este trabajo consiste en un estudio respirométrico del comportamiento respiratorio de un cetáceo de buceo profundo. Utiliza para ello un instrumento no invasivo, la DTag, capaz de grabar una variedad de datos de múltiples sensores de cetáceos en libertad. El trabajo se desarrolló en las Islas Canarias, en base a una población conocida de calderones tropicales (*Globicephala macrorhynchus*) en Tenerife. Estos cetáceos han sido bautizados como guepardos de aguas profundas debido a que realizan esprints en profundidad como estrategia principal de depredación y actualmente se desconoce cómo gestionan sus reservas para poder mantener dicha estrategia.

Se analizaron las grabaciones de 6 individuos, marcando cada una de las respiraciones para posteriormente calcular la frecuencia respiratoria por minuto (FR) y así poder estudiar su evolución en torno a los dos tipos de inmersiones que realizan estos animales: someras y profundas, a partir de los 500 m.

Las principales conclusiones obtenidas son las siguientes:

En primer lugar, los calderones presentan una FR en reposo de 2 soplos min⁻¹. Cuando la inmersión es profunda, los calderones incurren en una deuda de oxígeno que será mayor cuanto más profundo y duradero sea el buceo. Para poder saldar dicha deuda, presentan dos estrategias respiratorias principales: (i) ajustan la duración de sus períodos de recuperación en superficie a la profundidad / duración de las inmersiones profundas, de modo que, cuanto más profundo y duradero es el buceo que realizan, mayor es el tiempo de reposo en superficie tras el mismo; y (ii) regulan su tasa respiratoria voluntariamente, preparándose para los buceos con un incremento de la FR que es especialmente elevado antes de las inmersiones profundas, e hiperventilando tras los mismos, siendo esta hiperventilación más rápida y duradera tras las inmersiones profundas.

Se plantea continuar este estudio para aumentar el tamaño muestral y profundizar en los parámetros que influyen en la tasa respiratoria, incluyendo diferencias de tamaño, indicador de edad, de los animales muestreados.

Bibliografía

- Aguilar de Soto, N.** 2006. Comportamiento acústico y de buceo del calderón tropical (*Globicephala macrorhynchus*) y del zifio de Blainville (*Mesoplodon densirostris*) en las Islas Canarias: Implicaciones sobre los efectos del ruido antrópico y las colisiones con embarcaciones. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.
- Aguilar de Soto, N., Johnson, M. P., Madsen, P. T., Díaz, F., Domínguez, I. et al.** 2008. Cheetahs of the deep sea: deep foraging sprints in short-finned pilot whales off Tenerife (Canary Islands). *Journal of Animal Ecology* **77**(5): 936-947.
- Baker, E. J. y Gleeson, T. L.** 1999. The effects of intensity on the energetics of brief locomotor activity. *The Journal of Experimental Biology* **202**: 3081-3087.
- Blix, A. S. y Folkow, L. P.** 1995. Daily energy expenditure in free living minke whales. *Acta Physiologica of the Scandinavian Physiological Society* **153**: 61-66.
- Butler, P. J.** 2004a. Metabolic regulation in diving birds and mammals. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **14**: 297-315.
- Butler, P. J. y Jones, D. R.** 1982. The comparative physiology of diving in vertebrates. *Advances in comparative physiology and biochemistry* **8**: 179-364.
- Butler, P. J. y Jones, D. R.** 1997a. Physiology of diving of birds and mammals. *Physiological Reviews* **77**: 837-899.
- Calderón, J.** 2007. Aspectos estructurales y mecánicos de la respiración, p. 167-194. *En*: Calderón, J., Fisiología aplicada al deporte. Editorial Tébar, Madrid.
- Cooke, S. J., Sack, L., Franklin, C. E., Farrell, A. P., Beardall, J., et al.** 2013. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology* **1**(1): cot001.
- Dolphin, W. F.** 1987b. Ventilation and dive patterns of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, on their Alaskan feeding grounds. *Canadian Journal of Zoology* **65**: 83-90.
- Elsner, R.** 1999. Living in water: solutions to physiological problems, p. 73-116. *En*: Reynolds III, J.E., Rommel, S.A. (eds.), *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Elsner, R. y Gooden, B. A.** 1983. Diving and asphyxia: a comparative study of animals and man. *Monographs of the Physiological Society* **140**: 168p.

Excursiones Tina - Whale Watching La Gomera. www.excursiones-tina.com. Galería de imágenes. Calderones tropicales. Obtenido de <https://www.excursiones-tina.com/media/2587/excursiones-tina-120724-0099-800x600.jpg>

Fahlman, A., Moore, M. J., y Garcia-Parraga, D. 2017. Respiratory function and mechanics in pinnipeds and cetaceans. *Journal of Experimental Biology* **220(10)**: 1761-1773.

Fahlman, A., Svärd, C., Rosen, D. A. S., Jones, D. R. y Trites, A. W. 2008a. Metabolic costs of foraging and the management of O₂ and CO₂ stores in Steller sea lions. *Journal of Experimental Biology* **211**: 3573-3580.

Fahlman, A., van der Hoop, J., Moore, M. J., Levine, G., Rocho-Levine, J. et al. 2016. Estimating energetics in cetaceans from respiratory frequency: why we need to understand physiology. *Biology open* **5(4)**: 436-442.

Fordyce, R. E. 2018. Cetacean evolution, p. 180-185. *En*: Würsig, B., Thewissen, J. G. M., y Kovacs, K. M. (eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press.

Gray, J. E. 1846. On the cetaceous animals, p. 33. *En*: Richardson, J. y Gray, J. E (eds.), *The zoology of the voyage of H.M.S. Erebus and Terror. Volume 1: Mammalia and Birds*. Longmans, Brown, Green y Longmans, Londres.

Heimlich-Boran, J. 1993. Social organization of the short-finned pilot whale, *Globicephala macrorhynchus*, with special reference to the comparative social ecology of delphinids. Tesis Doctoral, Cambridge University.

Hickman, C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Larson, A., l'Anson, H., et al. 2013. Fluidos internos y respiración, p. 686-707. *En*: Sánchez, C. y León, M. (eds.), *Principios integrales de zoología* (14 ed.). McGraw-Hill-Interamericana, Madrid.

Hill, R. W. 1979. Respuesta metabólica a la carencia de oxígeno y al descenso de la disponibilidad de oxígeno, p. 681-768. *En*: Palomeque, J. (ed.), *Fisiología animal comparada*. Reverté, Barcelona.

Johnson, M. P. y Tyack, P. L. 2003. A digital acoustic recording tag for measuring the response of wild marine mammals to sound. *IEEE Journal of Oceanic Engineering* **28**: 3-12.

Kooyman, G. L. 1989. *Diverse Divers: Physiology and behavior*. Springer-Verlag, Nueva York.

Kooyman, G. L. and Ponganis, P. J. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annual Review of Physiology* **60**: 19-32.

- Kooyman, G. L. y Ponganis, P. J.** 2017. Diving physiology, p. 267-270. *En:* Würsig, B., Thewissen, J. G. M., y Kovacs, K. M. (eds.), Encyclopedia of marine mammals. Academic Press.
- Kramer, D. L.** 1988. The behavioral ecology of air breathing by aquatic animals. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 89-94.
- Lafortuna, C. L., Jahoda, M., Azzellino, A., Saibene, F. y Colombini, A.** 2003. Locomotor behaviours and respiratory pattern of the mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *European Journal of Applied Physiology* **90**: 387–395.
- Lighton, J. R.** 2008. Measuring Metabolic Rates: A manual for scientists. Oxford University Press, Oxford.
- Miller, P. J. y Roos, M. M.** 2018. Breathing, p. 140-143. *En:* Würsig, B., Thewissen, J. G. M., y Kovacs, K. M. (eds.), Encyclopedia of marine mammals. Academic Press.
- Minton, G., Braulik, G., y Reeves, R.** 2018. *Globicephala macrorhynchus*. The IUCN Red List of Threatened Species: e. T9249A50355227 **10**: 2018-2.
- Olsen, C. R., Hale, F. C. y Elsner, R.** 1969. Mechanics of Ventilation in the Pilot Whale. *Respiration Physiology* **7**: 137-149.
- Olson, P. A.** 2009. Pilot whales: *Globicephala melas* and *G. macrorhynchus*, p. 847-852. *En:* Würsig, B., Thewissen, J. G. M., y Kovacs, K. M. (eds.), Encyclopedia of marine mammals. Academic Press.
- Piscitelli, M. A., McLellan, W. A., Rommel, S. A., Blum, J. E., Barco, S. G. et al.** 2010. Lung size and thoracic morphology in shallow- and deep-diving cetaceans. *Journal of Morphology* **271**: 654-673.
- Ponganis, P. J.** 2015. Diving physiology of marine mammals and seabirds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ponganis, P. J., Kooyman, G. L., Starke, N., Kooyman, C. A. y Kooyman, T. G.** 1997a. Post-dive blood lactate concentrations in emperor penguins, *Aptenodytes forsteri*. *Journal of Experimental Biology* **200**: 1623- 1626.
- Ramírez, J. M., Folkow, L. P., Blix, A. S.** 2007. Hypoxia tolerance in mammals and birds: From the wilderness to the clinic. *Annual Review of Physiology* **69**:113–143.
- Reina, Abernathy, K.J., Marshal, G.J. y Spotila, J.R.** 2005. Respiratory frequency, dive behaviour and social interactions of leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, during the interesting interval. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **316**: 1-16.

- Ridgway, S. H. y Howard, R.** 1979. Dolphin lung collapse and intramuscular circulation during free diving: evidence from nitrogen washout. *Science* **206**: 1182-1183.
- Rodgers, G. G., Tenzing, P., y Clark, T. D.** 2016. Experimental methods in aquatic respirometry: the importance of mixing devices and accounting for background respiration. *Journal of fish biology* **88**(1): 65-80.
- Scholander, P. F.** 1940. Experimental investigations on the respiratory function in diving mammals and birds. *Hvalradets Skrifter* **22**.
- Seebacher, F. y Franklin, C. E.** 2012. Determining environmental causes of biological effects: the need for a mechanistic physiological dimension in conservation biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **367**: 1607-1614.
- Stewart, B. S.** 2018. Diving behavior, p. 321-327. *En*: Würsig, B., Thewissen, J. G. M., y Kovacs, K. M. (eds.), *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press.
- Sumich, J. L.** 1983. Swimming velocities, breathing patterns, and estimated costs of locomotion in migrating gray whales, *Eschrichtius robustus*. *Canadian Journal of Zoology* **61**: 647-652.
- Summich, J. L.** 2001. Direct and indirect measurement of oxygen extraction, tidal lung volumes and ventilation rates in a young captive gray whale, *Eschrichtius robustus*. *Aquatic mammals* **27**: 279-283.
- Thompson, D., Hiby, A. R. y Fedak, M. A.** 1993. How fast should I swim? Behavioural implications of diving physiology. *Symposia of the Zoological Society of London* **66**: 223-232.
- Underwood, A. J., y AJ, U.** 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology.
- Wahrenbrock, E. A., Maruscha, G. F., Elsner, R. y Kenney, D. W.** 1974. Respiration and metabolism in two baleen whale calves. *Marine Fisheries Review* **36**: 3-9.
- Wallace, B. P., Williams, C. L., Paladino, F. V, Morreale, S. J., Lindstrom, R. T. et al.** 2005. Bioenergetics and diving activity of internesting leatherback turtles *Dermochelys coriacea* at Parque Nacional Marino Las Baulas, Costa Rica. *Journal of Experimental Biology* **208**: 3873-3884.
- Wikelski, M. y Cooke, S. J.** 2006. Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution* **21**: 38-46.

Williams, T. M., Noren, D., Berry, P. S., Estes, J. A., Allison, C. et al. 1999. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) III. Thermoregulation at depth. *Journal of Experimental Biology* **202**: 2763-2769.

Würsig, B., Wells, R. S. y Croll, D. A. 1986. Behavior of gray whales summering near St. Lawrence Island, Bering Sea. *Canadian Journal of Zoology* **64**: 611-621.

Zenteno-Savín, T., Vázquez-Medina, J. P., Cantu-Medellín, N., Ponganis, P. J. y Elsner, R. 2012. Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage, p.178-190. *En*: Abele, D., Vázquez-Medina, J. P. and Zenteno-Savín, T. (eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.