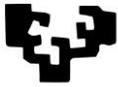
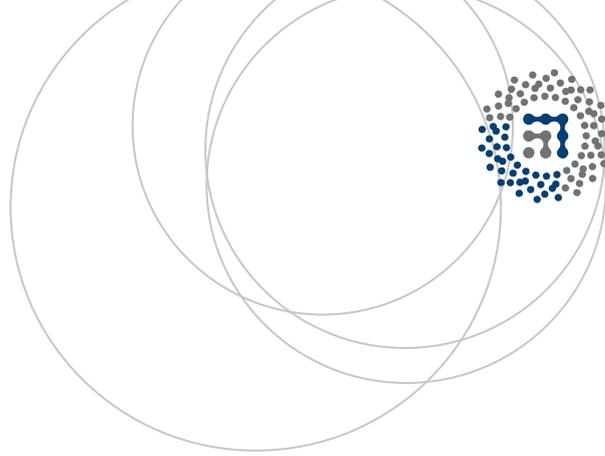


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Biología Gradua / Grado en Biología

# **Análisis del coste energético de la osmorregulación en el decápodo *Pachygrapsus marmoratus***

Egilea/Autor:  
Zuriñe Barrasa Márquez

Zuzendaria/Director/a:  
Juan Ignacio Pérez Iglesias

Leioa, Septiembre del 2014



## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. EJEMPLARES UTILIZADOS.....	7
3.2. MANTENIMIENTO.....	8
3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	9
3.4. DETERMINACIONES FISIOLÓGICAS.....	10
i. Determinación de la tasa metabólica.....	10
ii. Concentración osmótica de la hemolinfa.....	10
iii. Contenido hídrico de los tejidos.....	11
3.5. TRATAMIENTO DE DATOS.....	12
3.6. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS.....	12
4. RESULTADOS.....	14
4.1. REGISTRO DE MUERTES.....	14
4.2. CONTENIDO HÍDRICO DE LOS TEJIDOS.....	15
4.3. METABOLISMO.....	17
5. DISCUSIÓN.....	20
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	23
7. AGRADECIMIENTOS.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25



## **1. RESUMEN**

El crustáceo decápodo *Pachygrapsus marmoratus*, conocido como "cangrejo corredor" o "cangrejo zapatero", es un organismo que habita en la zona intermareal rocosa de la costa. No se caracteriza precisamente por su interés económico pero resulta muy útil para el análisis de ciertas variables fisiológicas relacionadas con su modo de vida. En su condición de osmorregulador eurihalino, es capaz de regular los cambios bruscos de salinidad a los que se encuentra sometido debido, principalmente, a la acción de las mareas. Es evidente que la regulación del medio interno implica un gasto energético que se ve traducido en un aumento de la tasa metabólica. En este estudio se aborda el análisis del coste energético de la osmorregulación cuando estos animales son sometidos a diferentes salinidades así como la influencia que tienen otras variables, tales como la masa corporal y el tiempo que transcurren los animales en dicha condición, sobre la tasa metabólica en un proceso de aclimatación. Debido a su gran importancia tanto fisiológica como ecológica, en el presente estudio se trata de analizar la relación alométrica que presentan el peso y el metabolismo a fin de evaluar en qué medida influye la talla de los organismos sobre éste último. Tal y como se esperaba la salinidad presenta un efecto claro sobre el metabolismo puesto que una dilución de ésta supone un aumento en la tasa de consumo de oxígeno. Por otro lado, la influencia de la masa corporal y del tiempo es también muy notoria ya que a medida que transcurren los días expuestos a la nueva condición, los cangrejos de mayor tamaño registran tasas de consumo de oxígeno que van en aumento mientras que los de pequeño tamaño descienden sus tasas de consumo de oxígeno. Cabe destacar que el hecho de haber estado expuestos a las condiciones del laboratorio, lugar en el que son mantenidos los ejemplares de este crustáceo, hace que estén sometidos a un estrés continuo que puede influenciar en menor medida, las tasas metabólicas analizadas.



## 2. INTRODUCCIÓN

El cangrejo de mar *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius, 1787), conocido coloquialmente como el "cangrejo zapatero" o "cangrejo corredor", es un crustáceo de pequeño tamaño que pertenece a la clase Malacostraca, orden Decapoda e infraorden Brachyura. Este crustáceo no es comestible y por ello, no tiene interés económico. No obstante, no deja de ser una pesca codiciada para el marisqueo de ocio veraniego y de utilizarse a modo de carnada para la pesca deportiva. En consecuencia, se han llegado incluso a poner en peligro de extinción sus poblaciones y actualmente su distribución se encuentra limitada a la costa del Atlántico Norte, costa Cantábrica, Mediterráneo y Mar Negro (Vidal-Payá, 2011).

El caparazón de estos crustáceos es cuadrangular y ronda los 4cm aproximadamente en animales adultos, pudiendo ser desde colores oscuros hasta jaspeados claros. Una de las características distintivas de *Pachygrapsus marmoratus* es que las quelas del primer par de pereiópodos son ligeramente desiguales, adquiriendo estas un mayor tamaño en machos que en hembras; mientras que los otros 4 pares de pereiópodos son simples apéndices marchadores con pelos. Además, la zona ventral de su cuerpo presenta un color pálido. Los crustáceos decápodos poseen también muy buena visión, la cual viene regida por un par de ojos compuestos (Richter, 2002). De esta forma, la búsqueda de refugios, la comunicación, las respuestas antidepredatorias así como la búsqueda de alimento son comportamientos que se ven favorecidos gracias a este sentido (Hemmi y Zeil, 2003b).

Su cuerpo posee un aplanamiento dorso-ventral que les aporta la capacidad de ser reptantes lo cual es afín al modo de vida que llevan y es que habitan entre las grietas de las rocas (García Socías et al., 1988) de escolleras de puertos y de zonas intermareales e infralitorales, si bien la mayoría de las poblaciones se localizan en el intermareal (Cannicci et al., 1999) ocupando toda la zona de acción de la marea (Flores y Paula, 2001). Por tanto, puede decirse que son animales que llevan a cabo un modo de vida semi-terrestre y a pesar de que no son buenos nadadores es común que habiten en zonas intermareales que quedan sumergidas hasta 2m de profundidad. Para poder hacer frente a estas condiciones semi-terrestres, estos animales son capaces de regular su alimentación consumiendo tanto algas como otros animales (preferentemente lapas y mejillones); de manera que llevan a cabo una dieta omnívora sin llegar a ser considerados simples oportunistas (Cannicci et al., 2002).

La zona o franja intermareal se caracteriza por ser un hábitat altamente variable gracias a la acción de las mareas y del hidrodinamismo que éstas provocan. El hidrodinamismo trae consigo una renovación constante del agua que llega a la zona bentónica y en consecuencia



nuevos alimentos, bien a modo de partículas en suspensión o mediante el arrastre de animales y/o algas. Sin embargo, puede actuar como elemento desestabilizador de las comunidades si se vuelve demasiado intenso. Por otro lado, la luz es otro factor abiótico determinante en esta zona ya que limita la distribución de las comunidades en función de la cantidad y tipo de luz que necesiten para vivir. También la temperatura es otro factor influyente, principalmente por dos motivos: una elevada temperatura disminuye la solubilidad de los gases en el agua y por tanto, la concentración de oxígeno se ve reducida; y además, cuando baja la marea y la temperatura es elevada, parte del agua que se queda en las cubetas de la zona intermareal se evapora haciendo que la concentración salina del agua de dichas cubetas aumente. Este hecho obliga a los animales y algas que viven allí a tener diferentes estrategias para hacer frente a estos cambios bruscos de salinidad ya que entran en juego los factores osmóticos.

La ósmosis se define como el transporte pasivo de agua a través de una membrana semipermeable (como por ejemplo las membranas celulares) teniendo como resultado final que el flujo de agua pasa de la zona de baja concentración (medio hipotónico) a la de alta concentración de soluto (medio hipertónico) (Hill et al., 2004).

En los seres vivos, este movimiento de agua a través de la membrana celular puede producir consecuencias fatales para las células: por una parte que las células se arruguen a causa de una pérdida excesiva de agua y por otra parte puede ocurrir que las células se hinchen y revienten por un aumento excesivo de agua. Para evitar estas dos situaciones es necesaria una regulación en la que las células expulsan el agua o los iones mediante un transporte que requiere cierto gasto de energía.

La tasa metabólica (o índice metabólico) se define como la velocidad de consumo de energía, o lo que es lo mismo la velocidad de conversión de energía química en calor y trabajo externo. Dicha energía se obtendría, de manera directa, midiendo la velocidad con la que el calor abandona el cuerpo de un animal y se expresaría en calorías o joules. Sin embargo, a menudo se utiliza el consumo de oxígeno como medida de la tasa metabólica ya que se trata de un método indirecto de medición que representa un indicador fiable y fácilmente mensurable de su índice de medida. El consumo de oxígeno mide la velocidad de intercambio gaseoso entre el aparato respiratorio del animal y el medio externo. De esta forma, es posible expresar la tasa metabólica como cantidad de oxígeno consumido por unidad de masa.

Cabe destacar que la tasa metabólica de un animal viene influenciada principalmente por tres factores: la intensidad de su actividad física, la temperatura ambiental (a mayores temperaturas, las tasas metabólicas serán más elevadas) y la masa corporal (Parry, 1983).

Además, existen otros factores que también pueden tener efectos sobre dicha tasa como por son la ingestión de alimentos, la edad, el sexo, la hora del día, el estado reproductivo, el estrés y la salinidad.

La relación entre la tasa metabólica y el tamaño corporal resulta de gran interés dentro del ámbito de la fisiología puesto que presentan una relación alométrica entre sí, lo cual ocurre debido a que el metabolismo no aumenta en la misma medida en que lo hace el peso, obteniéndose una curva potencial regida por la ecuación:  $Y = a \cdot W^b$ , donde Y representa la tasa fisiológica, a sería la constante de proporcionalidad, W representa el peso y b representa la potencia que da cuenta de la dependencia de la tasa fisiológica con el peso (Randall et al., 2002).

Algunos estudios han concluido que *P. marmoratus* es un crustáceo costero eurihalino (Toullec et al., 2006); es decir, que es capaz de vivir en un amplio rango de concentraciones salinas sin que se produzcan grandes variaciones en la concentración osmótica de su hemolinfa, lo cual implica que se trata de un organismo regulador. Las branquias de este crustáceo participan activamente en los procesos osmorregulatorios (Spanings-Pierrot et al., 2000) y de esta manera hace frente a los problemas que puedan producirse por los cambios de salinidad. En los organismos reguladores, los mecanismos empleados suponen un gasto de energía.

En este estudio se analizan los costes energéticos que supone la osmorregulación en el crustáceo *Pachygrapsus marmoratus* cuando es sometido a diferentes condiciones de salinidad. Para ello, será necesaria la determinación de las tasas metabólicas a partir del consumo de oxígeno. Asimismo, se realiza también un estudio alométrico a fin de observar la influencia del peso sobre la tasa metabólica de estos animales. La hipótesis que se sostiene es que la respuesta aguda que se produce cuando los animales son cambiados de condición sea más acusada que la que se logra pasados 7 o 14 días (respuesta aclimatada). Esta respuesta, por supuesto, traducida en tasas de consumo de oxígeno. En cuanto al estudio de la alometría, se espera que los organismos de mayor tamaño consuman una mayor cantidad de oxígeno que los pequeños. En definitiva, se esperan cambios significativos en las tasas de consumo de oxígeno que vengan impuestos por todas las variables que se miden: salinidad, masa corporal y tiempo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ejemplares utilizados

Se decide realizar un estudio para evaluar cómo responde el metabolismo de los crustáceos a los cambios de salinidad, y de esta manera y sabiendo que se trata de organismos reguladores, analizar el coste que les supone la osmorregulación. Para poder realizar correctamente este estudio es necesario un número relativamente elevado de ejemplares por lo que se realiza un muestreo en el que se recogen 30 individuos de *P. marmoratus* de tamaño similar, de unos 4 gramos de peso de media. Dicha medida se obtiene pesando a los animales en vivo, sin secarlos previamente.

Estos ejemplares fueron recogidos en la reserva de la biosfera de Urdaibai, en una escollera de puerto cercana a la playa de Laida (Ibarrangelu, Vizcaya), tal y como se aprecia en la figura 1. El muestreo fue realizado el día 23 de Febrero del 2014 (domingo) y el agua del mar se encontraba a 15°C de temperatura.

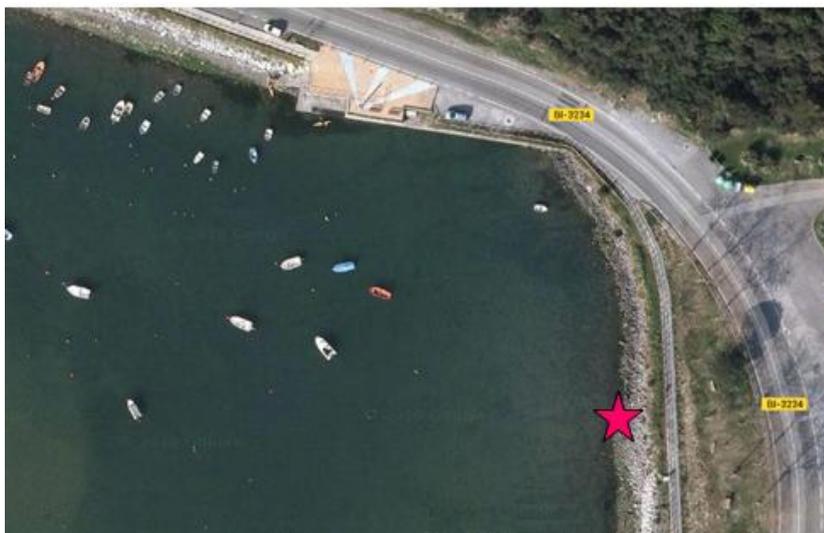


Figura 1. Fotografía del área de muestreo (satélite) donde se recogieron los ejemplares de *Pachygrapsus marmoratus*. Se muestra la escollera de puerto en las proximidades de la playa de Laida (Ibarrangelu, Vizcaya), dentro de la reserva de la biosfera de Urdaibai.

Posteriormente, se decide realizar un nuevo estudio en el que se pongan de manifiesto las relaciones alométricas entre los parámetros del peso y del metabolismo de dichos crustáceos, por lo que es necesario realizar un nuevo muestreo. En esta ocasión, se aumenta el número de ejemplares recogidos a 39 y no todos son de talla similar sino que se intenta abarcar todo el

rango posible de tamaños desde ejemplares que pesan alrededor de 1 gramo hasta ejemplares que pesan hasta 19 o incluso 27 gramos.

Dicho muestreo se realiza el día 02 de Marzo del 2014 (domingo) en la misma área mencionada anteriormente. En este caso, la temperatura del agua también era de 15°C.

Además, se requieren otros 10 ejemplares para volver a repetir uno de los estudios ya que fallecen algunos de los anteriores y el número de individuos para ese experimento podría no resultar significativo. Por esta razón, se vuelve a muestrear nuevamente en las mismas condiciones y en la misma zona para recoger únicamente 10 ejemplares que presenten aproximadamente la misma talla; es decir, que tengan características similares entre sí. Este último muestreo se realiza el día 05 de Marzo del 2014 (miércoles).

### 3.2. Mantenimiento

Al ser recogidos los individuos de *P. marmoratus* eran introducidos en un cubo con agua de mar y mantenidos a temperatura ambiente hasta que se transportaban al laboratorio.

Una vez allí se mantenían en tanques con agua de mar a temperatura ambiente, que frecuentaba los 17-18°C, y aireación constante proporcionada gracias a oxigenadores que llevaban sujetas varias piedras difusoras de aire. De este modo, el agua estaba perfectamente oxigenada asegurando la supervivencia de los crustáceos. Esto puede apreciarse en la figura 2.



Figura 2. Tanque en el que eran mantenidos los ejemplares de *P. marmoratus*. Nótese la utilización de oxigenadores.

Los individuos de *P. marmoratus* eran separados en tres grupos, de tal modo que un grupo era mantenido en un tanque que contenía agua de mar al 100% (con una salinidad del 35‰), otro grupo era mantenido en otro tanque que contenía agua de mar diluida al 75% (y por tanto una salinidad del 26.25‰) y un último grupo era mantenido en un tanque que contenía agua de mar diluida al 50% (o lo que es lo mismo, una salinidad del 17.5‰). Cabe destacar que el agua de los tanques era recambiada diariamente de forma que pudiera mantenerse siempre lo más limpia posible.



En cuanto al régimen de alimentación, tal y como se ha comentado anteriormente los ejemplares de *Pachygrapsus marmoratus* llevan a cabo una dieta omnívora, alimentándose preferentemente de mejillones y lapas. Es por ello, que eran alimentados diariamente con mejillones (*Mytilus chilensis*).

### 3.3. Procedimiento experimental

En su condición de osmorreguladores eurihalinos, los crustáceos decápodos *Pachygrapsus marmoratus* son capaces de mantener constante su medio interno en un amplio rango de salinidades. Estos animales toleran la dilución del agua del mar hasta cierto grado con una modificación mínima de la concentración osmótica de su hemolinfa (Fanjul, 2008).

Para poder observar dicho supuesto, se decide realizar un experimento en el que se mantengan 10 ejemplares en condiciones de agua de mar al 100%, otros 10 en agua de mar diluida un 25% (o lo que es lo mismo, agua de mar al 75%) y otros 10 en agua de mar diluida un 50%; es decir, agua de mar al 50%. Todos ellos se mantendrían en dichas condiciones durante un periodo de 15 días.

De esta manera, sería posible estudiar las tasas metabólicas en función del tiempo puesto que se realizan un total de tres mediciones por cada grupo: la primera medición tendría lugar un día después del cambio de condición (lo que se correspondería con la respuesta aguda); posteriormente, pasados 7 días, se realizaría una segunda medición y pasados otros 7 días la que supondría la tercera medición. Así, resulta posible obtener la respuesta aguda y la respuesta crónica o a largo plazo del periodo de aclimatación a la nueva condición que seguirían los ejemplares de crustáceo.

Además de todo esto, se decide realizar un segundo estudio en el que se tenga en cuenta la relación alométrica entre el metabolismo y el peso para poder ver verdaderamente en qué medida influye la talla de los crustáceos sobre la tasa metabólica. Para realizar este experimento, se lleva a cabo exactamente el mismo procedimiento que se acaba de explicar, pero en este caso no se utilizan 10 ejemplares por cada condición sino que se aumenta un poco más el número de individuos, utilizando 13 para cada concentración salina y abarcando todo el rango de tamaños posibles.



### 3.4. Determinaciones fisiológicas

#### i. Determinación de la tasa metabólica

Debido a que son las tasas metabólicas las que van a dar cuenta del coste energético que supone la osmorregulación, éstas se miden de manera indirecta; es decir, mediante las tasas de consumo de oxígeno ( $VO_2$ ; en  $mlO_2 \cdot h^{-1}$ ).

La técnica empleada para este fin recibe el nombre de respirometría en cámara cerrada y consiste en la introducción de cada ejemplar de crustáceo en una cámara o respirómetro con una capacidad de 300ml de volumen, repleta de agua bien oxigenada. Estos respirómetros se encuentran sellados de manera que no tengan contacto directo con el exterior. Para su sellado se emplea un tapón perforado por el que se introduce una sonda LDO de HACH (LANGE) que se conecta a un oxímetro en su extremo (Medidor HQ40d multi-electrodo de oxígeno STD HACH (LANGE)). Dicho oxímetro es quien realiza las lecturas del oxígeno que queda en los respirómetros en unidades de mg/L. Además, los respirómetros sellados son sumergidos completamente en un tanque o baño con agua a temperatura ambiente (17-18°C).

Las medidas son recogidas en intervalos de 5 minutos y cada respirometría consta de 8 medidas, además de la que se realiza a tiempo 0, por lo que la duración de cada una de ellas es de 40 minutos. Cabe destacar que en cada respirometría que se realiza ha de haber un respirómetro control en el que no hay ningún animal introducido y que sirve para la comprobación de la concentración de oxígeno en el agua. En caso de cambios bruscos en este respirómetro control, sería posible añadir las pertinentes correcciones a las demás medidas de consumo de oxígeno.

#### ii. Concentración osmótica de la hemolinfa

A fin de comprobar la concentración osmótica de la hemolinfa de *P. marmoratus*, se decide utilizar un osmómetro de descenso crioscópico. El descenso crioscópico es una propiedad coligativa que depende de la concentración total de las partículas en solución, por lo que permite determinar la osmolaridad de las mismas.

Este aparato ejerce sobre la muestra una temperatura más fría que la temperatura de congelación, por lo que la muestra es superenfriada. La lectura e interpretación de los resultados ocurren cuando la temperatura crioscópica se alcanza y



permanece estable. Las ventajas de este tipo de osmómetro radican en la necesidad de volúmenes de muestra muy pequeños (de tan solo 100µl) además de que son aparatos de fácil mantenimiento y calibrado.

La técnica consiste en la extracción de 100µl de hemolinfa del último pereiópodo de los crustáceos mediante una aguja de insulina (muy estrecha). Esta muestra recogida sería llevada al osmómetro para medir su concentración osmótica.

Sin embargo, y a pesar de que el volumen de extracción requerido es mínimo, el pequeño tamaño de los ejemplares de crustáceo hace que sea imposible la sustracción de 100µl de hemolinfa, por lo que se decide no llevar a cabo la lectura de la concentración osmótica de la hemolinfa.

### iii. Contenido hídrico de los tejidos

Por último, y no por ello menos importante, se mide el contenido hídrico de los tejidos. Para tal fin, una vez medidas todas las tasas de consumo de oxígeno, los ejemplares de *P. marmoratus* son congelados hasta su muerte. Se elige la técnica de la congelación puesto que ésta no les causa ningún tipo de dolor y además, no provoca variaciones en sus órganos, sino que simplemente su metabolismo se ralentiza a causa del frío hasta que no son capaces de soportar dichas condiciones y mueren.

Una vez muertos, son pesados en una balanza digital de alta precisión para obtener la medida del peso fresco (PF). Posteriormente, se introduce cada uno en una pequeña bandeja de papel de aluminio, previamente pesada también, y se llevan a la estufa, donde permanecen un total de 2 días a 80°C tal y como se muestra en la figura 3. De esta manera, se elimina todo el agua que pueda quedar en sus tejidos.



Figura 3. Ejemplares de *P. marmoratus* transcurridas 48 horas en una estufa.

Transcurrido ese tiempo, se pesan nuevamente en la balanza mencionada anteriormente obteniendo así la medida del peso seco (PS). Mediante la diferencia entre el peso fresco y el peso seco se determina el contenido hídrico de los tejidos de los animales. Y es que, sabiendo que estos crustáceos son osmorreguladores, deberían



controlar la entrada o salida de agua de su organismo, manteniéndola relativamente constante.

Ya que la obtención de este resultado es de especial interés puesto que es determinante para saber si los crustáceos son o no reguladores, se decide realizar este mismo proceso con dos ejemplares que habían muerto previamente durante el experimento por no soportar la dilución a la que estaban sometidos.

### 3.5. Tratamiento de datos

Si se quiere calcular las tasas de consumo de oxígeno a partir de los datos que proporcionan los oxímetros, es necesario el empleo de la fórmula:  $VO_2 = \frac{(b-b') \cdot vol \cdot 0,7 \cdot 60}{1000}$ . En esta fórmula, que proviene a partir de  $VO_2 = ([O_2]_1 \cdot vol_1 / t) - ([O_2]_2 \cdot vol_2 / t)$ , o lo que es lo mismo  $VO_2 = ([O_2]_1 - [O_2]_2) \cdot vol / t$ , la diferencia entre las dos concentraciones de oxígeno medidas (la medida que se realiza y el control) simbolizan la pendiente de la recta, que en el caso de la ecuación empleada se ve sustituida por  $(b-b')$ . El *vol* sería el volumen del respirómetro menos el volumen de agua desplazado por el cuerpo del animal asumiendo que 1 gramo de masa equivale a 1ml de volumen. *0,7* es la relación volumen/masa, es decir, el volumen de oxígeno que hay en 1mg de masa cuando se dan condiciones estándar, o lo que es lo mismo, a una presión de 1atm y a una temperatura de 273K de tal forma que 22.4ml/32g= 0.7ml/mg. Y por último, *60* sería la conversión del factor tiempo de minutos a horas.

Por otro lado, en cuanto al contenido hídrico de los tejidos se refiere, se calculan los porcentajes hídricos para lo que se determina la diferencia entre el peso fresco y el peso seco respecto del peso fresco según la fórmula:  $H\% = \frac{PF-PS}{PF} \cdot 100$ , donde PF sería el peso fresco expresado en gramos y el PS sería el peso seco expresado en gramos también. Además, se calcula la media total de contenido hídrico de cada condición (100% agua de mar, 75% agua de mar y 50% agua de mar) junto con el error típico, para poder compararlas entre sí.

### 3.6. Procedimientos estadísticos

Una vez obtenidas las tasas de consumo de oxígeno tanto de la respuesta aguda como la de los 7 y los 14 días, se procede al análisis estadístico de los datos. La relación entre el consumo de oxígeno y el peso se expresa de acuerdo a un modelo potencial en el que  $Y = a \cdot W^b$ , por lo que a fin de simplificar el análisis los datos se transforman logarítmicamente ya que de esta manera el modelo potencial se convierte en un modelo lineal.



Sin embargo, no solamente es necesario el establecimiento de una relación entre el logaritmo del peso y del metabolismo, sino que existen otras variables tales como la salinidad y el tiempo que también juegan un importante papel sobre las tasas de consumo de oxígeno. Para estudiar estas relaciones entre el metabolismo y cada una de las demás variables y determinar si son o no significativas, se realizan ajustes a modelos lineales múltiples. Asimismo, se establece un ajuste por mínimos cuadrados, técnica de optimización matemática que determina los valores de los parámetros  $a$  y  $b$  de la ecuación lineal, en la cual hay más de una variable, que mejor se ajusta a los datos experimentales (Ross, 2005).

Las variables que se estudian en relación con el metabolismo (variable dependiente) son la salinidad ( $S$ ), el tiempo ( $T$ ) y la masa corporal ( $W$ ), además de todas las posibles interacciones entre ellas. También se transforma logarítmicamente la variable tiempo, de la misma manera que se hizo con la tasa de consumo de oxígeno y con el peso, ya que se comprueba que el ajuste ( $R^2$ ) a los datos experimentales presenta una mejoría con respecto a la variable sin la transformación logarítmica.

Por otro lado, cabe destacar que las variables peso, tiempo y tasas de consumo de oxígeno son variables cuantitativas mientras que la variable salinidad se toma a modo de variable cualitativa de tal forma que tomará valor 0 en los casos de 100% agua de mar y valor 1 en los de 75% agua de mar. No se considera la condición del 50% agua de mar puesto que todos los animales sometidos a dicha condición fallecieron a excepción de un único ejemplar. Es por ello, que se decide excluir este dato del análisis.

Dado que se trata de una regresión múltiple, se parte de la siguiente ecuación, que incluye las tres variables independientes y las interacciones entre ellas:  $\log R = a + b_1 \cdot \log W + b_2 \cdot S + b_3 \cdot \log T + b_4 \cdot (\log W \cdot S) + b_5 \cdot (\log W \cdot \log T) + b_6 \cdot (\log T \cdot S)$ . A partir de aquí se retiran una a una las variables que no sean significativas; es decir, que no alcanzaban el nivel de significación estadística requerido ( $p < 0.05$ ). Todo este análisis se lleva a cabo mediante el programa de ordenador IBM SPSS Statistics 19.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Registro de muertes

A raíz de la repetición de un estudio completo debido a la repentina reducción del número de individuos de *P. marmoratus*, se comienza a tomar parte del número de muertes en función del tiempo. De esta manera queda un registro del porcentaje acumulado de ejemplares que mueren cada día que transcurre de la aclimatación tal y como se muestra en las figuras 4 y 5.

En la figura 4 se representan los porcentajes acumulados de las muertes pertenecientes a los decápodos que se encuentran sometidos a unas condiciones de 50% agua de mar. Es apreciable que durante los días 7 y 8 de aclimatación es cuando mayor número de muertes se producen: 8 y 13 animales consecutivamente. En total y como puede apreciarse en la figura 4, muere un 80% de la población que se encontraba en dichas condiciones salinas. En la figura 5 se representan de igual modo los porcentajes acumulados de las muertes pertenecientes a los decápodos sometidos a condiciones el 75% agua de mar. En este caso, se aprecia que los días de aclimatación 3, 10 y 14 son los que más muertes registran, presentando 2 muertes cada uno de los días señalados. Sin embargo, en este caso solo fallece el 30% de la población que se encontraban en dicha condición. Es por tanto evidente que la condición del 50% de agua de mar es la que mayor número de muertes registra, mientras que la condición de 100% de agua de mar no registra ninguna muerte.

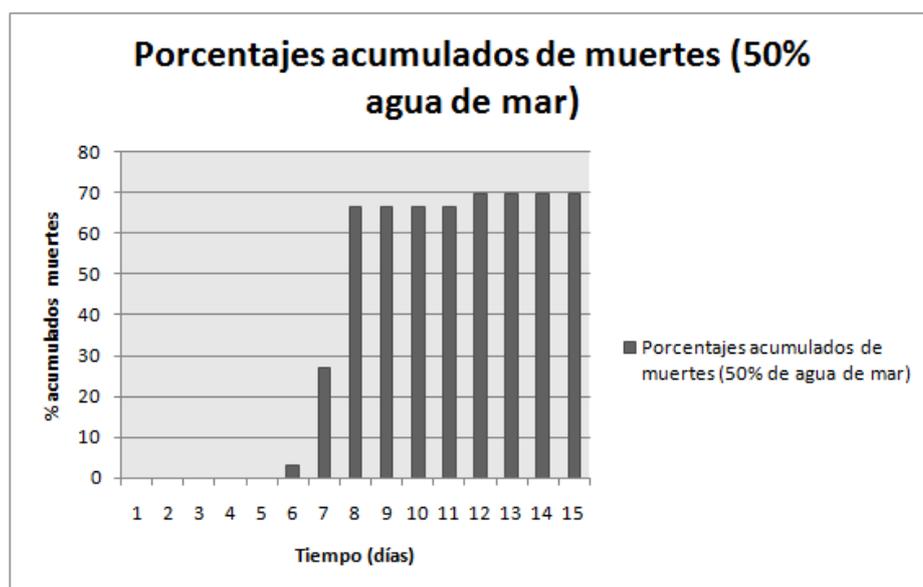


Figura 4. Representación gráfica del registro del porcentaje acumulado de individuos del crustáceo *Pachygrapsus marmoratus* que mueren en función de los días transcurridos cuando se encuentran sometidos a unas condiciones del 50% agua de mar.

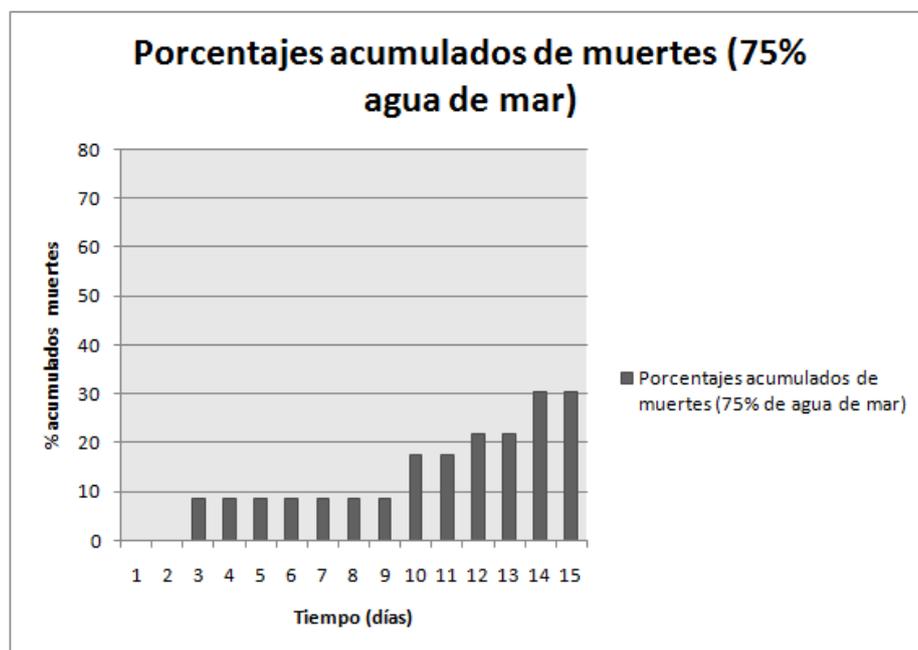


Figura 5. Representación gráfica del registro del porcentaje acumulado de individuos del crustáceo *Pachygrapsus marmoratus* que mueren en función de los días transcurridos cuando se encuentran sometidos a unas condiciones del 75% agua de mar.

#### 4.2. Contenido hídrico de los tejidos

A causa de la imposibilidad de medir la concentración osmótica de la hemolinfa, se decide estudiar el contenido hídrico de los tejidos para poder comprobar cuánta agua acumulan los animales en los tejidos blandos y así poder dilucidar si están llevando a cabo o no una osmorregulación. La figura 6 muestra dicho contenido hídrico de los tejidos para las condiciones de 100% y 75% agua de mar.

Dado que a la condición de 50% agua de mar únicamente sobrevive un ejemplar, no se va a utilizar el dato del contenido hídrico de sus tejidos (71.45%) ya que no se puede obtener resultados concluyentes a partir de un solo dato. Además, con el fin de contrastar los datos obtenidos con los de cangrejos que habían muerto previamente a causa de que no habían sido capaces de soportar las condiciones a las que estaban sometidos, se tomaron dos muestras de cangrejos muertos de la condición de 75% agua de mar y otros dos de la condición de 50% agua de mar. Del mismo modo, a pesar de obtener los valores de sus porcentajes hídricos, 69.96% y 68.19% de agua en los tejidos en el caso de los de la condición de 75%, y un 68.33% y 70.52% en el caso de la condición de 50% agua de mar, no es un número de muestra lo suficientemente

elevado como para obtener un resultado concluyente tampoco. Es por esto, que dichos datos no van a ser utilizados para el análisis.

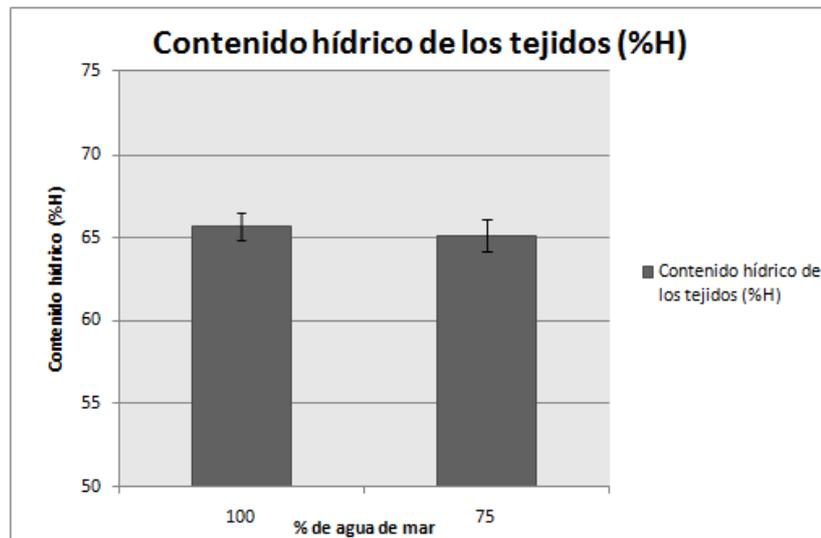


Figura 6. Representación gráfica del contenido hídrico de los tejidos de los decápodos *Pachygrapsus marmoratus* en función las condiciones de 100% agua de mar y 75% agua de mar. Asimismo se representan los errores típicos de cada condición.

Tal y como puede observarse en la figura 6, los porcentajes hídricos de los tejidos de las dos condiciones analizadas poseen un valor medio semejante: 65.71% en el caso de 100% agua de mar y 65.12% en el caso de la condición de 75% agua de mar. A efectos de comprobar si la diferencia entre los resultados resulta o no significativa se analizan los datos mediante una prueba t de student en la que se asumen varianzas iguales. Los resultados de este análisis se recogen en la tabla 1.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	65,71837762	65,12444144
Varianza	15,01010142	14,31338604
Observaciones	23	15
Varianza agrupada	14,73915655	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	36	
Estadístico t	0,466145193	
P(T<=t) una cola	0,321959961	
Valor crítico de t (una cola)	1,688297694	
P(T<=t) dos colas	0,643919923	
Valor crítico de t (dos colas)	2,028093987	

Tabla 1. Test de la t de student para dos variables (porcentajes hídricos de la condición 100% agua de mar y porcentajes hídricos de la condición 75% agua de mar) suponiendo varianzas iguales. En verde se representan los niveles de significación.



En la tabla 1 se pueden apreciar, además de los estadísticos descriptivos, los valores de significación (p). Puede, por ello, afirmarse que las diferencias entre ambos no son significativas puesto que  $p > 0.05$ .

### 4.3. Metabolismo

En cuanto al modelo de regresión múltiple con el que se trabaja y en el que el metabolismo queda sujeto a la influencia de diferentes variables, se ajustan los datos al modelo para poder obtener los valores de los parámetros  $a$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$ ,  $b_5$  y  $b_6$  (tabla 5). Se aplica un ajuste por mínimos cuadrados en el que únicamente se estudiarán las variables que resulten significativas. Los resultados que se obtienen quedan representados en las tablas 2, 3 y 4.

**Variables introducidas/eliminadas<sup>b</sup>**

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	logPxlogT, S, LogPeso, logTiempo	.	Introducir

a. Todas las variables solicitadas introducidas.  
b. Variable dependiente: LogMetabolismo

Tabla 2. Totalidad de las variables significativas que finalmente se obtienen tras el ajuste por mínimos.

**Resumen del modelo**

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,828 <sup>a</sup>	,686	,675	,2070833

a. Variables predictoras: (Constante), logPxlogT, S, LogPeso, logTiempo

Tabla 3. Cuadro resumen en el que se representa la bondad del ajuste para una población de  $n=122$  muestras y su error típico.

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coefficients no estandarizados		Coefficients tipificados	t	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-,700	,065		-10,839	,000	-,828	-,572
	LogPeso	,646	,090	,571	7,164	,000	,468	,825
	S	,086	,038	,118	2,276	,025	,011	,161
	logTiempo	-,250	,087	-,337	-2,886	,005	-,422	-,078
	logPxlogT	,445	,123	,487	3,604	,000	,201	,690

a. Variable dependiente: LogMetabolismo

Tabla 4. Cuadro resumen en el que se analizan las variables que influyen sobre el metabolismo y su significación estadística, así como los coeficientes asociados a cada una de las ellas.

En la tabla 2 únicamente se representan las variables que poseen significación estadística y que por tanto, van a ser analizadas gracias al modelo de regresión múltiple. Por su parte, la tabla 3 indica cuál es el ajuste  $R^2$  para el análisis que se realiza, tratándose de un volumen elevado de datos ( $n=122$ ). Cabe destacar que dicha  $R^2$  adquiere un valor de 0.686 para el modelo que se trata en este estudio.

Tal y como indica la tabla 4, el valor del parámetro  $a$  vendría dado por el valor -0.7. El estudio de la salinidad resulta claro, al contrario que lo que ocurre con el tiempo y el peso, los cuales son algo más complejos.

Cuando los animales son expuestos a la nueva condición en el laboratorio; es decir, el día 1 (lo que se traduce en que  $\log T = 0$ ), se obtiene la siguiente ecuación:  $\log R = -0.7 + 0.646 \cdot \log W + 0.086 \cdot S$ . Sin embargo, cuando los crustáceos pasan 7 días en el laboratorio, es decir, cuando el logaritmo del tiempo es 0.845, la ecuación del modelo queda como  $\log R = -0.911 + 1.022 \cdot \log W + 0.086 \cdot S$ . Cuando los crustáceos pasan otros 7 días en el laboratorio, es decir, 14 días en total, el  $\log T = 1.146$  y por tanto, la ecuación del modelo queda como  $\log R = -0.987 + 1.156 \cdot \log W + 0.086 \cdot S$ . Para calibrar dichas ecuaciones y poder deducir cómo afectan el peso y el tiempo al metabolismo, es necesaria la sustitución de diferentes valores de  $W$ , como por ejemplo 1g, 5g y 10g.

Estas sustituciones van a permitir ver el efecto que tiene el peso sobre el metabolismo tal y como se observa en las figuras 7 y 8, en las que se representa la tasa de consumo de oxígeno frente al peso para tres tiempos diferentes y cuando la salinidad adquiere el valor 0 (es decir, 100% agua de mar) y el valor 1 (lo que se correspondería con el 75% agua de mar).

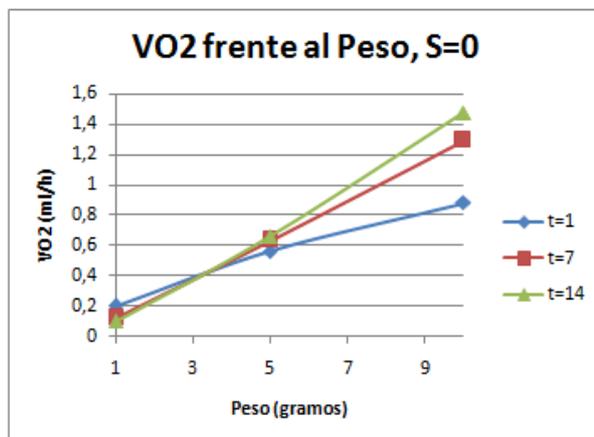


Figura 7. Representación gráfica de la variación de la tasa de consumo de oxígeno en función del peso para tres tiempos distintos (1 día, 7 días y 14 días) cuando la salinidad es 0 (100% agua de mar).

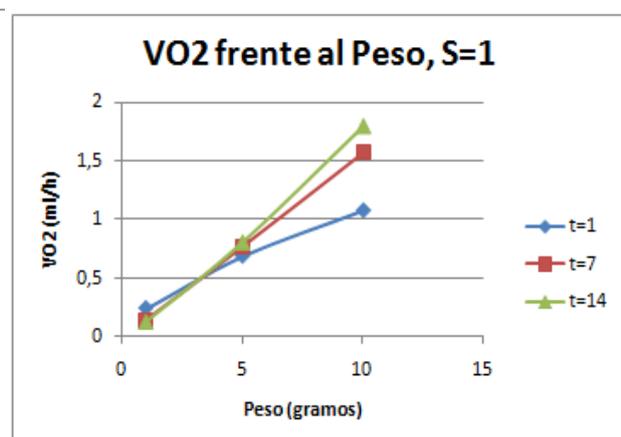


Figura 8. Representación gráfica de la variación de la tasa de consumo de oxígeno en función del peso para tres tiempos distintos (1 día, 7 días y 14 días) cuando la salinidad es 1 (75% agua de mar).

En estas figuras puede apreciarse que las tasas de consumo de oxígeno de los animales de mayor tamaño son más elevadas que las que presentan los pequeños. Además, a medida que transcurren más tiempo en el laboratorio el consumo de oxígeno aumenta en el caso de los animales de mayor tamaño, mientras que los de menor tamaño disminuyen su tasa de consumo de oxígeno. Puede observarse también que los valores de tasas de consumo de oxígeno registradas en los casos en que la salinidad es 1 para los animales que se encuentran en 75% agua de mar son más elevadas que las de los animales que se encuentran a 100% agua de mar; consumiendo un 22% más de oxígeno. Esto demuestra que a medida que disminuye la salinidad, aumenta el consumo de oxígeno.

De la misma forma, es posible observar con más detalle las variaciones de la tasa del consumo de oxígeno en función del tiempo, en el caso de organismos de 1g, 5g y 10g de peso, tal y como se muestra en las figuras 9 y 10.

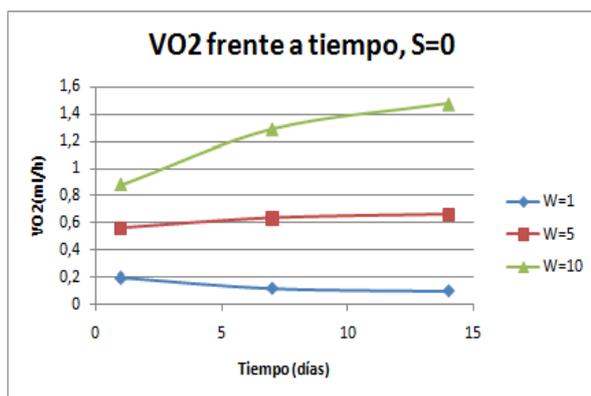


Figura 9. Representación gráfica de la variación de la tasa de consumo de oxígeno en función del tiempo para tres pesos diferentes (1g, 5g y 10g), cuando la salinidad es 0 (100% agua de mar).

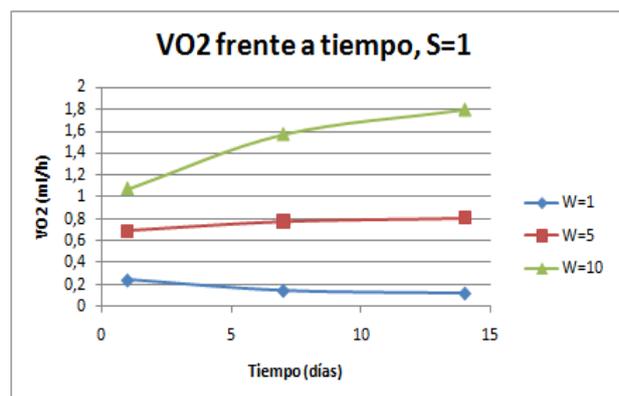


Figura 10. Representación gráfica de la variación de la tasa de consumo de oxígeno en función del tiempo para tres pesos diferentes (1g, 5g y 10g), cuando la salinidad es 1 (75% agua de mar).

En estas figuras, puede observarse cómo los ejemplares de pequeño tamaño disminuyen su consumo de oxígeno a medida que transcurren más tiempo en las condiciones a las que son expuestos mientras que los ejemplares de mayor tamaño (tanto los de 5g como los de 10g) siguen un patrón totalmente contrario; es decir, su tasa de consumo de oxígeno aumenta. Dichos aumentos y descensos se atenúan conforme pasa el tiempo, razón por la cual mejora el ajuste al transformar logarítmicamente la variable del tiempo. Nuevamente, puede observarse el efecto de la salinidad, haciendo que en todos los casos las tasas de consumo de oxígeno sean más elevadas a medida que se diluye el medio.

## 5. DISCUSIÓN

En el estudio realizado sobre el análisis del coste de la osmorregulación en los crustáceos *Pachygrapsus marmoratus*, es esencial considerar en qué medida las variables que se han analizado tienen influencia sobre el metabolismo de los organismos. Por ello, se considera de vital importancia el estudio alométrico que relaciona las variables de peso y metabolismo.

En primer lugar, se decide excluir del análisis a los ejemplares expuestos a condiciones de 50% agua de mar. Dado que resulta notorio el gran número de muertes que se producen en dicha condición, las muertes de los crustáceos fueron registradas en el tiempo, y podrían producirse por dos motivos diferentes: por la salinidad del medio al que estaban expuestos y por ataques que se producían entre ellos. Sería posible pensar que estos crustáceos no son capaces de soportar una salinidad tan baja ya que la mayoría de las muertes que se registran son pertenecientes a individuos de esta condición. El análisis realizado para determinar el contenido hídrico de los tejidos y de esta manera dilucidar si están regulando la entrada de agua a su organismo o no, no puede tomarse en cuenta ya que únicamente se cuenta con un ejemplar de esta condición, lo cual no resulta concluyente. En principio, podría tratarse de un porcentaje tan bajo de salinidad que estos animales no fueran capaces de soportarlo.

Sin embargo, hay que considerar que los crustáceos decápodos con los que se trata son animales semi-terrestres y no están habituados a vivir las 24 horas del día sumergidos. Esto implica que se encuentran sometidos a unas condiciones de estrés mucho más elevadas que los demás, puesto que permanecen en una continua sumersión y además, esta dilución de la salinidad es la condición más extrema que se trata en este estudio. Dicho estrés sumado al que puede propiciarse debido a la territorialidad o lucha por el alimento puede provocar ataques entre ellos, a pesar de que *Pachygrapsus marmoratus* no es considerada una especie especialmente agresiva. En estas luchas, los de mayor tamaño presentan una mayor agresividad, lo cual se demuestra en que los supervivientes encontrados son precisamente los de mayor tamaño, mientras que los más pequeños tienden a la huida (Hernández-Benitez, 2007).

En cuanto al resto de los ejemplares, que se encontraban expuestos a condiciones de agua de mar al 100% y al 75%, se consigue un total de datos elevado:  $n=122$ . Al realizar un ajuste al modelo para este conjunto de datos se consigue una  $R^2 = 0.686$ , tratándose de un ajuste que puede considerarse como muy favorable ya que se trabaja con un volumen de datos relativamente amplio. Tras realizar el ajuste por mínimos cuadrados y eliminar las variables no significativas, se obtiene que la influencia de algunas de las variables es mínima y puede que gran parte de esa influencia se deba al azar, por lo que se descartan.



Según el modelo de regresión lineal, el efecto de la salinidad es muy claro tal y como se esperaba. Se puede apreciar que cuando el medio en el que viven los animales está más diluido; es decir, cuando se pasa de la condición de 100% agua de mar al 75% y por tanto se produce un descenso de la salinidad, su efecto se ve claramente reflejado en las tasas de consumo de oxígeno. Y es que un descenso en la salinidad provoca un aumento en el consumo de oxígeno, ya que los cangrejos que se encuentran al 75% agua de mar consumen un 22% más de oxígeno que los que se encuentran en la condición de 100% agua de mar. Este hecho implica que la osmorregulación supone un coste energético.

Sin embargo, y dado que tanto los animales de la condición de 100% agua de mar como los de 75% agua de mar registran un aumento en su tasa de consumo de oxígeno, es bastante probable que parte de ese ascenso en su metabolismo se vea influenciado por el estrés que les supone a los animales la manipulación del laboratorio, como por ejemplo la sumersión continua a la que se encuentran sometidos, condiciones que no son las habituales en su vida cotidiana. Asimismo, también es probable que su metabolismo se vea algo aumentado a causa de la alimentación que llevan a cabo así como por una elevación de la temperatura (Guillooly et al., 2001), si bien el efecto de la temperatura podría elevar las tasas de consumo de oxígeno en un primer momento y después podrían mantenerse o descender. Y es que estos animales fueron recogidos del mar a una temperatura de 15°C y en el laboratorio se mantienen a 17-18°C (temperatura ambiente).

El efecto que tienen el peso y el tiempo sobre el metabolismo es algo más complejo, máxime cuando la estancia de los animales se prolonga en el laboratorio. En este caso, la variable logaritmo del peso, tal y como era de esperar, resulta significativa; es decir, posee influencia sobre el metabolismo de los ejemplares de *P. marmoratus*. Pero además, se obtiene que las variables logaritmo del tiempo así como la interacción entre el logaritmo del tiempo y del peso también resultan significativas.

El primer día que los animales son expuestos a la nueva condición, la relación alométrica que se obtiene es también la que se esperaba. Esto significa que a medida que el peso aumenta, ascenderá también la tasa metabólica de acuerdo con una relación potencial en la que  $Y = a \cdot W^b$ . Como se observa en los resultados, el exponente ( $b$ ) que se obtiene se encuentra entre los límites de 0.468 y 0.825 y su valor es de 0.646.

Aparentemente  $b$  se encuentra determinado por principios biológicos universales y su valor oscila entre 0.6 y 0.9, rondando normalmente entre valores de 0.65 y 0.75. Según los estudios realizados el valor del exponente en la relación alométrica entre la tasa metabólica y la



masa corporal es sumamente constante en los distintos grupos filogenéticos. Así pues, los valores estipulados para dicho exponente en la ecuación potencial resultan válidos para mamíferos, peces, crustáceos y la mayoría de las otras especies animales (Hill et al., 2004). En el caso de *Pachygrapsus marmoratus*, por lo tanto, se puede afirmar que posee un valor del exponente que relaciona el peso con el metabolismo que es típico en los marcos de la fisiología.

Al estudiar el primer día en el que los animales son cambiados de hábitat, es cierto que la tasa de consumo de oxígeno es más elevada cuando asciende el peso, pero sin olvidar que el metabolismo también se encuentra a merced de la salinidad del modo en que se ha explicado anteriormente y por ello, se alcanzan tasas de consumo de oxígeno mayores cuando desciende la salinidad.

Las complicaciones aparecen cuando los animales son mantenidos en el laboratorio durante más tiempo. Sin dejar de lado la variable de la salinidad, es notorio nuevamente el efecto del tamaño ya que los ejemplares más grandes registran tasas de consumo de oxígeno más elevadas que los de pequeño tamaño.

Sin embargo, al contrario de lo esperado, a medida que transcurre el tiempo en el laboratorio los cangrejos de pequeño tamaño descienden su tasa de consumo de oxígeno, mientras que los de mayor tamaño tienden a aumentarlas. Esto ocurre tanto para la condición de 100% agua de mar como para la condición de 75% agua de mar. Si solamente ocurriese para la condición de 75% de agua de mar, podría pensarse que sería la condición salina la que está influyendo en el comportamiento de estos individuos. Pero al darse también en la condición de 100% agua de mar, condición a la que están habituados a vivir ya que es su medio ambiente, este comportamiento podría achacarse a que a los cangrejos de mayor tamaño y a los de menor tamaño no les afecta de igual modo el mantenimiento en el laboratorio.

Todos los parámetros fisiológicos que tienen que ver con el metabolismo se relacionan por el tamaño, lo cual pone de manifiesto que la relación entre la tasa metabólica y el peso corporal posee implicaciones fisiológicas muy importantes. Los sistemas respiratorio y circulatorio son los responsables de ofertar oxígeno a los tejidos, por lo que cabe suponer que las características principales de la fisiología respiratoria y circulatoria también se relacionan de forma alométrica con el peso corporal. Y es que, sin ir más lejos, los animales de menor tamaño requieren una mayor cantidad de oxígeno por gramo de peso corporal y su metabolismo funciona de manera más rápida. Esto quiere decir que los animales más grandes consumen menos energía por unidad de masa que los animales pequeños con lo que, metabólicamente hablando, resultan más rentables ya que consiguen vivir con un coste energético bastante

inferior. A su vez, esta rentabilidad posee también importantes implicaciones ecológicas, y es que por esta razón, los ecosistemas estables tienden a tener animales de mayor tamaño.

En el presente caso experimental, los datos son contrarios a esta afirmación ya que no puede explicarse la diferencia en el comportamiento de los animales de pequeño tamaño. Quizá el estrés que supone la manipulación en el laboratorio afecte de manera diferente en su comportamiento. Los traslados de un tanque a otro para la limpieza de éstos, la introducción de los ejemplares en recipientes para la toma de peso, la sumersión continua, la lucha de territorialidad en áreas limitadas y la alimentación entre otros, podrían ser los factores principales que marquen la diferencia en el comportamiento de estos crustáceos, en cuanto a consumo de oxígeno se refiere.

Por último, comentar que el hecho de que los crustáceos se mueran cuando se exponen a condiciones de 50% agua de mar y que presenten una mayor tasa de consumo de oxígeno en condiciones de 75% agua de mar, en ambos casos cuando su estancia en dichas condiciones supera los 7 días, es indicativo de que son animales eurihalinos. Resulta evidente que la distribución que presentan dentro de su entorno natural se ve limitada a zonas de salinidad relativamente alta, lo que les resulta sencillo de lograr gracias a que habitan en zonas intermareales. En la zona intermareal, cuando baja la marea pueden evitar fácilmente las zonas que presentan baja concentración salina, si bien son capaces de tolerarlas siempre y cuando no se expongan a estas condiciones durante tiempos prolongados.

## **6. RESUMEN Y CONCLUSIONES**

1. El efecto de la salinidad resulta muy claro en todos los cangrejos ya que un descenso en la salinidad supone un aumento en las tasas de consumo de oxígeno. Dicho aumento es un 22% mayor en el caso de los ejemplares que son mantenidos al 75% agua de mar frente a los que son mantenidos en condiciones de 100% agua de mar. Esto implica que la osmorregulación les supone un coste energético.

2. Por encima de un cierto tamaño (unos 3 gramos de masa fresca) todos los cangrejos aumentan su metabolismo, inclusive los que se supone que están en sus condiciones naturales (condición de 100% agua de mar). Esto podría indicar que está habiendo otros factores, además de las variables que se estudian, que afecten a su metabolismo como podría ser el mantenimiento en el laboratorio.



3. Por causas que se desconocen, el comportamiento de los ejemplares de pequeño tamaño es diferente al comportamiento de los animales de mayor tamaño puesto que a medida que el tiempo transcurre, los mayores aumentan su consumo de oxígeno mientras que los pequeños lo disminuyen. Una posible hipótesis es que esta diferencia en su comportamiento se deba a que el estrés de la manipulación en el laboratorio les afecta en diferente medida a unos y a otros.

4. Es notorio el hecho de que los crustáceos presentan dificultades a la hora de regular cuando se encuentran más de una semana en condiciones de 75% agua de mar, lo cual se ve reflejado en el ascenso que presentan sus tasas de consumo de oxígeno (en el caso de los animales de mayor talla). Además, se pone de manifiesto la imposibilidad de regular cuando se encuentran en condiciones de mayor dilución, como es el caso de los de 50% agua de mar, los cuales presentan una elevada mortalidad.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar me gustaría dar las gracias al director de este trabajo de fin de grado, Juan Ignacio Pérez Iglesias por todo el tiempo empleado, su disponibilidad, paciencia y gran ayuda. Me he encontrado muy a gusto trabajando con él y aprendiendo mucho más sobre el campo de la fisiología animal. Muchísimas gracias.

En segundo lugar quisiera dar las gracias a Gorka García Cazorla, por ser mi guía en la reserva de Urdaibai y ayudarme a atrapar los cangrejos a la hora de muestrear. Gracias por tu compañía y tu gran disponibilidad.

Agradecer también la ayuda de Enrique Navarro por ayudarme a entender el manejo de algunas de las máquinas que eran esenciales para realizar ciertos análisis. Gracias por tu tiempo.

Por último, agradecer a la Universidad del País Vasco el hecho de tener un laboratorio en el que poder llevar a cabo el estudio, además de poner a mi disposición materiales para poder trabajar.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Cannicci, S., Paula, J., Vannini, M., 1999. *Activity pattern and spatial strategy in Pachygrapsus marmoratus (Decapoda: Grapsidae) from Mediterranean and Atlantic shores*. Marine biology 133 (3): 429-435.
- Cannicci, S., Gomei, M., Boddi, B., Vannini, M., 2002. *Feeding habits and natural diet of the intertidal crab Pachygrapsus marmoratus: opportunistic browser or selective feeder*. Estuarine Coastal and Shelf Science 54(6): 983-1001.
- Cannicci, S., Gomei, M., Dahdouh-Guebas, F., Rorandelli, R., Terlizzi, A., 2007. *Influence of seasonal food abundance and quality on the feeding habits of an opportunistic feeder, the intertidal crab Pachygrapsus marmoratus*. Marine Biology, 151(4): 1331-1342.
- Fabricius, J.C., 1787. *Mantissa Insectorum sistens eorum Species nuper detectas adiectis Characteribus Genericis, Differentiis Specificis, Emendationibus, Observationibus*. 1: 348.
- Fanjul, M.L., Hiriart, M., 2008. *Biología funcional de los animales I*, 2ª edición. Mexico D.F.
- Flores, A.A.V., Paula, J., 2001. *Intertidal distribution and species composition of brachyuran crabs at two rocky shores in Central Portugal*. Hydrobiology, 449 (1-3): 171-177.
- García Socias, L.L., Gracia, F., 1988. *Nuevas aportaciones a la fauna de Crustacea Decapoda de las Islas Baleares*. Boll. Soc. Hist. Nat. 32: 47-56.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. *Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate*. Science 293: 2248-2251.
- Hemmi, J.M. y J. Zeil. 2003 b. *Burrow surveillance in fiddler crabs. I. Description of behaviour*. The Journal of experimental biology 206:3935-3950.
- Hernández-Benítez, M.A., 2007. *Comportamiento agresivo de Pachygrapsus marmoratus (Crustacea, Decapoda) ante competidores simulados*. Anales universitarios de etología, 1: 32-36.
- Hill, R.H., Wyse, G.A., Anderson, M.; 2006. *Fisiología Animal*, edición médica panamericana. Madrid, España.
- Parry, G.D., 1983. *The influence of the cost of growth on ectotherm metabolism*. Journal of theoretical biology 101(3): 453-477.
- Randall, D., Burggren, W., French, K., 2002. *Eckert animal physiology*. 5th ed. Freeman and Co., New York.
- Richter, S., 2002. *The tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea*. Org. Divers. Evol., 2: 217-237.
- Ross, S.M., 2005. *Introductory Statistics*. 2nd edition. San Diego, USA.
- Spanings-Pierrot, C., Soyez, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., Charmatier, G., 2000. *Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab Pachygrapsus marmoratus*. General and Comparative Endocrinology 119 (3): 340-350
- Toullec, J.Y., Serrano, L., Lopez, Philippe., Soyez, D., Spanings-Pierrot, C., 2006. *The crustacean hyperglycemic hormones from an euryhaline crab Pachygrapsus marmoratus and a fresh water crab Potamon ibericum. Eyestalk and pericardial isoforms*. Peptides 27(6): 1269-1280.
- Vidal-Payá, I., 2011. *Preferencia de Pachygrapsus marmoratus (cangrejo de roca o huyón) sobre diferentes colores de sustrato*. Anales universitarios de etología, 5: 64-71.