

ECOLOGÍA Y FISIOLOGÍA ALIMENTARIA DEL CANGREJO  
*NEOHELICE GRANULATA*

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias (Área Biología)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de Mar del Plata

Mar del Plata, Argentina

Por

Juan Pablo Lancia

Dirección:

Dra. Claudia Bas

*A mi familia*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio*

*A Delfina y a nuestra princesita, Emilia*

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introducción general</b> .....	3
<i>Neohelice granulata</i> .....	4
<b>Formulación de los objetivos</b> .....	6
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
<b>Materiales y métodos generales</b>	
Áreas de estudio.....	9
Mantenimiento de animales en el laboratorio.....	10
Colecta y preparación del alimento.....	10
Alimentación en laboratorio.....	11
Figuras.....	12
<b>Sección A: Ecología alimentaria de <i>Neohelice granulata</i></b> .....	13
Contenido.....	13
Introducción general.....	13
<b>Capítulo 1:</b>	
<b>Influencia de la marea, fase de la luz, hábitat y estación en la alimentación del cangrejo intermareal <i>Neohelice granulata</i></b>	
Introducción.....	16
Materiales y métodos.....	17
Resultados.....	19
Discusión.....	24
Figuras.....	29

## Capítulo 2:

### Comportamiento de alimentación y capacidad de selección de partículas del sedimento

Introducción.....	35
Materiales y métodos.....	36
Resultados.....	39
Discusión.....	41
Figuras y Tablas.....	43

## Capítulo 3:

### Maduración gonadal

Introducción.....	45
Materiales y métodos.....	46
Resultados.....	49
Discusión.....	50
Figuras.....	53

### Sección B: Fisiología alimentaria de *Neohelice granulata*..... 56

El sistema digestivo.....	56
Región anterior.....	57
Región media.....	57
Región posterior.....	59
Enzimas digestivas	
Proteinasas.....	60
Celulasas.....	63
Amilasas.....	65

## Capítulo 4:

### Diferencias adaptativas en la actividad enzimática digestiva en el cangrejo *Neohelice granulata* en relación al sexo y al hábitat

Introducción.....	66
-------------------	----

Materiales y métodos.....	68
Resultados.....	74
Discusión.....	76
Figuras y Tablas.....	81
<b>Capítulo 5:</b>	
<b>Estimación de la capacidad de aprovechamiento de los diferentes componentes de la dieta de <i>Neohelice granulata</i></b>	
Introducción.....	92
Materiales y métodos.....	93
Resultados.....	96
Discusión.....	98
Figuras y Tablas.....	103
<b>Conclusiones globales sobre el sistema en estudio.....</b>	<b>108</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>113</b>

## Resumen

La obtención de energía a partir de una dieta basada en material vegetal posee como desventaja la baja calidad de la misma (alta relación C:N) y su baja digestibilidad (relativamente pocas especies son capaces de degradar las distintas formas de celulosa que forman las paredes celulares de las plantas). Varias especies de cangrejos terrestres son consideradas herbívoras dado que la mayor parte de su dieta consiste de plantas terrestres y sus detritos, sin embargo existen pocos estudios sobre la capacidad de estos organismos de digerir y asimilar la materia vegetal que consumen. *Neohelice granulata* es un cangrejo cavador semiterrestre que habita estuarios y marismas del Atlántico sudoccidental y es considerado herbívoro y detritívoro, alimentándose alternativamente de las gramíneas halófitas del género *Spartina* que cubren estos ambientes, o de sedimento enriquecido en materia orgánica, en las planicies de marea sin vegetación. El objetivo general de esta tesis fue conocer la ecofisiología alimentaria de *Neohelice granulata*. Los resultados indican que esta especie es capaz de degradar diversas formas de celulosa, pero además, este cangrejo presenta una variedad de características comportamentales y fisiológicas flexibles que responden a una serie de restricciones ambientales sobre la alimentación, y que conforman en conjunto una estrategia digestiva eficiente que le permite adaptarse con éxito a dichas restricciones. Estas características podrían resumirse como una actividad alimentaria plástica que incluye: la capacidad de variar la actividad enzimática en relación con el tipo de alimento disponible, capacidad de seleccionar parcialmente del sedimento que consume componentes ricos en proteína mejorando su calidad nutricional, y tiempos de retención del alimento variables, según la temperatura y el componente principal de la dieta. La flexibilidad observada contribuye a entender la capacidad de los cangrejos intermareales de lidiar con fuentes de alimentos discontinuos y variables con el fin de maximizar la obtención de energía para cumplir los diversos requisitos a lo largo de sus ciclos de vida. Además, ayuda a explicar el exitoso establecimiento y mantenimiento de densas poblaciones de esta especie en un tipo de hábitat no apto para la mayor parte de las especies intermareales, alcanzando una amplia distribución geográfica latitudinal.

## Abstract

Obtaining energy from a diet based on plant material has the disadvantage of a poor quality (high C:N) and low digestibility (relatively few species are able of degrade the different cellulose types that form the cell walls of plants). A number of species of land crabs are considered herbivorous since most part of their diet consist of terrestrial plants and its debris, but few studies focuses on the ability of these organisms to digest and assimilate the plant material they consume. *Neohelice granulata* is a semi-terrestrial burrowing crab that lives in estuaries and marshes of the Southwestern Atlantic coasts and is considered herbivore and detritivore, feeding alternately on the halophyte grasses of the genus *Spartina* covering these environments, and on organic matter rich sediment, in the bare tidal flats. The overall objective of this thesis was to study the feeding ecophysiology of *Neohelice granulata*. The results show that this species is able to degrade diverse forms of cellulose and, in addition, it possess a variety of flexible behavioral and physiological characteristics associated to a number of environmental restrictions on food, which conform an efficient feeding strategy that has allowed it to cope with such restrictions. These features may be summarized as a plastic feeding activity that includes: a variable enzymatic activity related to the available type of food, the ability of partially select from sediment protein rich items improving its nutritious quality, and food retention times varying in accordance with temperature and food type. The observed flexibility contributes to understand the ability of intertidal crabs to cope with discontinuous and variable food sources, maximizing energy obtaining to develop their entire life cycle. Furthermore, it contributes to explain the successful settlement and development of dense populations of this species in a type of habitat not suitable for most of intertidal species, reaching a wide latitudinal distribution.

## Introducción General

La ecología alimentaria de una especie se enfoca principalmente en definir su nivel trófico dentro de una comunidad y las consecuencias ecológicas de sus actividades de alimentación, así como de las limitaciones impuestas por la dieta sobre el éxito reproductivo. La fisiología alimentaria por su parte, se ocupa de definir la capacidad de un organismo de digerir determinadas dietas, la producción y actividad de diferentes enzimas, la capacidad de asimilación de los nutrientes, los efectos fisiológicos de los diferentes compuestos incorporados con la dieta y su capacidad de tolerarlos, procesarlos o modificarlos.

El enfoque ecofisiológico en el estudio de los organismos no es nuevo. Según Huey (1991), el interés principal en los primeros estudios en ecología en los inicios del siglo XX se centraba en el concepto de los factores limitantes, en el cual factores físicos (por ejemplo, temperatura, pH, salinidad) limitaban la presencia de los organismos en hábitats particulares. Claramente la fisiología era central para la ecología en esos tiempos por lo que no era sorprendente ver que las discusiones a menudo estaban enfocadas en las interacciones entre la fisiología y el ambiente físico. Sin embargo, a partir del primer cuarto de ese siglo y hasta la siguiente mitad del mismo, los estudios en ecología comenzaron a cambiar el foco de interés desde los análisis que tenían en cuenta que la fisiología mediaba las interacciones entre los organismos y su ambiente hacia los análisis de las interacciones entre individuos o entre especies, estudios sobre poblaciones y comunidades. En esta nueva etapa se consideraba que los animales tenían, usualmente, la capacidad de encontrar hábitats adecuados a sus características fisiológicas y por lo tanto, los ecólogos no deberían preocuparse tanto por los límites fisiológicos que los animales pueden soportar.

En años recientes, sin embargo, muchos ecólogos han visto la necesidad de reincorporar la fisiología dentro de la ecología. De hecho, poderosos modelos mecanicistas han clarificado cómo las fluctuaciones dinámicas en el ambiente físico, a través de complejas interacciones con la fisiología y la morfología, pueden dominar el comportamiento, historia de vida, demografía y las interacciones competitivas entre los organismos (ver citas en Huey, 1991).

Entender cómo los animales funcionan y responden a las condiciones ambientales naturales en todos los estadios de su ciclo de vida (Willmer et al., 2000), cómo las

interacciones de los organismos y el ambiente determinan las características que son relevantes a su ecología (p. ej. edad específica de fecundidad y senescencia, patrones de movimiento, forrajeo y otros), y cómo éstas características individuales afectan la dinámica interespecífica y poblacional (Kingsolver, 1989) son objetivos primordiales de este moderno enfoque de la ecofisiología.

Entre todos los procesos fisiológicos llevados a cabo por los organismos, aquellos que influyen en el uso de recursos son los más influyentes en el comportamiento animal, la dinámica poblacional de la especie, su rol en las comunidades bióticas y su contribución a los flujos ecosistémicos (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Los organismos toman materiales y recursos energéticos del ambiente, los convierten a otras formas dentro de sus cuerpos, los asignan a procesos que mejoran el *fitness*, la reproducción y el crecimiento y excretan formas alteradas de estos productos que vuelven al ambiente (Brown et al., 2004). La eficiencia con la que los organismos asimilan y procesan sus alimentos define su rol en una comunidad ecológica y determina el flujo (por ejemplo, cantidad por unidad de tiempo) y la composición de los materiales transferidos a otros niveles tróficos en un ecosistema (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Los ecotonos, como por ejemplo las marismas, son zonas de transición entre sistemas ecológicamente adyacentes que pueden intensificar o concentrar el flujo y procesamiento de materiales y organismos entre sistemas (Begon et al., 2006). Las marismas que se encuentran a lo largo de la línea de costa, son zonas relativamente estrechas que regulan los flujos de nutrientes, agua y organismos entre ecosistemas y también juegan un rol importante en almacenar y exportar nutrientes (ver citas en Traut, 2005). La comprensión del funcionamiento de estas zonas de transición entre los componentes del paisaje, puede ayudar a entender su rol e incrementar así un efectivo manejo de estos ambientes para su conservación (Traut, 2005).

### ***Neohelice granulata***

*Neohelice granulata* (Dana, 1851) (previamente conocido como *Chasmagnathus granulatus*, ver Sakai et al., 2006) es un cangrejo cavador semi-terrestre que habita la zona del intermareal medio y alto en las marismas de plantas halófitas del género *Spartina* (conocidos como espartillares) en estuarios, lagunas y costas marinas del Atlántico sudoccidental, entre Río de Janeiro (Brasil) y el Golfo Nuevo (Argentina), a menudo

relacionado con condiciones de salinidad fluctuantes. Esta especie ha recibido especial atención en estudios ecológicos, fisiológicos y bioquímicos (Spivak, 2010). La actividad cavadora y la subsecuente remoción del sedimento por parte de *N. granulata* impacta enormemente sobre la química del sedimento; aumenta tanto el drenaje como la aireación del suelo (Fanjul et al., 2008); las cuevas atrapan materia orgánica pero también pesticidas órgano-clorados (Botto et al., 2006); incrementa la productividad de *S. densiflora* (Daleo y Iribarne, 2009); afecta la comunidad bentónica (por ejemplo, la actividad de los cangrejos *Cyrtograpsus angulatus* y *Uca uruguayensis*, la almeja navaja *Tagelus plebeius* y el poliqueto *Laeonereis acuta* entre otras especies de invertebrados (Palomo et al., 2004; Lomovasky et al., 2006; Martinetto et al., 2007); e influye en la distribución y abundancia de peces juveniles (Martinetto et al., 2005), el uso de hábitat y migración de aves costeras (Iribarne et al., 2005) e incluso el forrajeo de roedores (Canepuccia et al., 2008).

Los análisis provenientes de diversos estudios coinciden en considerar la alimentación de esta especie básicamente como herbívora y detritívora. Basados en sus contenidos estomacales se han detectado diferencias en la dieta entre microhábitats, con cangrejos de la marisma alimentándose de hojas de *Spartina densiflora*, cuando sus cuevas se encuentran entre las raíces de esta planta, y de sedimento, cuando sus cuevas están en la planicie de marea sin vegetación (Iribarne et al., 1997). Según D' Incao et al. (1990), el sedimento y las hojas de *Spartina sp* (tanto frescas como sus detritos), contribuyen con más del 70% de los alimentos ingeridos por *N. granulata*, siguiendo a continuación en importancia relativa anélidos y conespecíficos (aproximadamente 20%). Sin embargo, la única actividad alimentaria que ha sido reportada en condiciones naturales es un aumento de la tasa de herbivoría cuando la marea cubre las plantas en el espartillar (Alberti et al., 2007b).

El metabolismo es una compleja red de reacciones bioquímicas que son catalizadas por enzimas y que permite la regulación de las concentraciones de sustratos, productos y tasas de reacción. La tasa metabólica es la tasa biológica fundamental dado que es la tasa de consumo, transformación y asignación de energía. Mucha de la variación entre ecosistemas, incluyendo sus estructuras biológicas, composiciones químicas, flujos de energía y materiales, procesos poblacionales y diversidad de especies, dependen de las características metabólicas de los organismos presentes (Brown et al., 2004).

Por ser un habitante típico de la zona intermareal, *N. granulata* está expuesto a un gran número de factores físicos (por ejemplo: temperatura, humedad, salinidad y oxígeno disuelto en agua) y biológicos (por ejemplo: tipo de alimento o predadores) que varían en rangos muy estrechos de espacio y tiempo. Estas variaciones pueden afectar tanto la alimentación como el metabolismo en general (Oliveira et al., 2004). Los adultos de *N. granulata* se mueven especialmente cuando son cubiertos por el agua durante las mareas altas (Luppi et al., 2012), aunque también son activos durante la marea baja en el interior y alrededor de sus cuevas, y pueden tolerar largos períodos de emersión (Santos y Nery, 1987; Fathala et al., 2010). *Neohelice granulata* posee una fina regulación de la respuesta metabólica a las variaciones ambientales y es capaz de movilizar distintas sustancias de reserva como glicógeno y lípidos, desde diversos órganos en respuesta a períodos de ayuno naturales. Tales respuestas varían según la época del año y la composición de la dieta (Kucharski y Da Silva, 1991a; 1991b). Por su parte, Vinagre y Da Silva (2002) encontraron que esta especie es capaz de mantener la homeostasis metabólica después de períodos de ayuno tan largos como tres semanas, los cuales pueden ser naturales para éstos cangrejos.

Al mismo tiempo, en un estudio que relaciona el metabolismo de machos adultos de *N. granulata* con el ambiente que habitan, Pinoni et al. (2011) hallaron diferencias a nivel bioquímico en la actividad de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, enzimas proteolíticas totales y fosfatasa alcalina en hepatopáncreas; así como en la glucemia, concentración de glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas en hepatopáncreas, músculo de la quela y branquias anteriores y posteriores en individuos procedentes de áreas de marisma y planicie de mareas adyacentes, las cuales fueron atribuidas diferentes a estrategias digestivas y metabólicas desarrolladas para afrontar las variaciones del hábitat en condiciones naturales.

### **Formulación de los objetivos**

Hasta el momento, no existe información sobre el momento, el período y las condiciones (por ejemplo, fase de marea, luz) en las que *N. granulata* se alimenta, ni de las variaciones estacionales y/o poblacionales en su actividad alimentaria o dieta. Del mismo modo, se desconoce su capacidad de obtener y utilizar los alimentos que consume (capacidad de manipulación, producción y actividad de enzimas digestivas, asimilación de los diferentes componentes). En suma, se desconoce la mayor parte de los detalles que en

conjunto determinan la ecofisiología alimentaria de esta especie y por ende, su papel preciso en el flujo de energía dentro del ecosistema del que forma parte.

### Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es el de conocer la ecofisiología alimentaria de *Neohelice granulata*.

### Objetivos específicos

- Evaluar posibles variaciones en la dieta de *N. granulata* entre sexos, estaciones del año y entre distintas poblaciones.
- Conocer las variables ambientales asociadas con la actividad de alimentación de *N. granulata* en diferentes sitios.
- Explorar la existencia de comportamientos de alimentación que tiendan a mejorar la calidad de la dieta.
- Estudiar la madurez gonadal en hembras de *N. granulata* en relación al tipo de alimento que consumen.
- Determinar la actividad de enzimas celulolíticas y proteolíticas en hepatopáncreas de *N. granulata* alimentado con diferentes dietas.
- Medir el tiempo de retención y porcentaje de asimilación de los componentes principales de la dieta, así como su valor nutricional.

### Estructura de la tesis

En esta tesis doctoral se pretendió estudiar la alimentación del cangrejo *Neohelice granulata* desde un enfoque eco-fisiológico, abarcando tanto aspectos ecológicos (contenido estomacal, actividad de alimentación de los distintos sexos en relación con diferentes ambientes y estaciones del año, maduración gonadal en relación con la alimentación) como fisiológicos (como el análisis de la actividad de la batería de enzimas presentes en la glándula digestiva y el porcentaje de asimilación de los nutrientes ingeridos).

Para ello, se dividió la tesis en dos grandes secciones: una ecológica y otra fisiológica, para luego integrarlas intentando llegar a conclusiones globales sobre el sistema en estudio.

## Materiales y métodos generales

### Áreas de estudio:

El análisis de la variación estacional e interpoblacional de la alimentación de *N. granulata* se llevó a cabo en tres localidades, Mar Chiquita, Bahía Blanca y San Antonio Oeste, las cuales se describen más abajo. Los organismos colectados para los experimentos de laboratorio provinieron siempre de Mar Chiquita, con excepción del análisis del tiempo de retención (Capítulo 5), en el cual se utilizaron también individuos de San Antonio Oeste.

Mar Chiquita: (37° 45' S, 57° 19' O) es el sitio más septentrional. Esta laguna costera (46 km<sup>2</sup>) está conectada a través de un canal estrecho (alrededor de 5 km de largo) con el mar, y tiene un régimen semidiurno micromareal (0,3-1 m de amplitud, SHN, Servicio de Hidrografía Naval). La precipitación media es de 800 mm año<sup>-1</sup>. La influencia de las mareas depende de la dirección e intensidad del viento, la fase de marea y la salida de agua dulce. El intermareal superior es una marisma conformada por una mezcla de *Spartina densiflora* y *Sarcocornia perennis* (Isacch et al., 2006) y el intermareal medio y bajo son planicies de marea. Los sedimentos son finos con alto contenido de materia orgánica (en promedio 4%) y de penetrabilidad alta en comparación con los otros sitios (Spivak et al., 1994). En ambas áreas, las cuevas son bien estructuradas y profundas alcanzando la capa freática (Fanjul et al., 2008). Los cangrejos se muestrearon en la planicie de mareas y la marisma que ocupan la zona intermareal media y superior (Fig. 0. 1a).

Bahía Blanca (38° 45' S, 62° 15' O) se ubica en una latitud intermedia entre las otras dos poblaciones estudiadas, es un gran estuario (2300 km<sup>2</sup>, 1550 km<sup>2</sup> de planicies de marea de baja energía). Las precipitaciones son de 650 mm año<sup>-1</sup>. El régimen de mareas es semidiurno y mesomareal (máxima amplitud de 3,6 m, SHN). Los sedimentos son finos con alto contenido de materia orgánica (en promedio 3,6%) y de penetrabilidad alta (Albano, datos no publicados). La zona intermareal está caracterizada por una marisma alta de *S. perennis* (Isacch et al., 2006), una zona intermareal media dividida en una planicie de marea superior y una banda estrecha de *S. alterniflora* por debajo, y, por último, una planicie de marea desnuda inferior. Los cangrejos están presentes en las zonas intermareales media y alta. Las cuevas de la planicie de mareas son bien estructuradas y profundas (más de 1 m de profundidad) (Escapa et al., 2007) mientras que las de la

marisma son poco profundas, usualmente saturadas con agua y se desmoronan fácilmente (Luppi et al., 2012). Las muestras fueron tomadas de la planicie de mareas y la marisma de *S. alterniflora*, ambas del intermareal medio (Fig. 0. 1b).

San Antonio Oeste (40° 46' S, 64° 50' O), el sitio más meridional de los tres muestreados, es una bahía (80 km<sup>2</sup>), que se abre al golfo San Matías y se encuentra en una zona muy seca (precipitación media: 240 mm año<sup>-1</sup>) sin el aporte de cursos de agua dulce. Tiene un régimen de mareas semidiurno macromareal (hasta 9 m de amplitud, SHN) con amplias planicies intermareales de arena y piedras. La zona intermareal superior es una marisma de *Sarcocornia perennis* y la zona intermedia se divide en una marisma alta de *Spartina alterniflora* (Isacch et al., 2006), y una planicie de mareas que se continúa con el intermareal bajo. El contenido de materia orgánica (en promedio 1,35%) y la penetrabilidad del sedimento son muy bajos (Bas et al., 2005). Las cuevas son poco profundas y de estructura muy sencilla (Sal Moyano y Gavio, 2012). Los cangrejos ocupan la zona intermareal superior y media; las muestras se obtuvieron de la planicie de mareas y la marisma del intermareal medio (Fig. 0. 1c).

#### Mantenimiento de animales en el laboratorio:

Todos los individuos capturados para realizar experimentos en el laboratorio fueron organismos adultos, colectados a mano directamente de las cuevas que ocupaban en cada ambiente (marisma y planicie de marea), trasladados inmediatamente al laboratorio y colocados en acuarios de 50 l con agua de mar mezclada con agua de la canilla hasta una salinidad de 23 ‰, a 20 ° C con un ciclo de iluminación de 12:12 horas L:O.

#### Colecta y preparación del alimento:

En todos los experimentos de alimentación en los que se utilizó sedimento y/o hojas de *S. densiflora* se realizó el mismo procedimiento de colecta. El sedimento se obtuvo de la planicie de marea de Mar Chiquita, en las áreas adyacentes a las cuevas de los cangrejos, por el raspado de la capa superficial del suelo con una espátula, para obtener una lámina de espesor aproximado a 5 mm, la que contiene la mayor parte de las algas y los organismos del meso y macrobentos, inmediatamente luego de una alta marea, período en el cual se restablece ésta capa, y antes de que se produjera una excesiva desecación y/o

descomposición del material. Las hojas verdes de *S. densiflora* se cortaron con tijeras, de diferentes plantas de la marisma al azar. Toda la comida se almacenó en bolsas y se congeló (-20 ° C) para luego ser descongelada inmediatamente antes de los experimentos de alimentación.

#### Alimentación en laboratorio:

En base a diversos ensayos previos para lograr la alimentación de los cangrejos en el laboratorio, en los que se probaron diversos tamaños de acuarios, cobertura de agua y disposición del alimento, se logró un procedimiento efectivo que fue repetido para todos los experimentos en lo que fue necesario alimentar a los individuos.

Para alimentar a los cangrejos con sedimento los individuos se colocaron en grupos no mayores de 5, en acuarios (70 x 40 cm) sin agua, y el sedimento húmedo se ofreció en platos de plástico de 22 cm de diámetro y 2 cm de profundidad en el interior del acuario. Los cangrejos alimentados con hojas fueron puestos en grupos iguales en acuarios similares, pero cubiertos con agua de 23 ‰ de salinidad, y las hojas de *S. densiflora* se ofrecieron insertadas en un trozo de poliestireno unido a una piedra para anclarlo al fondo de modo que los individuos pudieran trepar fácilmente hasta las hojas para cortarlas.

Los cangrejos alimentados con pellets de alimento artificial (ver detalle en el capítulo 3) fueron colocados en acuarios acondicionados igual que para las plantas y el alimento fue colocado directamente en el agua donde se hidrataba y era comido con facilidad. Finalmente cuando se requirió alimentar a los individuos con sedimento + hojas de *S. densiflora*, las hojas se ofrecieron finamente cortadas, esparcidas sobre el plato de sedimento húmedo.

Figuras:

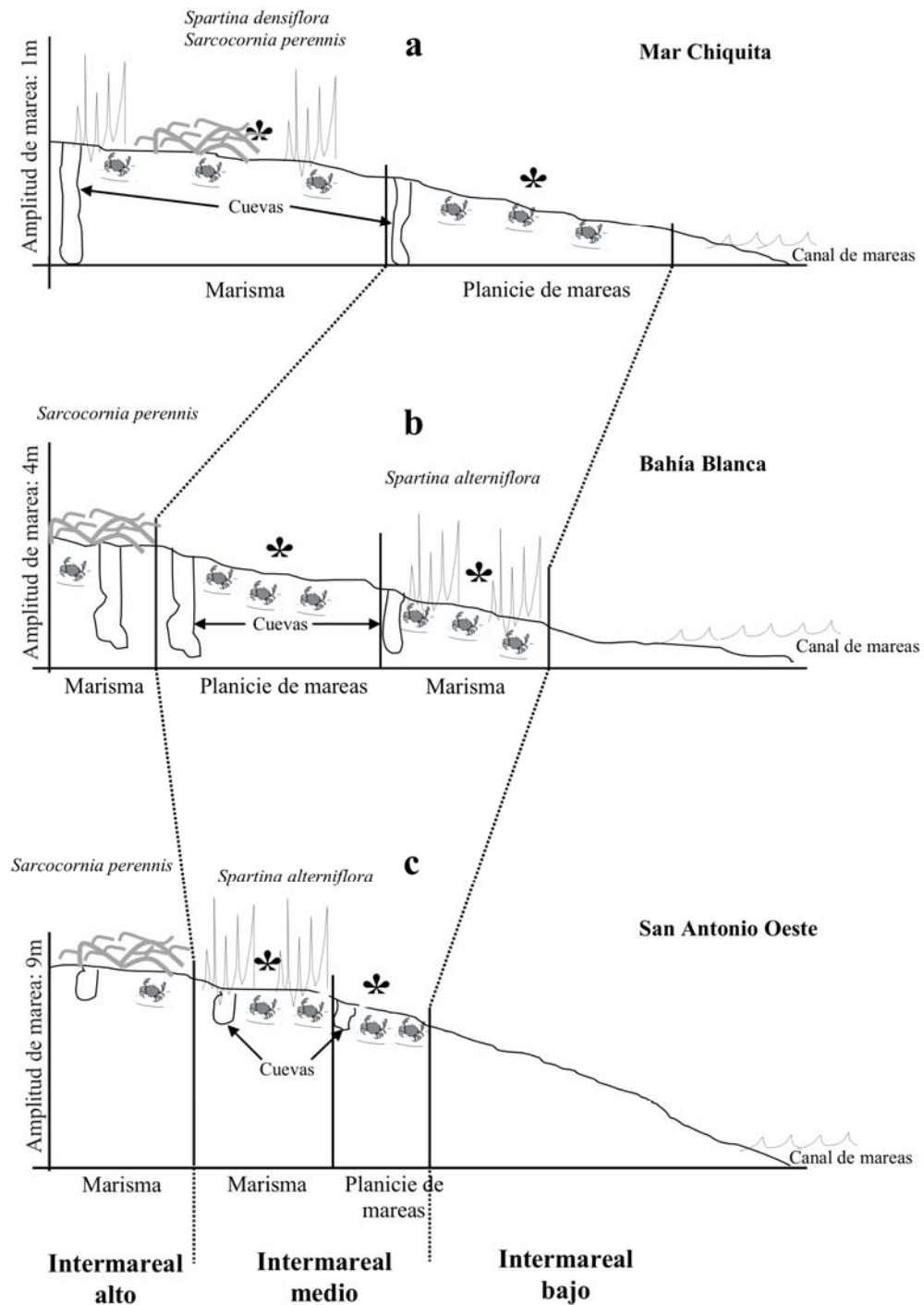


Fig. 0. 1. Representación esquemática de los tres sitios de muestreo. a) Mar Chiquita, b) Bahía Blanca, c) San Antonio Oeste, mostrando la posición relativa de las planicies de marea y marismas y la estructura de las cuevas. \*: áreas muestreadas de cada intermareal. Los dibujos no están a escala.

## **Sección A: Ecología alimentaria de *Neohelice granulata***

### Contenido:

La sección ecológica estará comprendida por el análisis del contenido estomacal en tres poblaciones diferentes de *Neohelice granulata* a lo largo de un año de muestreo, la observación del comportamiento alimentario a través del análisis de videos, determinación de la capacidad de selección del sedimento por parte del cangrejo y el estudio de la madurez gonadal de hembras en relación al tipo de alimento ingerido.

### Introducción general:

Ha sido claramente establecido que una parte importante de la alimentación de *N. granulata* está compuesta por plantas superiores (D' Incao et al., 1990; Iribarne et al., 1997). Se pudo comprobar a través del análisis de la marca de isótopos que ese material vegetal es la principal fuente de carbono incluso cuando esta especie se alimenta de sedimento (Botto et al., 2005).

Numerosas especies de cangrejos terrestres pueden ser consideradas principalmente herbívoras dado que la mayor parte de su dieta se compone de material vegetal y sus detritos (Kennish, 1996; Nordhaus et al., 2006). Las plantas son la fuente más abundante de alimento en casi cualquier sitio en la tierra. Sin embargo, la obtención de energía a partir de una dieta basada en material vegetal tiene desventajas, como la mala calidad (alta relación C: N), baja digestibilidad (paredes celulares de celulosa y hemicelulosa, difíciles de degradar, lo que ralentiza el proceso digestivo) y compuestos secundarios disuasivos de las plantas (tales como los taninos y toxinas) (Neilson et al., 1986; Wolcott y O'Connor, 1992; Linton y Greenaway, 2007). A pesar de esto, existen beneficios asociados a la herbivoría que incluyen la gran masa y predecible disponibilidad de las plantas en comparación con una presa animal, y el reducido riesgo de predación que los cangrejos pueden experimentar mientras forrajean en hábitats vegetados (Wolcott y O'Connor, 1992).

La celulosa es un polímero de unidades de azúcar (generalmente glucosa) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 formando microfibrillas altamente cristalizadas dentro de una matriz amorfa (compuesta principalmente de hemicelulosa y lignina), conformando el compuesto más abundante en las paredes celulares de las plantas (Watanabe y Tokuda, 2010). Dada la dificultad que presenta la celulosa de ser degradada, los herbívoros desarrollan diferentes

características anatómicas y/o comportamentales para superarla (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Tres estrategias digestivas básicas pueden ser descritas en el uso de las plantas como fuente de alimento en herbívoros en general y en decápodos terrestres en particular. La primera consiste en una baja ingesta de alimentos y un pasaje rápido a través del tracto intestinal, asimilando sólo los componentes de fácil digestión como el almidón y azúcares; eso ocurre en el gecarcinido *Cardisoma hirtipes* (Mattson, 1980; Greenaway y Raghaven, 1998). En segundo lugar, tiempos de retención de alimentos en el tracto digestivo lo suficientemente largos como para permitir la fermentación microbiana que degrade la fibra y aumente el contenido de N, como ocurre en el gecarcinido *Gecarcoidea natalis* (Greenaway y Raghaven, 1998), en asociación con modificaciones anatómicas de aparato digestivo. Finalmente, la digestión parcial o total de la celulosa por la secreción de enzimas endógenas se ha demostrado en algunos crustáceos como el isópodo *Porcellio scaber* (Kostanjsek et al., 2010), los cangrejos terrestres *G. natalis* y *Discoplax hirtipes* (Linton y Greenaway, 2004) o la langosta de río de quelas rojas (*Cherax quadricarinatus*) (Xue et al., 1999).

Un comportamiento probablemente asociado a este tipo de alimentación se ha visto en algunos cangrejos terrestres, y consiste en el almacenaje de hojas dentro de las cuevas antes de ser consumidas. Si bien se había sugerido que eso permitiría una pre degradación por parte de los microorganismos del barro, esa hipótesis no fue corroborada; en cambio, se propuso que esta actividad es una adaptación a las restricciones temporales y espaciales de comida (Nordhaus et al., 2006) o es sólo una consecuencia de que la cantidad de hojas caídas en descomposición, excede la capacidad de la comunidad degradadora del suelo (Skov y Hartnoll, 2002).

Otras adaptaciones a este tipo de ingesta incluyen la complementación con el consumo preferencial de partes de las plantas de mejor calidad, como frutos y semillas, (Linton y Greenaway, 2007), carnivoría ocasional (predación y canibalismo) para incrementar el N disponible (Mattson, 1980).

En general, la dieta herbívora está asociada con un conjunto de características morfológicas y fisiológicas como grandes tamaños corporales, bajas tasas de crecimiento (y por lo tanto longevidad), y una baja tasa metabólica para minimizar los requerimientos

energéticos y de N. La existencia de este tipo de adaptaciones en cangrejos herbívoros ha sido poco estudiada.

## Capítulo 1:

### **Influencia de la marea, fase de la luz, hábitat y estación en la alimentación del cangrejo intermareal *Neohelice granulata***

#### **Introducción**

La actividad alimentaria de un organismo está relacionada con las estructuras y habilidades que le permitan obtener, manipular e ingerir alimentos, pero también con el uso de hábitat, su ecología y su fisiología. La alimentación, como muchas otras actividades de los crustáceos intermareales, varía con los ciclos de mareas, hora del día y/o estación del año (sobre todo en las zonas templadas); como consecuencia de una compleja combinación de factores que varían rítmicamente. Sin embargo, la actividad alimentaria no está tan ampliamente estudiada en condiciones naturales como otros comportamientos que tienen algún tipo de patrón cíclico (como la locomoción o la reproducción). De hecho, se ha observado que la alimentación puede no estar acorde con otros pulsos de actividad más conspicuos (Aguzzi et al., 2004). Además, los cangrejos intermareales estuariales que se alimentan en diferentes partes de un estuario, podrían enfrentarse no sólo a patrones de mareas distintos, sino también a presiones de depredación y recursos alimentarios también diferentes y en consecuencia, serían esperables variaciones en la actividad alimentaria y la dieta (Ryer, 1987; Hegele-Drywa y Normant, 2009).

La alimentación de cangrejos intermareales activos durante la marea baja, como los Ocypodidos (Wolfrath, 1992), o que se mueven en aguas costeras someras claras (Cannicci et al., 1999) puede ser observada directamente en condiciones naturales. Por el contrario, aquellas especies que se alimentan bajo el agua muy turbia de los estuarios son más difíciles de observar y su actividad alimentaria es comúnmente evaluada por una captura programada según un esquema temporal-mareal con el posterior examen del contenido y volumen de llenado estomacal (Ryer, 1987; McTigue y Feller, 1989; Cannicci et al., 1996; Mascaró et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de alimentación y la composición de la dieta de *N. granulata* en diferentes hábitats (marisma y planicie de

mareas), comparando las condiciones diarias de luz/oscuridad y las condiciones mareales de emersión/inmersión, a lo largo del año y en tres lugares geográficamente distantes, expuestos a diferentes amplitudes de marea, distintas especies de *Spartina* y contenido de materia orgánica de los sedimentos. La hipótesis de trabajo es que la actividad alimentaria y los ítems consumidos, variarán dependiendo de las diferentes combinaciones de factores físicos, la disponibilidad de alimentos en cada sitio y la estación, con el fin de maximizar la obtención de energía.

## **Materiales y métodos**

### Áreas de estudio:

Se seleccionaron tres sitios, que forman un gradiente de aridez y amplitud de marea creciente hacia el sur, también asociados a cambios en las comunidades de las marismas (Isacch et al., 2006): Mar Chiquita (MC), Bahía Blanca (BB) y Bahía de San Antonio (SA) (ver Materiales y Métodos Generales y Fig. 1. 1).

### Recolección de los cangrejos:

Se muestrearon cangrejos maduros ( $\geq 20$  mm AC) de ambos hábitats (marisma y planicie de marea) de cada sitio, estacionalmente, durante 48 h. Las muestras fueron obtenidas cada seis horas aproximadamente, en el punto medio entre dos pleamares y bajamares sucesivas, cuando las cuevas estaban accesibles. La comida presente en los estómagos se consideró como obtenida en el período anterior a la toma de las muestras. De esta manera, los cangrejos muestreados durante la bajamar, fueron considerados como alimentados durante la pleamar anterior, y aquellos cangrejos muestreados durante la pleamar, como alimentados durante la bajamar anterior. Cada muestra estuvo conformada por siete machos, siete hembras no ovígeras y siete hembras ovígeras (en primavera y verano, cuando estaban presentes) recogidos de las cuevas a mano, al azar en las zonas muestreadas. Los cangrejos se mataron inmediatamente y los estómagos se extrajeron con unas pinzas de punta fina y se fijaron por separado en tubos etiquetados con formol al 4%.

Para cada muestra fueron registrados los siguientes datos: fecha, hora, hábitat (planicie de marea o marisma), fase de marea previa al muestreo (pleamar o bajamar),

cobertura de agua en el área (emergida o sumergida, independientemente de la fase de marea, ya que en muchos casos las mareas altas no cubren las áreas de muestreo), fase de la luz (luz de día u oscuridad, dependiendo de la condición prevaleciente a lo largo del período de 6 horas de muestreo).

#### Composición de la dieta:

Los estómagos se abrieron en el laboratorio con pequeñas tijeras y el contenido se vació en una pequeña placa de Petri (30 mm de diámetro) y se distribuyó uniformemente formando una capa delgada. Para evaluar el tipo de alimento ingerido, el contenido se determinó bajo microscopio y aquellos ítems que ocupaban más del 20% del volumen (por estimación directa de la superficie total cubierta por dicho elemento) se les asignó un valor entre 1 y 5 (1 = 20 % de volumen, 5 = 100% de volumen). Una distribución de frecuencias del % de volumen se construyó para cada ítem. Aquellos ítems representando menos del 20% del contenido total se registraron sólo como "presentes". Teniendo en cuenta que el material vegetal y el sedimento representaron la mayor parte del alimento en la mayoría de los estómagos de todos los sitios y hábitats, la variación en la proporción de sedimento se utilizó para evaluar las diferencias en la composición de la dieta entre sexos, hábitats, estaciones y localidades. Se realizó un análisis log-lineal (Norman y Streiner, 1996), comparando la distribución de frecuencias del % de volumen entre hábitat, sitio y estación. La presencia de otros ítems que consistentemente aparecieron en cantidades medibles en los estómagos de los cangrejos fue evaluada analizando las diferencias entre sexos, hábitats y sitios con una prueba de Chi-cuadrado.

#### Actividad alimentaria:

La presencia/ausencia de alimentos en el estómago de machos, hembras ovígeras y no ovígeras se utilizó para evaluar el efecto de las variables ambientales en la actividad de alimentación para cada sitio con un modelo lineal generalizado (MLG), realizando un análisis de varianza factorial con una distribución binomial y función de enlace logit (R Development Core Team, 2008). Los factores fueron: fase de la luz, cobertura de agua, hábitat y estación.

### Ecomorfología del estómago:

Para establecer la relación entre el tamaño del estómago y el porcentaje de herbivoría, se calculó un tamaño de estómago estándar para los tres sitios como la relación entre el ancho de estómago (AE) y el ancho del caparazón (AC) (Griffen y Mosblack, 2011), a partir de un grupo de cangrejos que cubría el rango de tamaño adulto completo. El ancho de caparazón máximo de cada cangrejo se midió con un calibre (cercano al 0.1 mm) y los estómagos fueron medidos bajo microscopio estereoscópico (cercano al 0.01mm) tomando el tamaño más ancho de la cámara cardíaca entre los extremos de ambos osículos laterocardiácos (Covelo de Zolessi y Spiritoso, 1985). Se utilizó una prueba de ANCOVA para analizar la homogeneidad de las pendientes en la relación entre el log AC y el log AE entre sitios.

### **Resultados**

#### Composición de la dieta:

Los principales ítems alimenticios presentes en todos los estómagos de los tres sitios fueron sedimento y restos de la planta halófila *Spartina* (*S. alterniflora* en SA y BB y *S. densiflora* en MC). En MC, los cangrejos de la planicie de marea contenían principalmente sedimento en sus estómagos ( $\geq$  al 80% del volumen), mientras que en los de la marisma, principalmente restos de *Spartina* spp. Solamente el 10% de los individuos tenían proporciones equilibradas de ambos tipos de comida (40 a 60% de cada uno). Los estómagos de unos pocos cangrejos (5%) contenían comida típica del otro hábitat, por ejemplo: sedimento en la marisma y viceversa. En BB, una mayor cantidad de individuos ingirieron cantidades balanceadas de ambos tipos de comida (18%) y comida típica del otro hábitat (21%). En SA, un tercer ítem, macroalgas rojas y pardas, fue común en primavera, verano y otoño representando hasta el 30% del contenido del estómago tanto en la planicie de mareas como en la marisma. Fue consumido más frecuentemente por los machos que por las hembras (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 6,05$ ,  $P < 0,05$ ; la diferencia no se muestra en la Fig. 1. 2) y en la marisma que en la planicie de mareas (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 9,3$ ,  $P < 0,01$ ) (Fig. 1. 2). En este sitio, el porcentaje de individuos con cantidades balanceadas de

los diferentes ítems en los estómagos alcanzó el 28% y aquellos individuos con comida típica del otro hábitat fueron del 21%, como en BB.

No hubo diferencias entre sexos en la proporción de sedimento en los tres sitios (prueba log-lineal,  $P > 0,05$ ) y los datos de ambos sexos se combinaron para hacer comparaciones posteriores. La proporción de sedimento en los estómagos dependió de la interacción entre hábitat, sitio y estación (prueba log-lineal,  $\chi^2 = 34,7$ ,  $P < 0,001$ ;  $\chi^2 = 37,8$ ,  $P < 0,001$ ;  $\chi^2 = 131,3$ ,  $P < 0,001$  para hábitat:estación, hábitat:sitio y estación:sitio, respectivamente).

En MC, la proporción promedio de sedimento en los estómagos fue mayor al 80% para los cangrejos de la planicie de mareas y por debajo del 30% para los de la marisma en todas las estaciones (Fig. 1. 2). En BB las proporciones fueron similares a las de MC en la primavera y el verano, mientras que en otoño e invierno, más del 60% del contenido estomacal promedio en los cangrejos de la planicie de mareas fueron restos de *S. densiflora* (Fig. 1. 2). En SA, la proporción de sedimento ingerido por cangrejos de la planicie de mareas estuvo cercana a 100% en el invierno pero fue más baja en el resto de las estaciones; al mismo tiempo, la proporción de sedimento en los estómagos de los cangrejos de la marisma fue en promedio que en los otros sitios, alcanzando cerca del 70% en invierno (Fig. 1. 2).

Se identificaron algunos ítems adicionales potencialmente ricos en proteína. Por otro lado, fueron identificados restos de poliquetos (mandíbulas y quetas), nematodos, copépodos y briozoos en los estómagos, pero con muy baja frecuencia y volumen. Restos de cangrejo (partes de exoesqueletos y/o pleópodos de hembras ovígeras con huevos), rara vez estuvieron representados, pero cuando estuvieron presentes, ocupaban una parte importante del volumen estomacal. Fueron más frecuentes en machos que en hembras (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 17,9$ ,  $P < 0,01$ ), similares entre hábitats (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 1,03$ ,  $P > 0,1$ ) y más frecuentes en SA que en los otros dos sitios (prueba Chi-cuadrado,  $\chi^2 = 7,61$ ,  $P < 0,05$ ) (Fig. 1. 3).

#### Actividad de alimentación:

Mar Chiquita: dado que las mareas baja y alta diarias pueden ser de amplitud muy diferente en este sitio, la zona intermareal estuvo cubierta de forma muy irregular durante

los períodos de muestreo (Fig. 1. 4). Las mareas altas llegaron a la planicie de marea en la zona intermareal baja en 9 de las 16 pleamares, y la marisma supramareal se inundó una sola vez, durante una marea alta extraordinaria de invierno. Parte del agua fue retenida en la zona de la planicie de marea, al menos en los pequeños canales de marea, entre dos inundaciones sucesivas. Dado que la planicie de marea y la marisma tuvieron diferentes combinaciones de factores, fueron analizadas por separado (usando la fase diurna, cobertura de agua y estación como factores). Además, en la planicie de marea, la primavera se analizó por separado debido a que no se pudo obtener la combinación “inmersión y oscuridad”. Esta estación fue luego analizada para los efectos de la fase diurna y cobertura de agua por separado.

En la planicie de marea, el único factor que influyó significativamente sobre la proporción de cangrejos alimentados durante el verano, otoño e invierno fue la fase diurna (GLM,  $\chi^2 = 17.5$ ,  $P < 0,001$ ): más cangrejos tenían comida en sus estómagos después de un período de oscuridad; ni la estación ni la cobertura de agua tuvieron algún efecto y no existieron interacciones entre ellos (GLM,  $P > 0,05$ ) (Fig. 1. 4a, c, d). En la primavera, ni la cobertura de agua ni la fase de la luz (analizadas por separado) tuvieron efecto sobre la actividad de alimentación (GLM,  $P > 0,05$ ) (Fig. 1. 4b). Es interesante notar que una condición climática especial estuvo presente durante las primeras 24 h del período de muestreo de primavera, cuando una llovizna mantuvo el suelo húmedo durante la marea baja.

En la marisma, donde el efecto de las mareas no pudo ser evaluado (ya que la marea alcanzó esta zona sólo una vez), la fase de la luz y la estación tuvieron un efecto sobre la actividad de alimentación (Fig. 1. 4e-h; GLM  $\chi^2 = 5,81$ ,  $P < 0,05$  y  $\chi^2 = 29,47$ ,  $P < 0,001$ , respectivamente), pero su interacción no fue significativa (GLM,  $P > 0,05$ ). Más cangrejos presentaban comida en el estómago después de las horas de oscuridad; la mayor actividad se registró en invierno (Fig. 1. 4e) y la menor en otoño, con 92% de los estómagos vacíos a lo largo de las 48 hs. de muestreo (Fig. 1. 4h).

Bahía Blanca: las mareas cubrieron con menos regularidad la parte superior del intermareal correspondiente a la planicie de marea (Fig. 1. 5). En consecuencia, la marisma y la planicie de marea mostraron diferentes combinaciones de factores por lo que se analizaron por separado. En la planicie de marea; no se pudo registrar la combinación

“cubierta de agua/luz del día” en verano por lo que esta estación no se consideró en la comparación estacional y el posterior análisis de los efectos de la fase diurna y cobertura de agua fueron hechos por separado. En invierno, primavera y otoño, los factores interactuaron de a pares (GLM, cobertura de agua: fase de la luz,  $\chi^2 = 5,64$ ,  $P < 0,05$ ; cobertura de agua: estación,  $\chi^2 = 6,74$ ,  $P < 0,05$ ; estación: fase de la luz  $\chi^2 = 9,42$ ,  $P < 0,01$ ), dando una compleja combinación de efectos. La actividad alimentaria de los cangrejos de la planicie de marea fue más intensa en invierno, seguido de otoño y primavera (Fig. 1. 5a-d). En invierno una alta proporción de cangrejos, llegando a veces al 100%, presentó comida en sus estómagos (Fig. 1. 5a). En primavera, proporciones de cangrejos alimentados superiores al 20% sólo aparecieron cuando coincidieron las condiciones “inmersión/oscuridad” (Fig. 1. 5b). En verano la actividad de alimentación en la planicie de marea fue muy baja y se incrementó un poco cuando el agua llegó a la zona en la oscuridad (Fig. 1. 5c). La superficie del sedimento en el verano estuvo totalmente seca y compacta, después de algunas horas de insolación. En otoño, una situación climática particular afectó este sitio durante todo el período de muestreo: un fuerte viento desde el sur, junto con lluvia, produjo un período muy largo de inmersión de la zona intermareal debido a que el agua era impedida de retroceder a causa del viento, y se mantuvo una continua saturación de agua del suelo, incluso durante la marea baja. En esas condiciones ningún efecto de cualquier factor en particular fue evidente en relación con la proporción de cangrejos alimentados (GLM,  $P > 0,05$ ) (Fig. 1. 5d).

En la marisma, todas las combinaciones de fase de la luz, cobertura de agua y estación estuvieron presentes y los factores fueron analizados en conjunto. Los tres interactuaron entre sí ( $\chi^2 = 24.59$ ,  $P < 0,001$ ). En invierno, la actividad de alimentación fue elevada durante el período de muestreo, al igual que en la planicie de marea: alrededor del 50% de los cangrejos tuvieron siempre comida en sus estómagos con un pico del 100% (Fig. 1. 5e). En primavera y verano, los cangrejos se alimentaron principalmente de noche y la proporción de estómagos llenos aumentó después de los períodos nocturnos de inmersión; los picos de verano fueron más altos que los de primavera (Fig. 1. 5f, g). Finalmente, en otoño, la proporción de cangrejos alimentados fue continuamente alta probablemente acorde con los largos períodos de inmersión, al igual que en la planicie de marea (Fig. 1. 5h).

San Antonio: las mareas en este sitio son regulares y todas las pleamares cubrieron tanto la planicie de marea como la marisma (Fig. 1. 6). El agua se infiltra con facilidad en el sedimento grueso de la planicie de marea por lo cual ésta se seca rápidamente después de que la marea se aleja, mientras que la marisma, con algo de sedimento fino acumulado, se mantiene húmeda durante períodos más largos. Dado que todas las combinaciones de factores pudieron ser registradas, todos los efectos pudieron ser analizados en conjunto. La fase de la luz tuvo un efecto significativo sobre la actividad de alimentación (GLM,  $\chi^2 = 19.09$ ,  $P < 0,001$ ) con una mayor proporción de estómagos con comida después de los períodos oscuros. Por otro lado, la estación, la marea y el hábitat interactuaron entre sí (GLM,  $\chi^2 = 13.08$ ,  $P < 0,001$ ). Los resultados de la interacción indicaron que:

1) en el invierno, la actividad de alimentación fue la más baja y casi la misma en ambos ambientes, siendo mayor después de períodos de inmersión (Fig. 1. 6a, e);

2) en primavera y verano, se recolectaron más cangrejos con comida en sus estómagos en la marisma después de un período de inmersión (Fig. 1. 6f, g);

3) durante las mismas estaciones, los cangrejos de la planicie de marea presentaron comida en sus estómagos después de períodos de emersión también y cuando éstos se combinaron con oscuridad (Fig. 1. 6b, c). De hecho, se pudieron observar muchos cangrejos comiendo en el sedimento fuera de sus cuevas durante los muestreos nocturnos en ambas estaciones;

4) en otoño, la actividad de alimentación en la planicie de marea fue más intensa después de un período de inmersión (Fig. 1. 6d) y en cambio fue uniformemente elevada en la marisma (Fig. 1. 6h).

Las hembras ovígeras estuvieron presentes en primavera y verano en los 3 sitios. La mayoría de ellas tenían el estómago vacío, independientemente del sitio, hábitat, las mareas y la luz. El mayor porcentaje de hembras ovígeras con algo de comida en sus estómagos correspondió a SA, con un 21%, mientras que en los otros dos sitios alcanzó sólo el 10%.

#### Ecomorfología del estómago:

La pendiente de la relación log AC vs log AE no fue diferente entre los tres sitios ( $F = 0,17$ ,  $P > 0,05$ ) y todos los datos se agruparon. El tamaño estándar promedio del

estómago estimado (AE/AC) fue =  $0,442 \pm 0,025$ . El porcentaje de herbivoría para *N. granulata*, calculado en base a la ecuación  $\%H = [(AE/AC) - 0,24] / 0,0024$  (Griffen y Mosblack, 2011) es de 84%.

## **Discusión**

### ¿Que come *N. granulata*?

El alimento consumido por una especie proporciona información básica acerca del nivel trófico que ocupa y el papel que desempeña en el ecosistema. Los contenidos estomacales encontrados en *Neohelice granulata* durante este estudio coinciden con trabajos anteriores en relación a que este cangrejo puede ser considerado herbívoro o detritívoro y ocasionalmente, puede comportarse como carroñero o depredador (D' Incao et al., 1990). Sin embargo, aunque esta especie puede habitar áreas con condiciones de salinidad y composición del suelo diversas a lo largo de su amplio rango de distribución (Spivak, 1997), ellos sólo están presentes en sitios poblados por la planta halófito *Spartina* sp. Iribarne et al (1997) reportaron que en MC *N. granulata* se comporta principalmente como herbívoro (o parcialmente consumidor de restos vegetales) cuando vive en la marisma, y como alimentador de depósito cuando vive en la planicie de marea. Este estudio demostró que este patrón es verdadero sólo en MC, pero que difiere en otras poblaciones. Diferencias locales en la productividad de las especies de *Spartina* y la distribución del material depositado, calidad del sedimento y disponibilidad de algas, pueden explicar las variaciones en los patrones de alimentación observados en BB y SA.

Un patrón de ingesta similar al del MC ocurrió en BB durante la primavera y verano, mientras que en otoño e invierno, *S. alterniflora* fue claramente incorporada como alimento en los cangrejos de la planicie de mareas. Un pico en la producción de biomasa verde por parte de las especies de *Spartina* tiene lugar en MC y BB durante el verano mientras que los valores mínimos están presentes en otoño-invierno (González Trilla, 2010). Sin embargo, mientras que en MC el material depositado es consumido o exportado a otras partes del ecosistema, en BB típicamente se acumula en las partes más altas de la marisma: en este sitio, la marisma está ubicada en el intermareal bajo y las corrientes de baja energía transportan los restos del material vegetal hacia zonas más altas (González

Trilla, 2010). Entonces, el consumo de *S. alterniflora* por parte de los cangrejos de la planicie de marea en otoño e invierno podría ser consecuencia del transporte de material depositado en BB; además, este resultado sugiere que los cangrejos prefieren hojas de *S. alterniflora* depositadas en el sedimento cuando ambos están disponibles.

Los cangrejos de SA, por otro lado, tuvieron un alto contenido de sedimento en sus estómagos (alcanzando 80% en invierno) a pesar de su bajo contenido de materia orgánica (máximo 1,8% vs 4-5% reportado en BB y MC, Bas et al., 2005; Luppi et al., 2012). Ellos incorporaron también una alta proporción de algas a la dieta, incluso cuando *S. alterniflora* estuvo siempre disponible. La ingesta de grandes cantidades de sedimento por parte de los cangrejos de la marisma en invierno pudo tener sentido sólo si otras opciones disponibles (por ejemplo: *S. alterniflora*) fuesen peores. El ciclo anual de *S. alterniflora* no ha sido estudiado en SA pero probablemente el invierno sea la estación con menor productividad, sin crecimiento de nuevos tallos, como ocurre en otras poblaciones estudiadas (González Trilla, 2010); en consecuencia, la calidad de las plantas de invierno debería ser la más pobre del año. Las algas, por otro lado, no estuvieron presentes en invierno, mientras que en las otras estaciones fueron conspicuamente traídas por la marea y depositadas en la superficie de la planicie de marea y la marisma. Por consiguiente, se incorporaron activamente como alimento cuando estuvieron presentes. Algunos rasgos de la historia de vida y reproductivos de *N. granulata* en SA sugieren que la reproducción y el crecimiento están probablemente limitados por el bajo contenido energético de la comida (Bas et al., 2005; Ituarte et al., 2006). Además, la notoria presencia de restos de cangrejos en los estómagos de machos de la marisma de SA, siendo en muchos casos los únicos ítems registrados, sugiere que la incorporación de nuevos ítems alimenticios y el incremento del canibalismo es una respuesta a la limitación (probablemente de proteína) de energía. La diferencia entre sexos puede estar relacionada a la mayor movilidad de los machos (Luppi et al., 2012) y al mayor tamaño de sus quelas.

El modo dual de alimentación encontrado en *N. granulata* (herbívoros y alimentadores de depósito) no es común en animales. Los cangrejos semiterrestres que viven en las zonas intermareales de los manglares son principalmente alimentadores de depósito omnívoros (y las plantas son incorporadas como detrito al sedimento), o se alimentan de restos de plantas. Las especies que se alimentan de tallos vivos de plantas, por

el contrario, son más terrestres, es decir, viven lejos del intermareal (Dahdouh-Guebas et al., 1999; Linton y Greenaway, 2007). El cangrejo estuarial *Armases cinereum* también tiene un aparente modo dual de alimentación: ingiere plantas vivas de *Spartina* cuando están disponibles pero se comporta también como alimentador de depósito, y parcialmente como depredador, prefiriendo una dieta mixta sobre cualquier otra opción (Seiple y Salmon, 1982; Buck et al., 2003). Sin embargo, *A. cinereum* rara vez presenta partículas de sedimento en sus estómagos (como ocurre en *N. granulata*) debido a que recogen selectivamente pequeños organismos y detritus del sustrato (Seiple y Salmon, 1982). Esta diferencia interespecífica podría reflejar: 1) una mayor capacidad de *A. cinereum* para seleccionar los alimentos debido al menor tamaño de sus quelas y/o su forma, o 2) la forma en que cada especie explota los recursos disponibles en el sedimento (por ejemplo, *N. granulata* puede, hipotéticamente, obtener alimento a partir de materia orgánica particulada y/o materia orgánica disuelta en lugar de partículas vegetales; Mann, 1988).

Griffen y Mosblack (2011) predijeron el porcentaje de herbivoría de algunas especies de cangrejos en función del tamaño de su estómago. De forma simplificada, el tamaño estandarizado del estómago (AE/AC) de cangrejos braquiuros se correlaciona con el grado de herbivoría de las especies: los cangrejos herbívoros necesitan ingerir grandes volúmenes de materia vegetal con bajo contenido de N, mientras que el alimento de los cangrejos carnívoros se caracteriza por un bajo volumen de una dieta rica en proteínas. Acorde a este modelo, el porcentaje de herbivoría previsto para el tamaño del estómago estandarizado de *N. granulata* debería ser 84%. Sin embargo, una gran herbivoría apareció sólo en los cangrejos que viven en la marisma, mientras que la mayoría de los individuos de la planicie de marea, presentaron una baja proporción de alimentos de origen vegetal y una importante ingesta de sedimento. El sedimento es considerado un recurso alimenticio de muy baja calidad ya que contiene grandes cantidades de material inerte (cerca del 95%, (Lopez y Levinton, 1987). En consecuencia, volúmenes estomacales más grandes serían evolutivamente seleccionados para cangrejos detritívoros, como sucede en los herbívoros, y la morfología del intestino medio para ambos modos de alimentación sería similar.

¿Dónde y cuándo come *Neohelice granulata*?

Aunque se ha establecido que *N. granulata* es el principal herbívoro que se alimenta de las especies de *Spartina* en las marismas del Atlántico sudoccidental, y que los cangrejos cambian a alimentadores de depósitos en algunas situaciones (Bortolus y Iribarne, 1999; Bortolus et al., 2004; Alberti et al., 2007a), éstos no fueron frecuentemente observados alimentándose en condiciones naturales. Estos cangrejos son menos activos durante las mareas bajas, cuando los estudios de campo son posibles, incluso una investigación detallada sobre los movimientos cortos alrededor de los refugios falló en detectar alimentación (Fathala et al., 2010); sólo se pudieron obtener evidencias indirectas de alimentación, como marcas dejadas por las quelas y pequeñas áreas con la capa superficial del sedimento removida alrededor de las cuevas (Bas, obs. pers.). En el laboratorio, los individuos pueden ser alimentados con sedimento si se los coloca en acuarios sin agua y con un fondo de barro saturado de agua (Lancia et al., 2012); sin embargo, no manipulan el sedimento debajo del agua (Bas, obs. pers.). La actividad de alimentación en el sedimento en condiciones naturales está probablemente limitada a períodos cortos después del retroceso del agua, mientras el suelo permanece húmedo, y los cangrejos deben moverse dentro de las cuevas después de este periodo; de hecho, una gran proporción de individuos capturados en la planicie de marea tenían comida en sus estómagos después de dichos períodos. Además, cuando la marea baja coincide con las horas de oscuridad, temperaturas moderadas o clima lluvioso, el período de alimentación de sedimento húmedo se incrementa, ya que el suelo retiene humedad durante más tiempo.

En las marismas, los cangrejos son aún más difíciles de observar debido al refugio y la sombra ofrecida por las plantas; sin embargo, durante el período de inundación, cuando el agua alcanza ocasionalmente la marisma de MC, se ha observado que los cangrejos, en su mayoría machos, se mueven con el agua subiendo a los tallos y comiendo directamente las hojas de las plantas de *S. densiflora* (Lancia, obs. pers.). En el laboratorio, los machos y hembras cortan las hojas *Spartina* spp. con sus quelas y las comen sosteniendo el fragmento contra sus piezas bucales mientras mueven las mandíbulas (Capítulo 2 de esta tesis). Incluso, los cangrejos comen hojas si se las ofrece en pequeños fragmentos sobre la superficie húmeda del sedimento (Capítulo 2 de esta tesis).

La falta de asociación entre la cobertura de agua y la alimentación en muchos de los períodos muestreados en las áreas de la marisma de los diferentes sitios podría ser

explicada por la presencia de dos modos alternativos de alimentarse de *Spartina* spp.: 1) la ingesta de hojas vivas o brotes preferiblemente en los períodos de inundación, cuando los cangrejos pueden cortarlos directamente de la planta, utilizando el agua que está subiendo para trepar, o 2) la obtención de material vegetal depositado en el suelo después del período de inundación. De esta manera, patrones diferentes de alimentación pueden responder a la combinación de una cobertura de marea, y una disponibilidad de plantas (hojas frescas o depositadas) variables en las diferentes marismas y estaciones.

En el comportamiento de alimentación de *N. granulata*, tres tendencias fueron evidentes:

1) la mayoría de los cangrejos de todos los sitios y hábitats se alimentaron en la oscuridad. La luz es uno de los principales factores físicos que determinan los ciclos diarios de alimentación de los cangrejos intermareales y el patrón más común es la obtención de alimentos en gran medida en las horas de oscuridad (por ejemplo, Paul, 1981; Aagaard et al., 1995), aunque puede variar entre sitios o hábitats de acuerdo a la amplitud de la marea en diferentes sitios (Ryer, 1987; Cannicci et al., 1999). Sin embargo, especies depredadoras, como *Thalamita crenata*, se alimentan durante el día (Cannicci et al., 1996). La alimentación en la oscuridad puede ser ventajosa debido a que se pueden evitar depredadores visuales y a su vez, el estrés físico causado por la temperatura elevada puede ser disminuido. En MC y BB, por ejemplo, algunas aves que predan sobre *N. granulata*, son depredadores visuales activos sólo durante las horas del día (Luppi et al., 2012).

2) los cangrejos prefirieron alimentarse durante (o inmediatamente después) de las mareas altas en los sitios donde el sedimento y las cuevas se secan rápidamente durante las mareas bajas (como en la planicie de marea de BB y SA), de lo contrario fueron independientes de las mareas.

3) las hembras ovígeras se alimentaron en muy baja proporción. Estas hembras casi nunca presentaron comida en sus estómagos, aun cuando fueron capturadas en las mismas áreas y al mismo tiempo que los machos y las hembras no ovígeras. De la misma manera, este grupo rara vez fue encontrado en las trampas de movimiento donde fueron capturados los otros grupos (Luppi et al., 2012), sugiriendo que no sólo la alimentación, sino también cualquier movimiento fuera de las cuevas está restringido mientras las hembras están incubando.

En resumen, la actividad alimentaria de los cangrejos adultos de *N. granulata*, indirectamente aquí estudiada a través de la presencia/ausencia y la proporción de ítems en los estómagos es, en primer lugar, una actividad desarrollada principalmente dentro del hábitat de cada individuo y, al mismo tiempo, parece ser flexible, adaptándose a diferentes combinaciones de factores físicos y biológicos. La cantidad y calidad del alimento ingerido varía entre sitios con una tendencia a la omnivoría (incluyendo algas y conespecíficos en la dieta) cuando el contenido de energía de los principales recursos alimenticios es bajo y otros ítems están presentes.

### Figuras

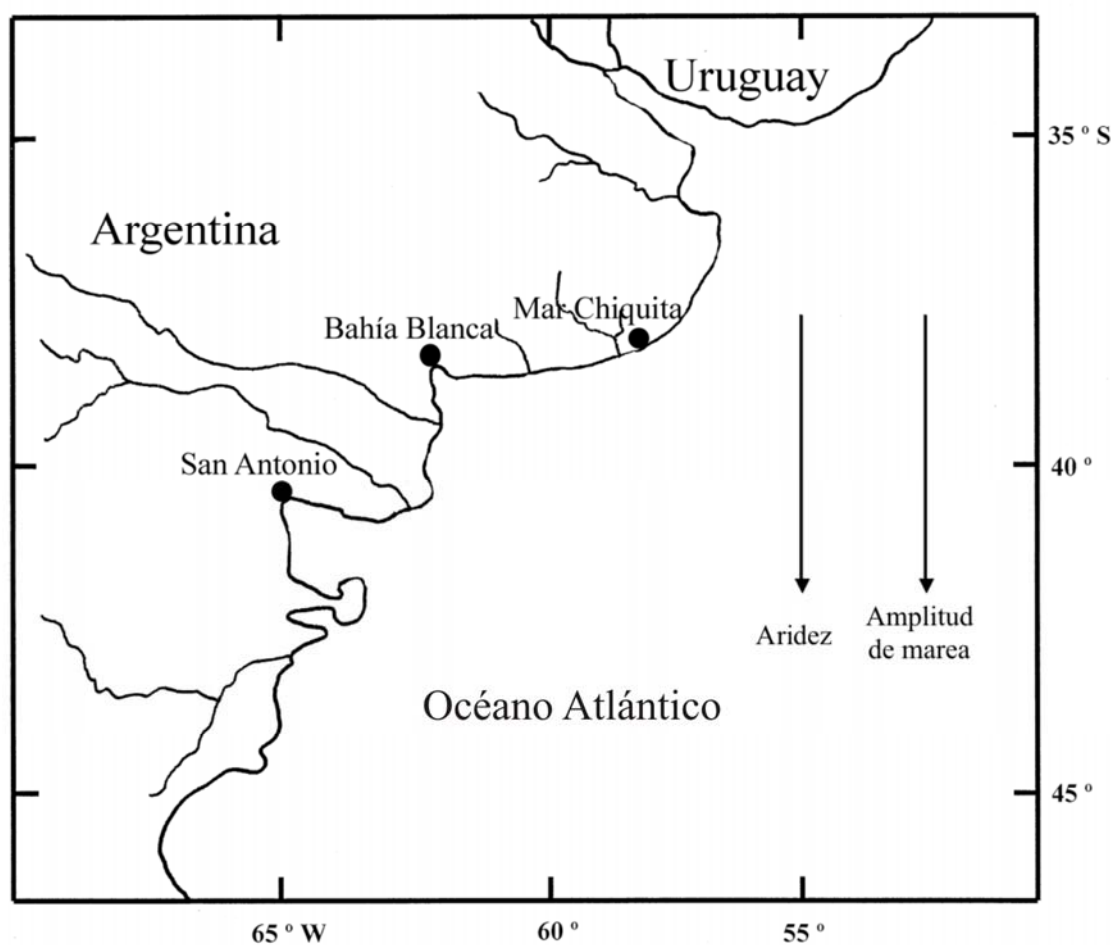


Fig. 1. 1. Sitio de estudio. Los puntos negros: localidades donde se obtuvieron las muestras. Flechas: variación latitudinal de la aridez y la amplitud de mareas.

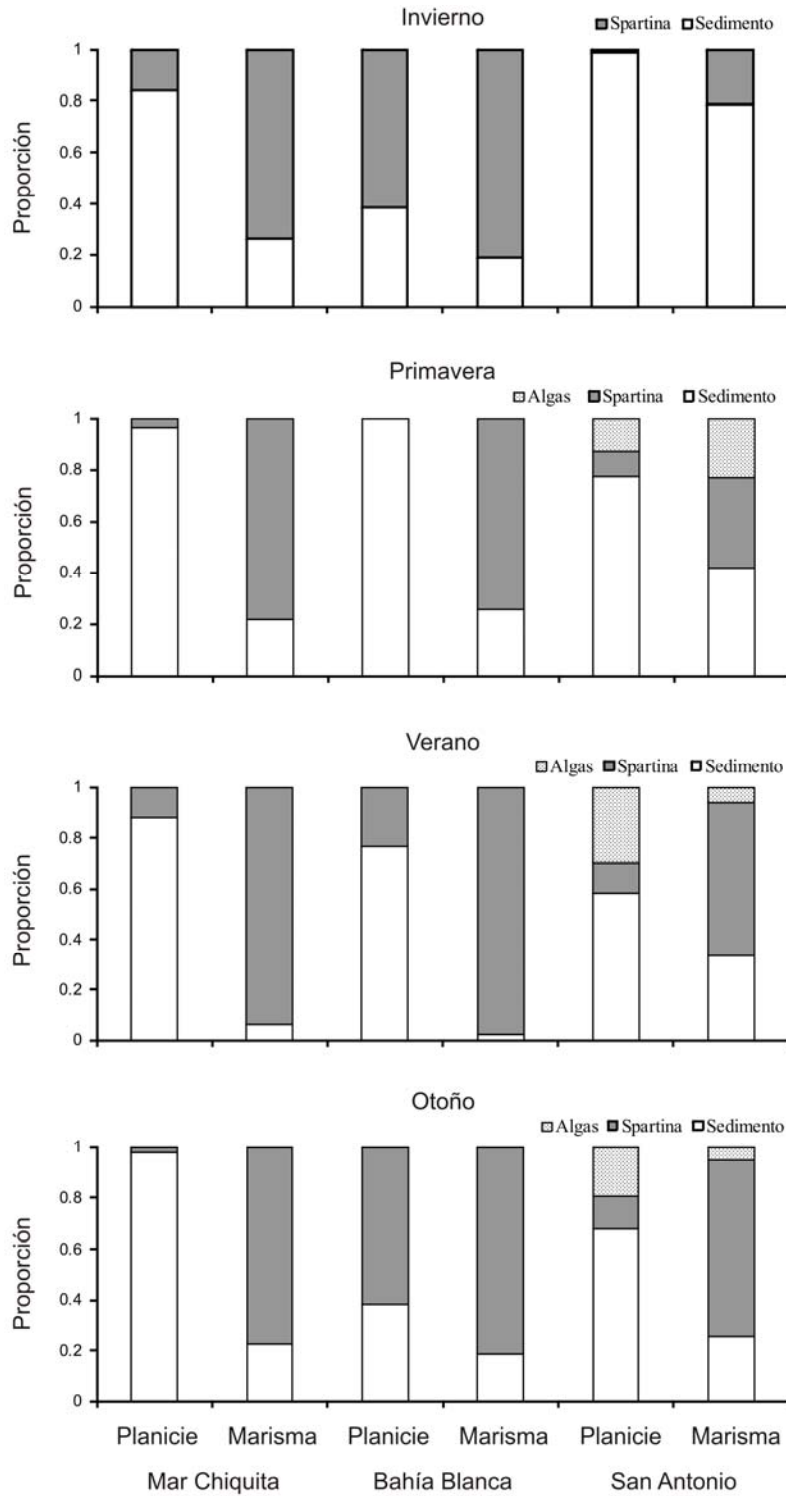


Fig. 1. 2. Porcentaje del volumen de alimentos representados por los principales items ingeridos por *N. granulata* en los tres sitios a lo largo de las cuatro estaciones; sedimento, restos de macrofita (*Spartina*) y restos de macroalgas (algas).

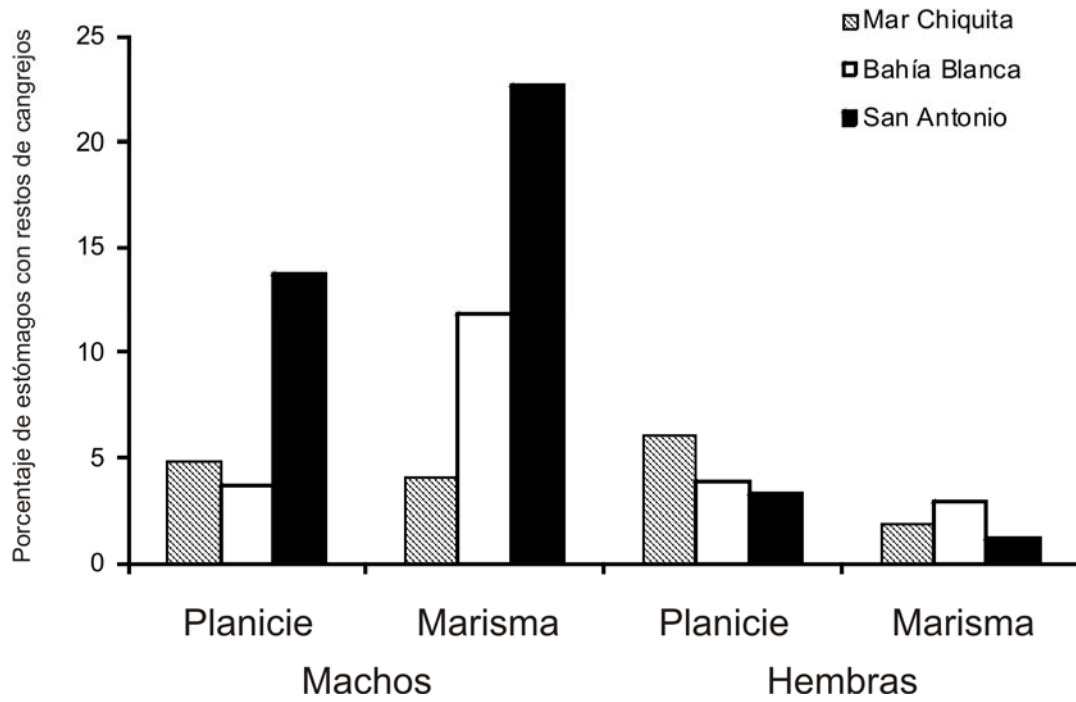


Fig. 1. 3. Porcentaje de individuos de *N. granulata* de cada sexo, sitio y hábitat conteniendo restos de cangrejos en sus estómago (congéneres canibalizados).

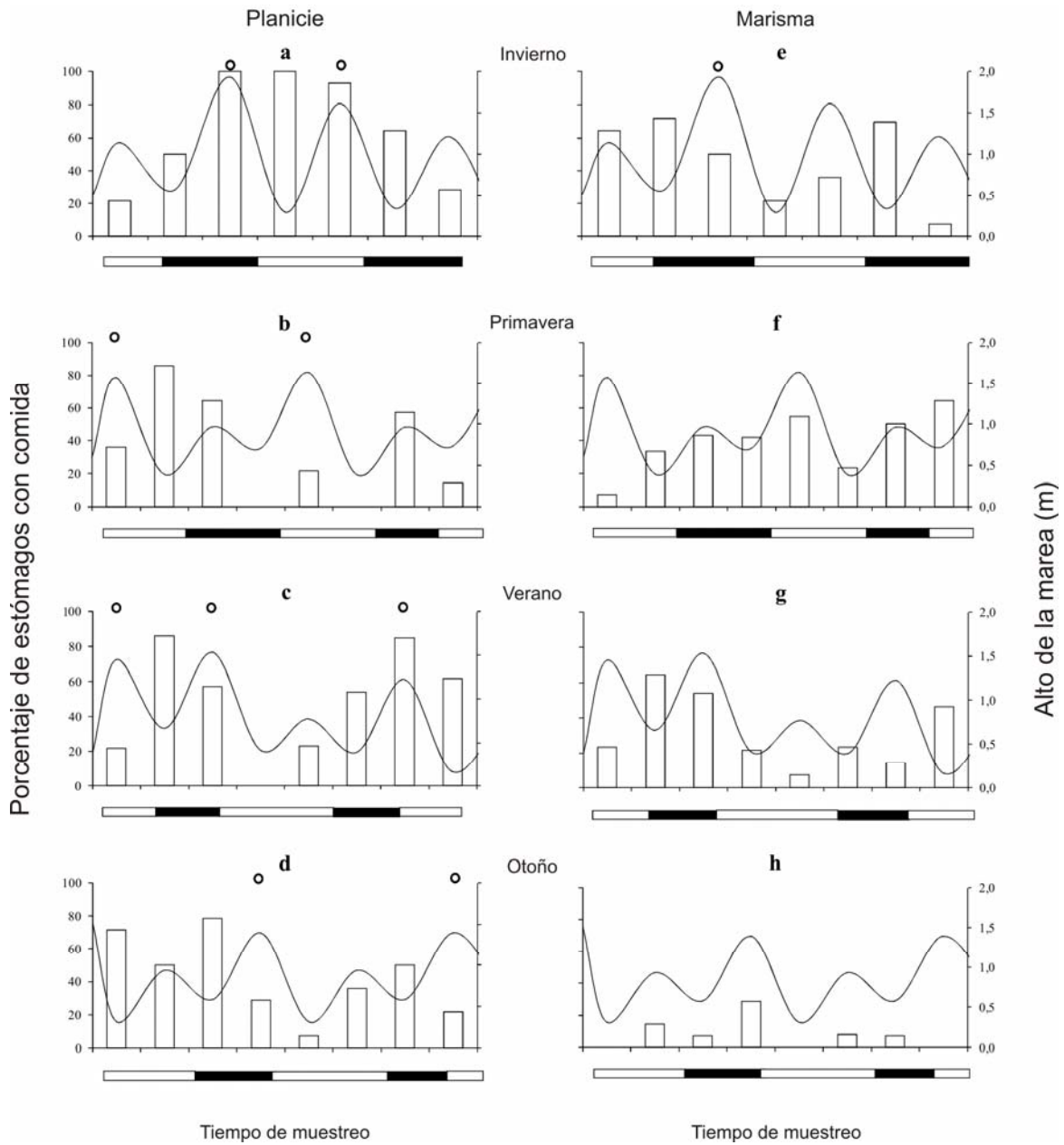


Fig. 1. 4. Porcentaje de estómagos con comida respecto del número total de estómagos muestreados en la planicie de marea (a-d) y en la marisma (e-h) de Mar Chiquita en invierno (a,e), primavera (b, f), verano (c, g) y otoño (d, h). La altura de la marea está representada como una línea continua (altura del eje y a la derecha). Los círculos en la parte superior de cada gráfico (coincidentes con la marea alta) indican las mareas que realmente cubrieron la planicie de marea o la marisma. Las barras horizontales por debajo de cada gráfico indican los períodos de luz (blanco) y oscuridad (negro).

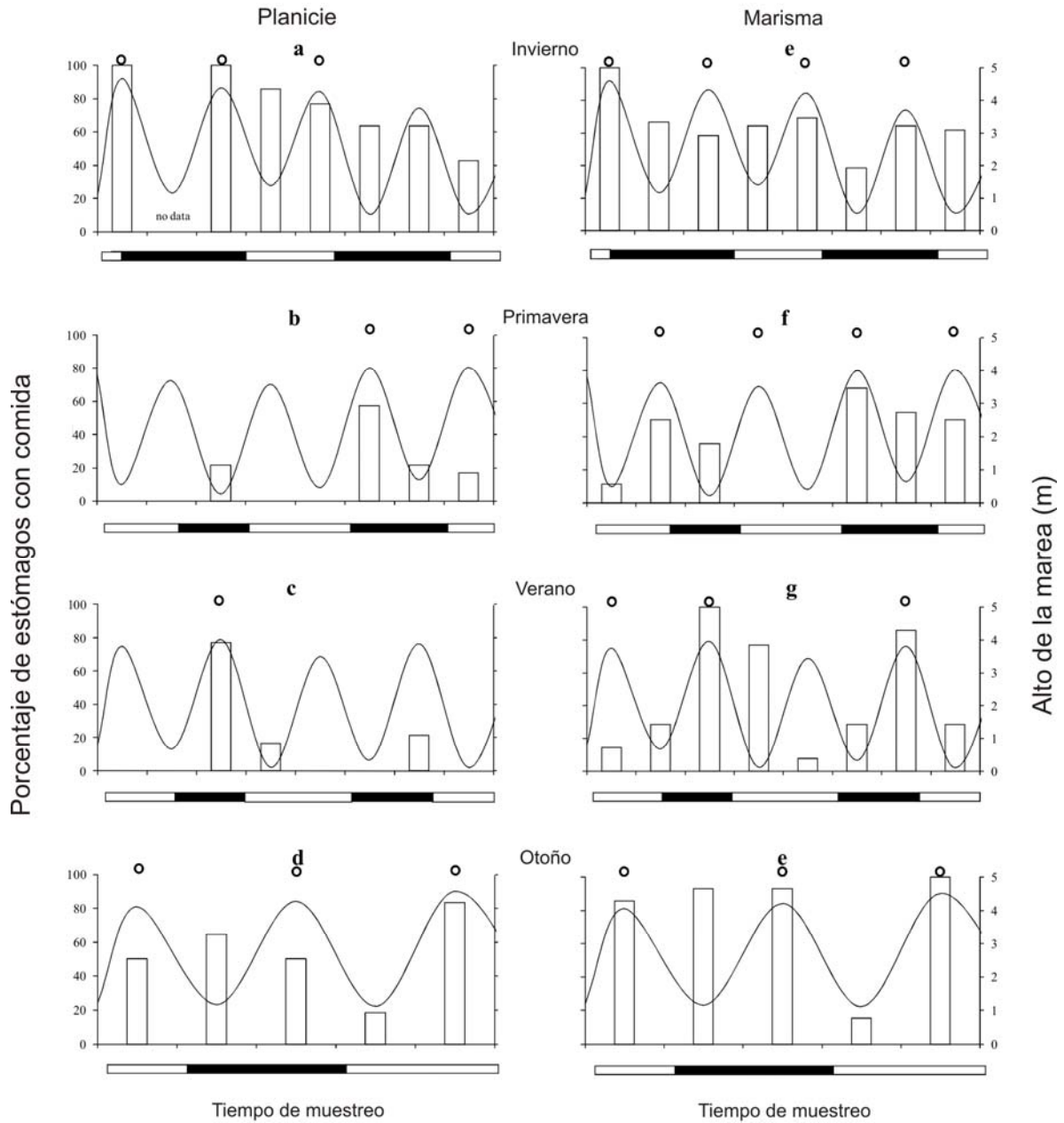


Fig. 1. 5. Porcentaje de estómagos con comida del número total de estómagos muestreados en Bahía Blanca. Consulte las explicaciones de leyenda bajo la figura 1. 4.

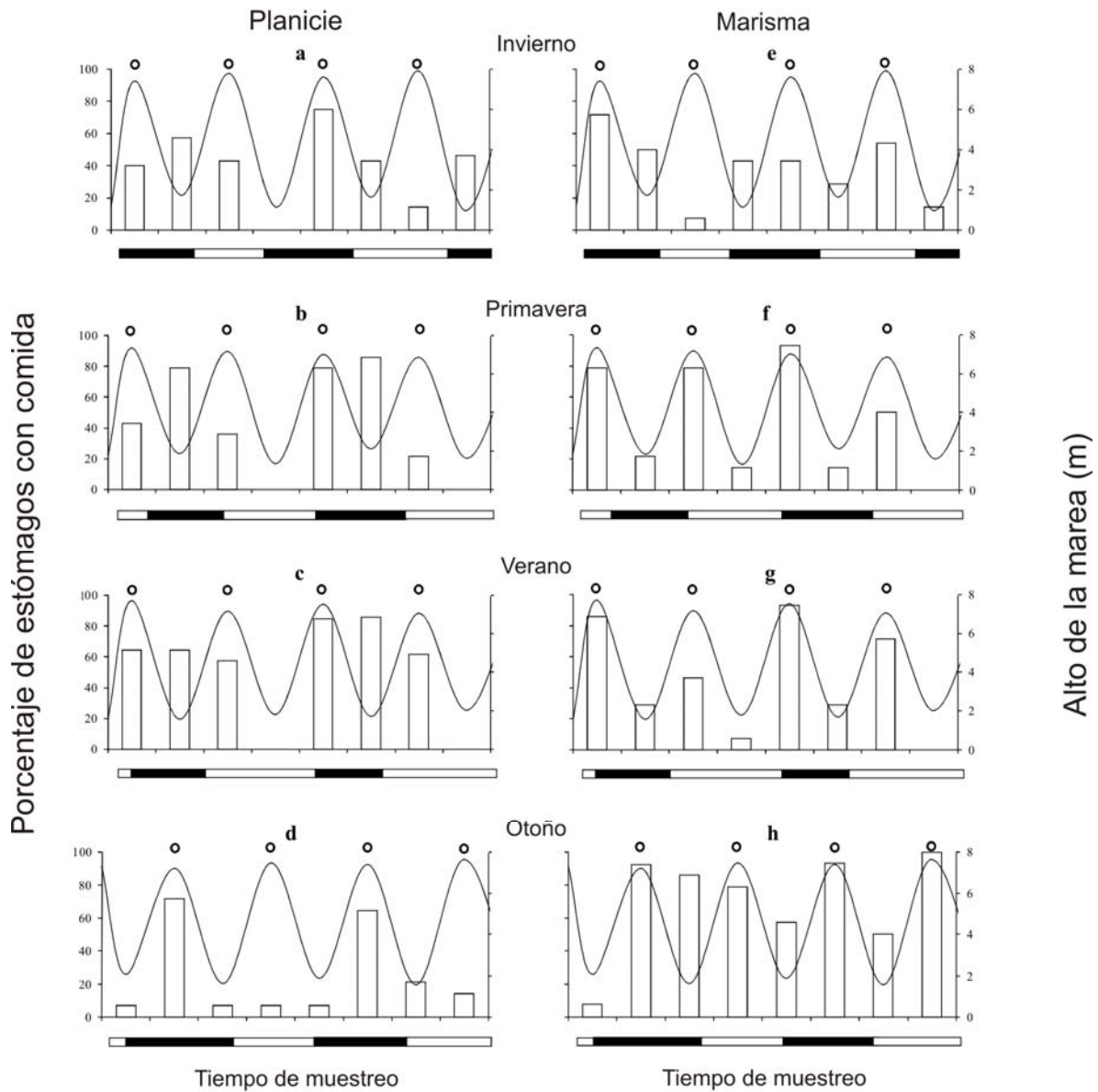


Fig. 1. 6. Porcentaje de estómagos con comida del número total de estómagos muestreados en San Antonio. Consulte las explicaciones de leyenda bajo la figura 1. 4.

## Capítulo 2:

### Comportamiento de alimentación y capacidad de selección de partículas del sedimento

#### Introducción

A partir de estudios previos sobre la especie y de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se ha podido establecer que la alimentación de *Neohelice granulata* puede variar en función del ambiente que ocupan los cangrejos, comportándose principalmente como “herbívoros” en la marisma y como “alimentadores de depósito” en las planicies de marea, donde rastrillan la superficie del sedimento y detritus inmediatamente después del refluo durante las mareas bajas.

Cuando *N. granulata* se comporta como herbívoro, su contenido estomacal está compuesto principalmente por restos de plantas; sin embargo, cuando se comporta como alimentador de depósitos, el contenido estomacal se compone mayoritariamente de material inerte y de varios ítems entre los cuales se encuentra materia orgánica disuelta, restos de crustáceos y de otros organismos que conforman la meiofauna y detritos vegetales (D'Incao et al., 1990).

Muchos cangrejos herbívoros deben complementar su dieta con ítems alimenticios ricos en nitrógeno en orden de alcanzar sus demandas mínimas (Micheli, 1993), dado que el valor nutritivo de las hojas es insuficiente para mantener el crecimiento y que las altas relaciones C:N que generalmente presentan las plantas, están muy por encima de la relación de 17:1 propuesta como límite nutricional animal por Russell-Hunter en 1970 (Thongtham y Kristensen, 2005; Linton y Greenaway, 2000). Así, los cangrejos parecen utilizar las microalgas, bacterias y hongos asociados con la superficie del sedimento como fuente accesoria de N (Thongtham et al., 2008).

Por otra parte el sedimento utilizado por los alimentadores de depósito como alimento, más allá de su origen y composición precisa, puede considerarse como una fuente de nutrientes muy pobre, dado que aún el sedimento más rico en materia orgánica posee hasta un 95% de material inerte (Lopez y Levinton, 1987). Además, recientemente se ha estimado para *Neopisesarma versicolor*, un cangrejo sesarmido con un tipo de

alimentación similar a *N. granulata*, que los individuos deberían ingerir entre 7 y 23 cm<sup>3</sup> diarios de sedimento para cubrir por completo su necesidad de N a través de la digestión de los microorganismos asociados (Thongtham y Kristensen, 2005). Ese volumen representa un orden de magnitud más de sedimento que su propio peso por día, y por lo tanto no parecen ser los microorganismos del sedimento la fuente de alimento utilizada.

Dentro de los decápodos intermareales especializados en la alimentación de depósito, uno de los géneros más estudiados es el de los cangrejos violinistas (*Uca* spp.) (Robertson and Newell, 1982; Lim, 2004; Sayão-Aguiar et al., 2012). Las diversas especies de éste grupo recogen el sedimento durante la bajamar, los machos con la quela menor, y lo llevan a la boca donde el material es clasificado y seleccionado para ser ingerido. Con el sedimento de mayor granulometría forman pequeñas esferas desprovistas de partículas alimenticias, llamados gránulos de alimentación, que quedan depositados sobre el sustrato como resultado de su actividad. De esta manera, los cangrejos se alimentan de partículas orgánicas (diatomeas, bacterias y detritos), restos de plantas de la marisma y de animales (Wolfrath, 1992).

Por su parte, *N. granulata* ocupa ambientes con sedimentos arcillosos y limosos muy finos que retienen agua (Spivak et al., 1994). Este sedimento del que se alimenta es probablemente difícil de manipular y esta especie no forma los gránulos de alimentación característicos de *Uca* spp. De esta manera, no se sabe si *N. granulata* es capaz de extraer eficientemente el alimento a partir del sedimento. Sin embargo, se determinó que el contenido de N y C en las heces de cangrejos alimentados con sedimento, es mayor al del alimento antes de ser ingerido (Capítulo 5 de esta tesis), lo cual sugiere cierta selección del material consumido junto con el sedimento, que permitiría una concentración mayor de nutrientes que dejaría en las heces una gran cantidad de C y N aún después de cierto grado de asimilación. A partir de estas observaciones, los objetivos propuestos para este capítulo fueron explorar los comportamientos de alimentación que llevan a la obtención de los distintos componentes de la dieta, y medir la capacidad de selección de las partículas que contiene el sedimento por parte de *N. granulata*.

## **Materiales y métodos**

### **Recolección de los cangrejos:**

El estudio se llevó a cabo con cangrejos de la laguna de Mar Chiquita. Los cangrejos fueron capturados en invierno, cuando están en reposo post-reproductivo y todas las hembras presentan la misma fase de desarrollo ovárico (Ituarte et al., 2006). Se seleccionaron cangrejos en intermuda según Drach y Tchernigovtzeff (1967) y sólo se utilizó un pequeño rango de tamaño de los adultos. Veinte hembras (21-26 mm de ancho de caparazón, AC) y 20 machos (26-32 mm AC) fueron colectados y mantenidos según se especificó en la metodología general. Todos los animales se mantuvieron tres días sin comer para asegurarse que los estómagos estuviesen vacíos antes de comenzar los experimentos.

#### Recolección y preparación del alimento:

Se realizó según lo especificado en la metodología general

#### Alimentación de los animales y filmación del comportamiento alimenticio:

Pasados los 3 días de ayuno, los cangrejos fueron numerados para facilitar su identificación en los videos, se los separó en grupos de cinco individuos del mismo sexo para cada tipo de alimento, y fueron alimentados con sedimento u hojas de *S. densiflora* según lo especificado en la metodología general. La actividad de alimentación de cada grupo fue filmada utilizando una cámara fija LG B&W CCD modelo LVC-S50HC conectada a una computadora. De los videos obtenidos se observó la técnica de manipulación por parte de los cangrejos de cada sexo para cada tipo de alimento, y el comportamiento respecto otros cangrejos.

#### Capacidad de selección de las partículas del sedimento:

Al igual que la experiencia anterior, se utilizaron cangrejos de Mar Chiquita, capturados de la misma manera y el tratamiento y cuidado fue el mismo al mencionado anteriormente. Se utilizaron 20 hembras y 20 machos que fueron alimentados en grupos de cinco. El sedimento fue cuidadosamente homogeneizado una vez descongelado, mezclando con una espátula durante cinco minutos el contenido de cada plato ofrecido, para asegurar una distribución uniforme del contenido de partículas de alimento. Antes de alimentar a los cangrejos, se tomaron tres muestras de sedimento de un volumen similar al del estómago

cardíaco de un cangrejo adulto, (0.02 cm<sup>3</sup>) a las que se les escurrió el sobrante de agua utilizando trozos de malla de 120 µm de peso conocido sobre papel absorbente. Al sedimento escurrido se le determinó el peso húmedo con una balanza analítica (0.01 mg) y luego se lo pasó a un tubo Eppendorf con formol 4% y colorante rosa de bengala por un día para fijar y ayudar a visualizar y separar los organismos o sus restos.

Los cangrejos, alimentados como mínimo durante una hora con el mismo sedimento del que provenían las muestras, fueron crioanestesiados y rápidamente se los mató mediante la introducción de una pinza de punta fina ventralmente en el cefalotorax. Para extraer el estómago, se abrió el caparazón dorsalmente, se extrajo el órgano con unas pinzas y se vació su contenido escurriéndolo de la misma manera que a las muestras de sedimento. Los individuos que no habían llenado al menos la mitad de su estómago fueron descartados. El contenido estomacal escurrido fue pesado y almacenado igual que las muestras de sedimento.

Las muestras de sedimento y los contenidos estomacales fueron examinados bajo microscopio óptico con un aumento de 4x utilizando una cámara de conteo Sedgewick Rafter de volumen fijo de 1 ml. La totalidad de las muestras pesadas fueron resuspendidas en agua y colocadas en alícuotas de 1 ml en la cámara de conteo. Después de distribuir homogéneamente la muestra en la cámara se contaron los organismos o restos de organismos mayores que 0.1 mm presentes en 40 celdas regularmente distribuidas, totalizando 40 µl de muestra, estimando luego los valores correspondientes para cada ml de muestra. La suma de lo estimado para todo el volumen correspondiente a cada una de las muestras se expresó como número de individuos de cada categoría por gramo de muestra de acuerdo al peso de la misma y a partir de estos datos se calculó la composición porcentual para el sedimento antes y después de ser ingerido.

Un índice lineal de selección de alimento (Strauss, 1979) fue calculado como:

$$L = r_i - p_i$$

donde  $r_i$  y  $p_i$  son las abundancias relativas (expresadas como proporciones) del ítem presa  $i$  en el estómago y el hábitat, respectivamente.  $L$  toma valores entre -1 y 1, siendo 0 el valor esperado del índice para una alimentación al azar (no selección), y alcanzando los

valores extremos cercanos a 1 sólo cuando la presa es muy rara pero consumida exclusivamente y de -1 cuando la presa es muy abundante pero raramente consumida.

#### Análisis estadístico:

Las diferencias entre sexos de los índices de electividad calculados fueron analizadas con un Test de t. En todos los casos, la significación fue establecida como  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1979).

### **Resultados**

#### Comportamiento de alimentación:

Se filmaron de cangrejos machos y hembras alimentándose de sedimento y hojas de *Spartina densiflora*. Se pudo observar que existen diferencias entre sexos en la manipulación del alimento sobre todo cuando se alimentan de hojas de *S. densiflora*. Las hembras manipulan los tallos con sus quelas y separan las hebras que conforman la hoja hasta cortar una hebra fina que comienzan a procesar con sus mandíbulas desde un extremo, ingiriendo los pequeños trozos que van cortando. Los machos grandes en cambio, utilizan la fuerza de sus quelas para doblar la hoja de *Spartina* entera y luego proceden a cortarla por el doblez con sus mandíbulas para finalmente tomar el trozo con ambas quelas y comenzar a procesarlo con las mandíbulas desde el extremo cortado e ingerirlo. Los machos más jóvenes, de tamaños similares a los de las hembras, utilizan el mismo procedimiento que éstas.

La forma de manipular el sedimento es la misma en ambos sexos. Cada individuo recorre la zona y ocasionalmente introduce las quelas en el sedimento llevando un poco de barro hacia la boca, utilizándolas como “cucharas”, en una actividad que parece de evaluación mientras sigue su desplazamiento. Durante este rastrillaje, puede pasar que los cangrejos encuentren ítems más grandes (restos de plantas principalmente), en cuyo caso los ingieren, o que se detengan finalmente en una zona determinada y se dediquen a ingerir el sedimento allí presente, utilizando una o ambas quelas alternadamente para llevarlo a la boca. No se observa a simple vista una manipulación más fina del sedimento con las quelas que pudiera interpretarse como un proceso de selección del contenido del mismo.

### Selección del alimento:

Se analizaron un total de 21 muestras de sedimento correspondientes a 7 fracciones diferentes, con 3 réplicas de cada una. Esas 7 fracciones sirvieron para alimentar un total de 13 individuos, 8 machos y 5 hembras, cuyos contenidos estomacales fueron analizados. Los organismos o restos de organismos encontrados se clasificaron en las siguientes categorías: Diatomeas, Crustáceos (Ostrácodos, Copépodos, restos de Decápodos), Foraminíferos, Nematodos, Poliquetos y *Spartina*.

Las densidades de organismos fueron variables entre distintas muestras de sedimento pero los grupos presentes fueron los mismos y las proporciones relativas de cada uno similares. Las diatomeas fueron los organismos más abundantes, alcanzando valores entre 1261 y 14690 individuos/g sedimento, con un promedio de 5877 individuos/g sedimento, lo que representó entre 50 y 90% del total de individuos o restos contados de cada fracción de sedimento. Otros tres ítems, que siguieron en importancia a las diatomeas, alcanzaron densidades promedio similares: los restos de *S. densiflora* (714 partículas/g sedimento), nematodos (741 individuos/g sedimento) y crustáceos, principalmente ostrácodos y copépodos (824 individuos/g sedimento). A continuación estuvieron representados los foraminíferos con una densidad promedio de 333 individuos/g sedimento. Finalmente, el último ítem reconocido, y que estuvo representado en 5 de las 7 fracciones de sedimento analizadas, fueron los poliquetos, de los que sólo se registraron quetas o mandíbulas, con un número promedio de 45 partículas/g sedimento.

La estimación de los índices de electividad, evidenció una selección tanto positiva como negativa de algunos de los diversos elementos presentes en el sedimento.

No hubieron diferencias significativas para los índices de electividad entre sexos ( $P > 0,05$  en todos los casos), por lo que los datos fueron agrupados. Los porcentajes de *Spartina*, crustáceos y foraminíferos en los estómagos fueron mayores a los estimados para el sedimento y los correspondientes a nematodos y diatomeas, fueron menores (Fig. 2. 1). Los índices de electividad para cada ítem se muestran en la tabla 2. 1. El índice más alto corresponde a los crustáceos y luego le sigue el de foraminíferos; la electividad para los restos de *S. densiflora* y nematodos fueron muy cercanos a cero, y el de las diatomeas fue negativo (Tabla 2. 1).

## **Discusión**

La gran complejidad del aparato de alimentación de los decápodos actuales, que incluye, además de las mandíbulas y maxilas comunes a otros grupos de crustáceos, la adición de tres pares de maxilipedios y frecuentemente las quelas, en la manipulación del alimento, sin duda ha tenido un papel fundamental en el éxito de este grupo, al permitir una enorme diversificación de los modos de alimentación y los recursos utilizados (Garm y Høeg, 2001).

Si bien el objetivo de ésta parte del trabajo fue sólo observar el comportamiento general de alimentación y dista mucho de posibilitar una descripción morfológica detallada del uso de las diversas partes del aparato de alimentación, las grabaciones de video permitieron observar diferencias entre sexos respecto a la manipulación de las hojas de *S. densiflora* como alimento y similitudes respecto al sedimento. Estas diferencias se deben principalmente a la manera en que son utilizadas las quelas durante el proceso de alimentación. Cuando los cangrejos se alimentan de hojas, ambos sexos utilizan las quelas de diferente manera pero cuando se alimentan de sedimento, el mecanismo de captura del alimento es el mismo.

Las quelas o pinzas son consideradas un órgano “versátil” y “multifuncional” (Lee, 1995). Sus usos más importantes son el manipuleo de alimentos, las interacciones agonísticas, la competencia por (y el manipuleo de) la pareja (Lee y Seed, 1992; Negreiros-Fransozo y Fransozo, 2003) y la excavación. El dimorfismo sexual de la quela es una consecuencia de su amplio uso por el macho en combate, exhibición y cortejo. Las quelas de las hembras crecen con pequeñas tasas alométricas positivas; éstas las equiparán de buenas herramientas que les servirán tanto en contactos intra como interespecíficos, pero que de todas maneras no alcanzarán las proporciones de los machos (Hartnoll, 1974). Una quela más grande está generalmente equipada con fuertes músculos capaces de aplicar grandes fuerzas de palanca (Lee, 1995), y es por esto que las diferencias en la manipulación de las hojas de *S. densiflora* entre machos y hembras pueden deberse principalmente a características mecánicas.

El modo similar en que ambos sexos utilizan la quela durante la alimentación de sedimento sugiere que las diferencias en el tamaño de la quela afectan únicamente la cantidad de alimento que puede ser llevado a la boca.

La funcionalidad mecánica de las diversas piezas bucales está dada en gran medida por el tipo y disposición de setas presentes en cada una (Garm y Høeg, 2001). Los cangrejos del género *Uca* poseen en los segundos maxilipedios un conjunto de setas en forma de cuchara que, por una parte, previenen la ingesta de partículas inorgánicas gruesas y por otra raspan los granos de sedimento, liberando la materia orgánica adherida a ellos (Sayão-Aguiar et al., 2012); un mayor número de estas setas se traduce en una mejor eficiencia en la remoción de materia orgánica (puede llegar hasta un 88 %) (Lim, 2004; Sayão-Aguiar et al., 2012). Es así como estos cangrejos pueden alimentarse de elementos orgánicos tan pequeños como bacterias y diatomeas (< 0,1 mm).

El porcentaje relativo de los ítems de menor tamaño, como las diatomeas y los nematodos disminuyó considerablemente en el contenido estomacal de *N. granulata* respecto al porcentaje en el sedimento antes de ser ingerido; este hecho no sólo reflejaría la posible ausencia de setas del tipo cuchara en los maxilipedios de este cangrejo, sino también un mecanismo de filtrado del sedimento diferente al de *Uca* spp. El porcentaje relativo de los ítems de mayor tamaño (foraminíferos, crustáceos y trozos de *Spartina*; entre 0,4 y 4,7 mm), aumenta en el contenido estomacal. Entonces, durante el proceso de filtrado del sedimento, éstas partículas quedarían retenidas por las piezas bucales mientras que las partículas más finas podrían perderse por “lavado” dado el gran contenido de agua del sedimento.

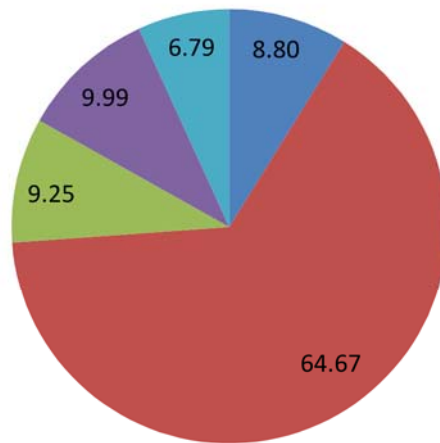
Más allá del mecanismo y la estructura fina de las partes bucales que permiten este tipo de alimentación, claramente *N. granulata* es capaz de extraer del sedimento del que se alimenta algunos de los ítems de mayor contenido de energía, enriqueciendo el contenido del estómago 5 veces en el número de crustáceos, 3 en el de foraminíferos y duplicando el número de trozos de hojas de *S. densiflora* en una sola ingesta. Esta capacidad podría ser suficiente para suplir las necesidades de N y energía para todas las funciones de los organismos, incluso de aquellos que habitan la marisma y se alimentan mayoritariamente de plantas, ya que el sedimento se halla también disponible y es consumido en cierta proporción en esos ambientes.

## **Figuras y tablas**

Índice linear de electividad					
	Nematodes	Diatomeas	<i>Spartina</i>	Crustáceos	Foraminíferos
Promedio	-0,055	-0,532	0,084	0,321	0,174
Desvío st	0,056	0,099	0,105	0,126	0,111

Tabla 2. 1. Índices de electividad para cada ítem presente en el sedimento. Valores negativos indican evitación o inaccesibilidad, valores cercanos a cero, alimentación aleatoria y valores positivos, preferencia.

### Sedimento



### Estómagos

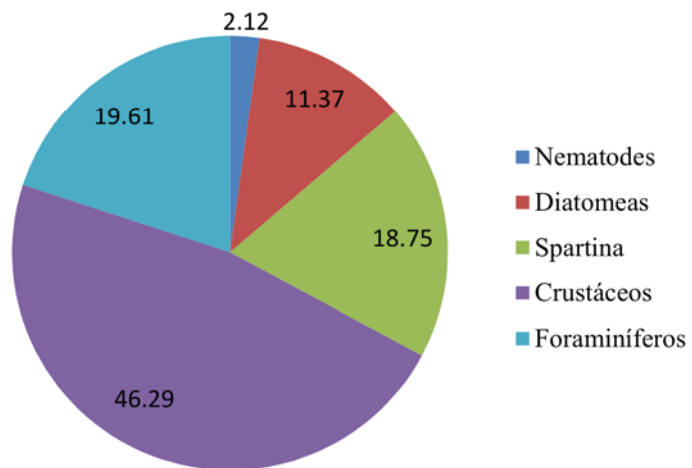


Fig. 2. 1. Composición porcentual de organismos en el sedimento antes (sedimento) y después (estómagos) de ser ingerido.

## Capítulo 3:

### Maduración gonadal

#### Introducción

El *fitness* de un organismo está determinado por cuán eficientemente obtiene, digiere y asimila nutrientes y cómo los utiliza para su mantenimiento, crecimiento, reserva y finalmente, reproducción (Begon et al., 2006).

Los costos reproductivos, al igual que los de crecimiento, pueden ser altos, por lo cual los organismos, en especial aquellos que viven en zonas templadas, con cambios estacionales marcados, deben sincronizar varias etapas de su ciclo de vida con períodos de disponibilidad de recursos (Karasov y Martínez del Rio, 2007)

La actividad reproductiva en los cangrejos incluye patrones de conducta y procesos fisiológicos que tendrán un impacto en el rendimiento general de los individuos involucrados (Hartnoll, 2006). Uno de estos procesos concierne a la alimentación y sus efectos sobre la reproducción. En las hembras de crustáceos por ejemplo, un fenómeno que en general se presenta es una restricción en la alimentación durante la incubación, dado que las hembras incubando a menudo se esconden, y esto reduce las posibilidades de alimentación (Hartnoll, 2006).

Las actividades reproductivas de un cangrejo hembra comienzan antes que la estación de reproducción, en relación con el crecimiento y desarrollo inicial de los ovocitos mediante la producción e incorporación de vitelo a los mismos (vitelogenesis). La vitelina es la principal proteína identificada en la mayoría de los ovocitos y la vitelogenina es su molécula precursora (Krol et al., 1992); en algunas especies de crustáceos, el material necesario para la vitelogenesis puede ser endógeno (sintetizado por los ovocitos) mientras que en otras especies, el crecimiento de los ovocitos involucra la contribución de material alóctono (sintetizado en otro órgano e incorporado por los ovocitos) (Krol et al., 1992). En malacostracos, la primera etapa de desarrollo del ovocito o vitelogenesis primaria, parece involucrar sólo moléculas sintetizadas en los ovocitos. La fase final o vitelogenesis secundaria, al menos en carideos y peracáridos, depende de la incorporación de material alóctono transportado por la hemolinfa (Nelson, 1991). Luego, los ovocitos son fecundados

y extruidos, los huevos se adhieren a las setas de los pleópodos y el desarrollo embrionario tiene lugar en una especie de cámara de incubación (Nelson, 1991).

Las respuestas reproductivas de los animales a cambios en los recursos nutricionales dependen parcialmente al tipo de ambiente en el cual se desarrollan (Karasov y Martínez del Rio, 2007). En el caso de la población de *N. granulata* en Mar Chiquita, un ambiente donde las condiciones favorables de reproducción no son continuas pero ocurren de una manera predecible, la época reproductiva comienza en el mes de septiembre junto con el comienzo de la primavera, continúa durante el verano y finaliza a principios de otoño (Spivak et al., 1994; Ituarte et al., 2004). Durante el otoño se produce una disminución de la actividad, presumiblemente asociada a la muda, mientras que durante el invierno la actividad es alta aunque no hay gastos asociados con la reproducción (Ituarte et al., 2004; Luppi et al., 2012).

Durante su ciclo reproductivo, las hembras de *N. granulata* de Mar Chiquita, mudan a principios del otoño, después de las últimas eclosiones larvales. Sin embargo, una nueva cohorte de ovocitos, que estaban en vitelogénesis primaria antes de la muda, completa la vitelogénesis secundaria después de mudar. Consecuentemente, los ovarios están completamente desarrollados durante todo el invierno (Ituarte et al., 2004).

Dada la gran cantidad de aporte de material (principalmente lípidos y proteínas) necesario para el desarrollo de los ovocitos durante la maduración gonadal, es esperable que esta etapa se vea influenciada por la cantidad y calidad de alimento que ingiere la hembra. Al mismo tiempo, considerando el bajo contenido de N presente en las hojas de *Spartina* spp., así como la baja calidad nutricional del sedimento (Capítulo 5 de esta tesis) sería esperable un efecto limitante del alimento sobre la reproducción de *N. granulata*. Por este motivo, el objetivo para este capítulo fue estudiar la madurez gonadal en hembras de *N. granulata* en relación con el tipo de alimento que consumen.

### **Materiales y métodos**

Este estudio fue hecho entre septiembre y noviembre de 2009 con cangrejos colectados en Mar Chiquita. Se colectaron hembras ovígeras y se determinó *in situ*, con una

lupa, el estadio de desarrollo de los embriones según la escala definida para la especie por (Bas y Spivak, 2000):

- 1: 100% del volumen ocupado por vitelo, sin estructuras discernibles.
- 2: dos comisuras blancas aparecen en un extremo, primera evidencia de embrión.
- 3: las comisuras se unen y forman una medialuna blanca, 90 a 95% del volumen ocupado por el vitelo.
- 4: empiezan a reconocerse primordios de apéndices, 80 a 60% de volumen ocupado por el vitelo.
- 5: aparecen los ojos como líneas rojizas, 50% del volumen ocupado por el vitelo.
- 6: la masa de vitelo es central, con forma de mariposa. Aparecen cromatóforos, los ojos empiezan a redondearse. Latido del corazón claro, 40% del volumen ocupado por el vitelo.
- 7: el vitelo del huevo forma dos masas centrales que ocupan 30% del volumen.
- 8: los movimientos de las larvas y los latidos son visibles. Ojos y cromatóforos completamente formados. Menos del 20% del volumen ocupado por el vitelo.
- 9: vitelo reducido a unas gotas, embriones listos para eclosionar.

Se seleccionaron setenta y cinco hembras con huevos en estado inicial (1-3), que fueron colectadas y mantenidas según lo especificado en la metodología general, se las mantuvo tres días sin alimento antes de iniciar los experimentos y se las dividió en cinco grupos de 15 individuos. Los grupos, según el tipo de alimento ofrecido, fueron los siguientes:

grupo control sin alimento (ayunados = A)

hembras alimentadas con:

- sedimento (S),
- sedimento + hojas de *S. densiflora* (S+H)
- con pellets ricos en proteínas (P) y
- con hojas de *S. densiflora* (H).

Las hojas y el sedimento fueron colectados según la metodología general, los pellets fueron preparados según (Fernández-Gimenez et al., 2009) con harina de pescado como fuente de proteína para lograr un contenido de 6.8 mg/ml de proteína.

Cada tipo de alimento fue suministrado diariamente desde el comienzo del experimento, aun cuando los datos respecto de la actividad de alimentación en condiciones naturales sugieren que las hembras ovígeras tienen una muy baja tasa de alimentación. El avance del desarrollo de los embriones fue seguido para cada grupo. Aquellas hembras que presentaban huevos próximos a eclosionar fueron separadas del grupo y puestas dentro de recipientes plásticos de 10 cm de diámetro x 9 cm de alto con la tapa superior reemplazada por una malla plástica de 1 mm de tamaño de poro, totalmente sumergidos en un acuario, con agua de la misma salinidad y temperatura. Ello permitía la salida de las larvas luego de la eclosión evitando su consumo por parte de las hembras. Ocurrida la eclosión, las hembras fueron devueltas a sus correspondientes acuarios, a los que se les agregaron dos machos para asegurar la fertilización de una nueva puesta de huevos. Se registró la fecha de eclosión de las larvas y de extrusión de la nueva puesta de huevos cuando existió. El experimento se siguió por un período de tres meses. Aquellas hembras que no extruyeron una nueva camada de embriones para el final del experimento, fueron sacrificadas y se tomaron los siguientes datos: estadio del ovario, peso seco del hepatopáncreas, de los ovarios y de la hembra. Los estadios de desarrollo de los ovarios fueron clasificados según (Ituarte et al., 2004) en las siguientes cinco categorías:

- 1: ovario filiforme y translúcido; gris claro,
- 2: ambos filamentos del ovario tubulares y angostos; naranjas, rojos o marrones,
- 3: ambos filamentos del ovario tubulares, más anchos pero sin diferencias entre la parte anterior y posterior; algunas veces granulares; de marrón a violeta,
- 4: la parte anterior expandida, aunque no cubre el estómago ni el hepatopáncreas; la parte posterior con ambos filamentos visibles; siempre granulares; de naranja a violeta oscuro,
- 5: todo el órgano expandido, cubriendo el estómago y el hepatopáncreas; siempre granular; de bordó a violeta oscuro.

Los índices gonodomáticos y hepatosomáticos (IGS y IHS respectivamente) fueron calculados como la relación entre el peso seco del órgano y el peso seco de todo el animal, incluyendo el órgano, y expresado como porcentaje.

#### Análisis estadístico:

Las diferencias de los tiempos de desarrollo promedio de los embriones y de los índices gonadosomáticos y hepatosomáticos entre los diferentes grupos fueron evaluadas con ANOVAs de una vía. El efecto del tipo de alimento sobre el desarrollo de los ovarios en hembras que no extruyeron sus huevos fue evaluado con  $\text{Chi}^2$ . Para esto se agruparon los estadíos 1 y 2 en “iniciales” y los estadíos 3 a 5 en “finales”. Se comprobó normalidad y homocedasticidad y se transformaron los datos cuando fue necesario. Se realizaron comparaciones pos-hoc con la prueba de Tukey cuando existió un efecto significativo del factor. En todos los casos, el nivel de significación se estableció como  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1979).

### **Resultados**

Si bien la tasa de alimentación no fue medida, se observó que las hembras se alimentaron tanto cuando estaban ovígeras como después de haber eclosionado sus larvas. Se encontraron diferencias en los tiempos de maduración gonadal, tiempos de eclosión, remaduración de ovarios, índices gonadosomáticos y hepatosomáticos en respuesta a la calidad del alimento. De todos los grupos, sólo los alimentados con proteína y con la mezcla de hojas + sedimento completaron la remaduración post-eclosión de los ovarios y extruyeron una nueva camada de embriones; los porcentajes de extrusión fueron de 44,4% y 12,5% para ambos grupos respectivamente. El tiempo promedio de desarrollo embrionario del grupo control no difirió del alimentado con sedimento y ambos fueron más largos que el de los otros tres grupos, a su vez iguales entre sí (Fig. 3. 1).

El test a posteriori del IGS no permitió separar claramente los grupos entre sí. El grupo de las hembras alimentadas con proteína tuvo un valor promedio cercano a 5 mientras que en el resto de los grupos los índices fueron menores (valores por debajo de 2) y similares entre sí (Fig. 3. 2a).

El mayor IHS fue el del grupo alimentado con proteína, siendo significativamente mayor al grupo control y al alimentado con sedimento ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3. 2b).

Si bien el resultado del análisis de los estadíos de desarrollo de los ovarios de las hembras que no finalizaron la remaduración no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $\text{Chi}^2$ ,  $P = 0,107$ ), ninguna hembra del grupo control superó la etapa inicial del

desarrollo, mientras que el 20% de las alimentadas con hojas, alrededor del 40% de las alimentadas con sedimento y con sedimento + hojas, y el 60% de las alimentadas con pellets ricos en proteína, tenían sus ovarios en la fase final de desarrollo (estadios 3 ó 4) al terminar el experimento (Fig. 3. 3).

### **Discusión**

Es evidente que una población estable de una especie, que se reproduce cada año exitosamente, cubre con su dieta natural sus requerimientos nutricionales. Cuando se estudia en el laboratorio el efecto de diferentes dietas, aun cuando éstas sean a primera vista similares a las naturales, difícilmente se estarán recreando todas las condiciones de la alimentación natural. En primer lugar, durante la primera parte del experimento, mientras las hembras estuvieron ovígeras, consumieron el alimento que les fue proporcionado, aún cuando en condiciones naturales se encontró que las hembras ovígeras prácticamente no se alimentaban (Capítulo 1). Si este comportamiento se relaciona con la evitación de condiciones de stress (por ejemplo predación y/o desecación), es posible que las condiciones estables del cautiverio sin estímulos externos y alimentación regular, favorecieran el cambio de comportamiento hacia un mayor consumo.

Por otra parte, la maduración gonadal en hembras de *N. granulata* fue afectada por la composición de las diferentes dietas ofrecidas en laboratorio. Cuando se comparan los valores de IGS e IHS de los distintos grupos con los reportados para la especie en condiciones naturales, se observa que la mayor parte de los IHS alcanzaron entre 1,2 y 2% en laboratorio, y son más bajos que los reportados tanto por Ituarte et al. (2004) como por Spivak et al. (2012) (entre 2 y 4 %), siendo el único valor comparable el correspondiente a las hembras alimentadas con alta proteína (alrededor de 3% de IHS). Por otra parte, los IGS son similares a los reportados por Ituarte (2004) y a los reportados por Spivak et al. (2012) para hembras con huevos en estadios I a III ( IGS alrededor de 1%), excepto el de las hembras alimentadas con alta proteína, el cual alcanzó un valor de 5%, similar al correspondiente a las hembras en reposo con ovarios en estadio 5 (Spivak et al., 2012). Es probable que la alimentación en laboratorio, donde se proveía el alimento una vez al día durante un período de una a dos horas, resultara restrictiva para las hembras produciendo

índices hepatosomáticos por debajo de los normales. En su medio natural, el alimento está accesible en cantidades ilimitadas al menos por períodos de algunas horas cada día (Capítulo 1). Sin embargo, la dieta rica en proteína sí cubrió los requerimientos aun cuando fue ofrecida durante el mismo período que los otros alimentos. Esto sugiere que la mala calidad de la dieta natural podría ser equilibrada al menos en parte con una mayor ingesta.

Los requerimientos nutricionales para la maduración gonadal varían entre especies (Stephens et al., 2007). Algunas diferencias en el nivel de lípidos y proteínas a lo largo de la maduración del ovario indican que algunas especies de cangrejos exhiben un proceso de maduración principalmente basado en lípidos, mientras que otras especies podrían tener requerimientos de proteína más elevados para una vitelogénesis exitosa (Hasek y Felder, 2005).

El bajo contenido de N que poseen las plantas demuestra ser un nutriente limitante para los organismos herbívoros ya que la energía (en la forma de C) está más disponible en las plantas (Mattson, 1980). Dada esta situación, un herbívoro debería, por lo tanto, maximizar la cantidad de nitrógeno en su dieta si es para crecer y reproducirse de manera óptima mediante la selección de alimentos ricos en nitrógeno (Kennish, 1996). El hecho de que el valor del IGS de las hembras alimentadas con proteína, cuyos ovarios aún no habían terminado de madurar (los más avanzados sólo habían alcanzado el estadio 3 ó 4), resultara similar a los máximos valores hallados en condiciones naturales, cuando todas las hembras presentan sus ovarios en estadio 5, sugiere que la proteína es limitante en condiciones naturales, y que las hembras podrían incorporar aún más N si éste estuviera disponible.

Mientras el IHS de las hembras alimentadas con altos niveles de proteína resultó un 55% más alto que el máximo valor alcanzado por los otros grupos en laboratorio, el IGS fue 150% más alto que el mayor de los otros grupos, lo que indica que, o bien la proteína se transfiere rápidamente del hepatopáncreas a los ovarios o bien es incorporada directamente por éstos a una tasa diferente.

Por su parte, dentro de los grupos que fueron alimentados con los elementos que usualmente ingiere *N. granulata* en su dieta natural, sólo aquellas hembras alimentadas con la dieta mixta (sedimento + hojas) pudieron llegar, aunque en una proporción mucho menor que las alimentadas con exceso de proteína, a una remaduración exitosa de sus ovarios y extruyeron una nueva camada de huevos. Este efecto de una dieta mixta sobre el *fitness*

también fue observado en *Grapsus albolineatus*, un cangrejo herbívoro, cuando el grupo alimentado con una dieta mixta (algas/carne), fue el único en alcanzar la maduración gonadal además de crecer y almacenar reservas, en comparación con cangrejos alimentados con una dieta pura de algas, comúnmente consumida por la especie (Kennish, 1996).

Es interesante notar que las hembras control y las alimentadas solo con hojas de *S. densiflora* también mostraron diferencias con los otros grupos en el tiempo de desarrollo de los embriones. Fernández et al. (2000) estudiaron el costo del cuidado parental activo en las hembras de algunos braquiuros y encontraron que existe una inversión sustancial de la hembra en el comportamiento de provisión de oxígeno a los embriones en desarrollo a través del batido abdominal y movimiento de las quelas. Es posible que el desarrollo más lento de los embriones incubados por las hembras con peor condición nutricional (IHS más bajos) se relacione con una disminución en la capacidad de cuidado general de los embriones.

Estos resultados junto con la capacidad de selección de ítems ricos en energía provenientes del sedimento descrita en el capítulo anterior, refuerzan la suposición que, independientemente de la zona de la marisma que ocupe, *N. granulata* alcanza a cubrir los requerimientos nutricionales básicos cuando combina los dos tipos de alimento.

## Figuras

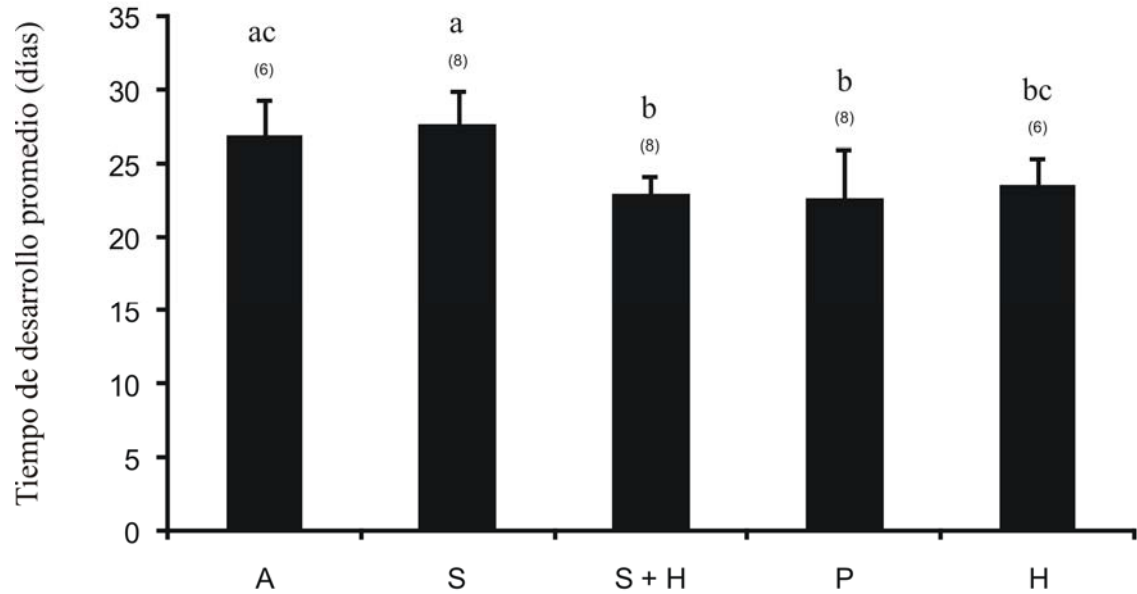


Fig. 3. 1. Duración promedio, en días, del desarrollo completo (desde estadio inicial hasta la eclosión) de los embriones de *Neohelice granulata* provenientes de hembras alimentadas con diferentes tipos de alimento. A: ayunadas, S: sedimento, S + H: sedimento + hojas de *S. densiflora*, P: alimento rico en proteínas y H: hojas de *S. densiflora*. Entre paréntesis, número de réplicas de cada grupo. Las diferencias significativas están indicadas por letras diferentes ( $\chi^2$ ,  $P < 0,05$ ).

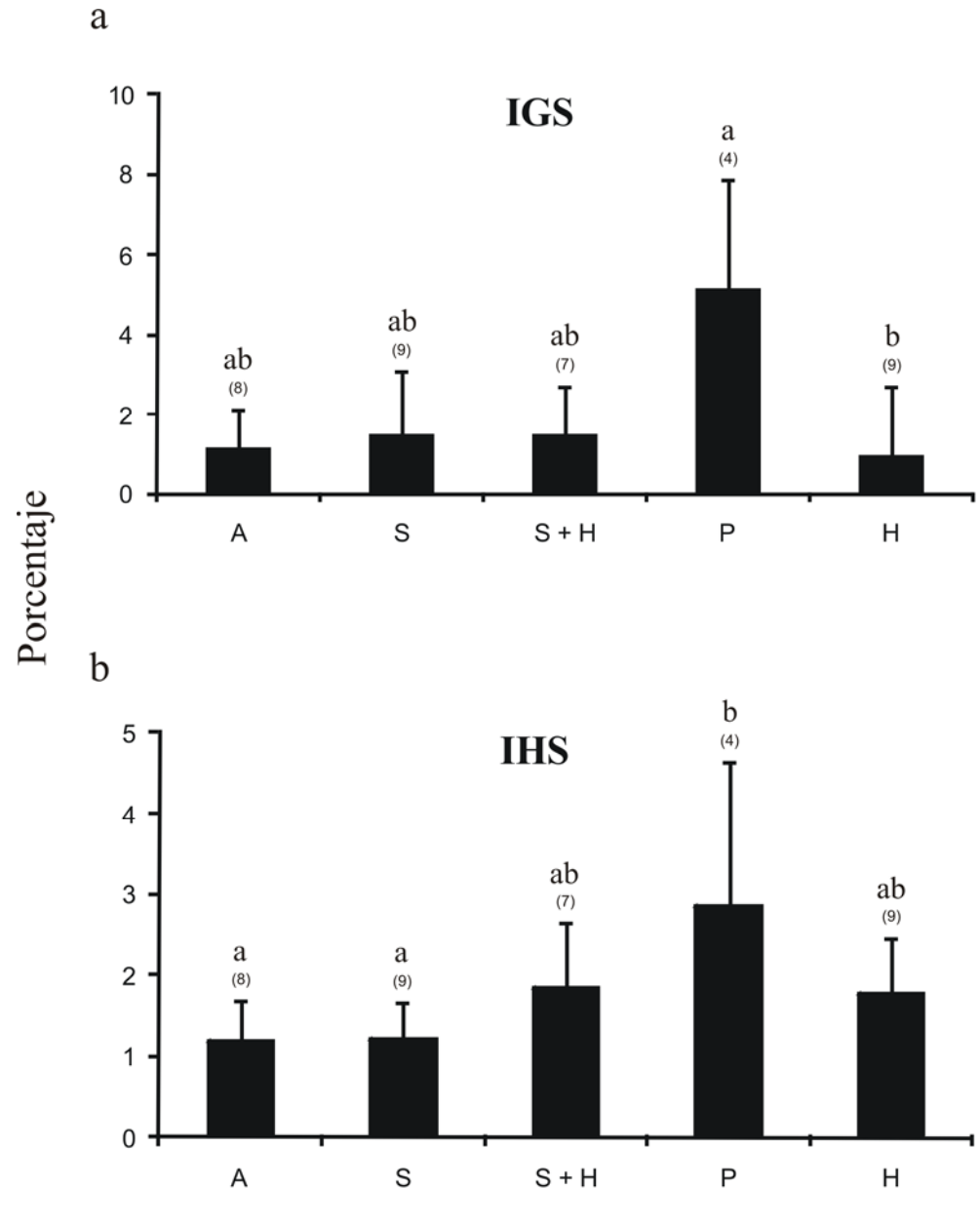


Fig. 3. 2. Índices a) gonodosomático y b) hepatosomático en hembras de *Neohelice granulata* alimentadas con diferentes tipos de alimento. A: ayunados, S: sedimento, S + H: sedimento + hojas de *S. densiflora*, P: alimento rico en proteínas y H: hojas de *S. densiflora*. Entre paréntesis, número de réplicas de cada grupo. Las diferencias significativas están indicadas por letras diferentes (Tukey,  $P < 0,05$ ).

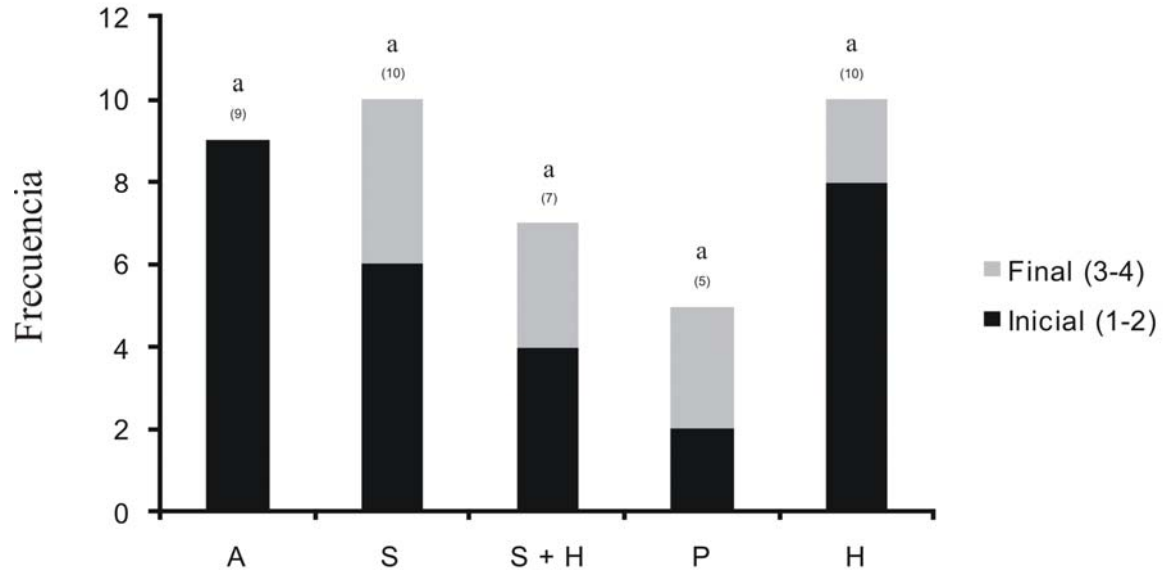


Fig. 3. 3. Estadío de desarrollo de los ovarios de hembras de *Neohelice granulata* que no extruyeron huevos al fin del período de experimentación, alimentadas con diferentes tipos de alimento. A: ayunados, S: sedimento, S + H: sedimento + hojas de *S. densiflora*, P: alimento rico en proteínas y H: hojas de *S. densiflora*. Entre paréntesis, número de réplicas de cada grupo. Las diferencias significativas están indicadas por letras diferentes (Tukey,  $P < 0,05$ ). Ninguna hembra alcanzó el estadío 5.

## **Sección B: Fisiología alimentaria de *Neohelice granulata***

La sección fisiológica estará comprendida por la evaluación de la presencia, y caracterización, de enzimas digestivas proteolíticas y celulolíticas en relación con el sexo y el microhábitat que ocupan los individuos, el cálculo del porcentaje de asimilación del alimento ingerido, la comparación de la composición proximal relativa de C y N del alimento y de las heces producidas y la estimación del tiempo de residencia de los principales ítems alimenticios en el aparato digestivo de *N. granulata* en función de la temperatura ambiente.

### **Introducción**

#### El sistema digestivo:

Los diferentes modos de alimentación se corresponden con modificaciones de la cabeza y apéndices asociados a la alimentación, los cuales hacen posible la evolución de una gran diversidad de sistemas digestivos animales (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Los crustáceos decápodos exhiben un amplio rango de hábitos alimentarios: predadores, herbívoros, detritívoros, carroñeros y filtradores (Barnes y Harrison, 1992). En una descripción sintética del aparato digestivo, la boca se abre vía un corto esófago a una gran cámara, el estómago cardiaco, el cual contiene un grupo de dientes que conforman el “molinillo gástrico”. La cámara cardiaca actúa como sitio de corte, molienda y es el lugar donde se produce la digestión inicial por las enzimas secretadas en el hepatopáncreas. Los productos de la degradación mecánica y enzimática pasan al pequeño estómago pilórico posterior, donde un complejo sistema de setas filtradoras permiten sólo el paso de partículas muy finas hacia el hepatopáncreas. La digestión es completada y la absorción tiene lugar dentro del hepatopáncreas. Los desperdicios sin digerir son eliminados a través del intestino posterior, o intestino (Barnes y Harrison, 1992). El sistema digestivo de los decápodos es una estructura compleja la cual presenta una gran variación interespecífica (Icely y Nott, 1992).

A continuación se hace una descripción detallada del origen, estructura y función de las tres regiones básicas del aparato digestivo de decápodos:

**Región anterior:** es de origen ectodérmico y está cubierto por cutícula. En él tienen lugar las primeras fases del ciclo digestivo, las cuales involucran: (1) degradación física del material ingerido por masticación, (2) degradación química del material ingerido por enzimas digestivas, (3) separación de las partículas finas y fluidos del material grueso por filtros, y (4) transporte de las partículas finas y fluidos para futuro tratamiento en el hepatopáncreas y transporte del material grueso vía intestino para una eventual defecación por el intestino posterior (Icely y Nott, 1992). Generalmente ocupa la mitad anterior del cefalotórax y está dividido en esófago, estómago cardiaco y estómago pilórico. La comida pasa desde las piezas bucales al esófago, un tubo simple extendido dorsalmente desde la boca hasta el estómago. Por debajo del epitelio del esófago, hay glándulas tegumentarias embebidas en el tejido conectivo. Estas glándulas probablemente sintetizan y producen mucus para lubricar el pasaje del material ingerido a través del “estómago”, el cual es un saco quitinoso de forma muy variable entre los decápodos. La región anterior del estómago, la cámara cardiaca es un saco espacioso en la mayoría de los decápodos con una variedad de estructuras internas que aparentemente facilitan la clasificación y masticación de la comida ingerida. La cámara pilórica está dividida en una porción superior que lleva directamente al intestino medio y una región ventral que lleva a una ampolla o glándula filtro la cual permite solo a las partículas más finas entrar a la glándula digestiva o hepatopáncreas. Ambas cámaras están compuestas por placas quitinosas u osículos, los cuales sobresalen al lumen a lo largo del eje anteroposterior como un par de dientes laterales opuestos que, en conjunto forman el molinillo gástrico. Los dientes exhiben una considerable diversidad morfológica (Felgenhauer, 1992; Icely y Nott, 1992).

**Región media:** es de origen endodérmico y tiene un epitelio glandular simple sin cutícula. El intestino es una región muy corta, de no más de un centímetro de largo en un cangrejo adulto grande (20 cm de ancho de caparazón). Ventralmente, a ambos lados del mismo, salen los ductos que comunican con el hepatopáncreas, la parte más importante de la región media, tanto en volumen como en complejidad. Además del intestino y este órgano, forman parte de esta región los ciegos anteriores y posteriores, pares. En esta región se lleva a cabo la última etapa del ciclo digestivo: (1) completar la degradación de

los productos enzimáticos recibidos desde el estómago; (2) producir y administrar enzimas al estómago; (3) absorber y procesar los productos enzimáticos tanto por transporte a la hemolinfa como por almacenaje en el intestino medio; y (4) remover material residual en la forma de heces.

Esta región está además involucrada en otros procesos tales como el mantenimiento de sales y el balance iónico, vitelogénesis, y cumpliendo roles inmunológicos en la remoción de cuerpos extraños del sistema circulatorio, y detoxificación de metales y sustancias orgánicas extrañas. Otras funciones asociadas a la digestión como la regulación del pH, y la activación enzimática han sido propuestas como funciones de los ciegos intestinales (Dall y Moriarty, 1983).

El hepatopáncreas o glándula digestiva es morfológicamente similar en la mayoría de los decápodos aunque el número de lóbulos puede variar entre las diferentes especies. Sus funciones son: (1) absorción de los productos dietarios digeridos; (2) producción de reservas minerales y sustancias orgánicas; (3) síntesis y secreción de enzimas digestivas; (4) metabolismo de lípidos y carbohidratos; (5) distribución de las reservas guardadas para el ciclo de intermuda y (6) catabolismo de compuestos orgánicos (Felgenhauer, 1992; García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996).

Los túbulos que conforman al hepatopáncreas están formados por cuatro tipos celulares básicos: E, F, R, y B (Felgenhauer, 1992; Icelly y Nott, 1992; García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996).

Las células E (en inglés embryonic cell o células embrionarias) son pequeñas células que se encuentran en el extremo ciego de los túbulos y presumiblemente originan los otros tres tipos celulares de la glándula. Están caracterizadas por tener un gran núcleo con un prominente nucléolo y usualmente carecen de un borde en cepillo.

Las células F (en inglés fibrillar cell o células fibrilares) tienen un núcleo basal y un retículo endoplasmático rugoso bien desarrollado dándole la apariencia fibrilar. Las mitocondrias y el aparato de Golgi también son abundantes y se ven como pequeñas vesículas por todo el citoplasma. Poseen un borde en cepillo prominente. Una amplia variedad de funciones han sido atribuidas a este tipo de células, tales como síntesis de proteínas y almacenamiento de minerales.

Las células R (en inglés *resorptive cell*) son del tipo más numeroso. Estas células altas y columnares están caracterizadas por un prominente borde en cepillo, un núcleo central y un gran número de vesículas de reserva en su citoplasma. Están involucradas en la absorción de la comida. Adicionalmente, comúnmente secuestran depósitos de minerales tales como calcio, magnesio, fósforo, azufre y otros.

Las células B (en inglés *blisterlike cell* o células en forma de ampolla) son células grandes, principalmente secretoras que están definidas por la presencia de una enorme vesícula rodeada por un denso citoplasma relleno con RER. El borde en cepillo puede estar reducido. Estas células son principalmente productoras de enzimas digestivas en el hepatopáncreas.

La secreción de una membrana peritrófica por parte del epitelio anterior del intestino medio es una función definida en muchos decápodos. En éste grupo, una membrana peritrófica cilíndrica es secretada por un anillo de células detrás del punto donde se abre el ducto de la glándula digestiva, y contiene las heces en un pellet de largo característico. La membrana es de un delicado material de baja densidad electrónica y permeable a grandes moléculas y también posiblemente a partículas submicroscópicas. La digestión y absorción del intestino medio puede por lo tanto continuar, particularmente cuando el intestino medio es largo. Se piensa que la membrana peritrófica protege al estómago del material abrasivo en las heces, pero la necesidad de esta función nunca pudo ser demostrada, y la membrana podría ser solamente una ayuda para una defecación eficiente. Usualmente la membrana se desintegra muy temprano después de su egestión (Dall y Moriarty, 1983).

**Región posterior:** al igual que la región anterior, es de origen ectodérmico y está cubierta por cutícula. Transporta el material de desecho hacia el exterior. Es un tubo cuticular simple, el lumen al final posterior del intestino termina en un ano que se abre en la superficie del exoesqueleto por debajo del telson. La característica más sobresaliente del intestino posterior es la presencia de escamas cuticulares o grupos de espinas. Estas modificaciones cuticulares siempre dirigen sus espinas en dirección al ano y presumiblemente ayudan en el movimiento de la masa fecal a través del mismo (Felgenhauer, 1992). El intestino posterior está morfológicamente adaptado para resistir

grandes cambios de volumen y las contracciones de la defecación, la cual es asistida por movimientos peristálticos que bombean agua dentro del intestino posterior. La acción de bombeo junto con la toma de fluidos es importante para lubricar el pasaje de la comida dentro del intestino y mantener la turgencia de todo el tubo. Hay músculos que pueden contraer pero no expandir el volumen del lumen del tubo. Existe evidencia que el epitelio del intestino posterior está involucrado en el transporte de iones (Icely y Nott, 1992).

Covelo de Zolessi y Spiritoso (1985) describieron en detalle la morfología del aparato digestivo de *N. granulata*, incluyendo todos los dientes que conforman el molinillo gástrico.

### Enzimas digestivas:

#### 1. Proteasas (o proteinasas)

La digestión bioquímica es realizada por las enzimas digestivas que son secretadas en el hepatopáncreas (García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996). Este produce un amplio rango de enzimas: endopeptidasas tales como la tripsina y quimotripsina y exopeptidasas tales como las carboxipeptidasas y aminopeptidasas. Dado su origen común, las mismas proteinasas están presentes en el jugo gástrico como así también en el hepatopáncreas y generalmente las actividades son más altas en el fluido gástrico que en el tejido del hepatopáncreas (Navarrete del Toro et al., 2006). Los crustáceos no son capaces de sintetizar 10 de los 20 aminoácidos necesarios para construir sus propias proteínas. Estos aminoácidos se denominan esenciales y deben ser adquiridos con la dieta (García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996).

Las proteasas están involucradas en el metabolismo general a través de la modificación de proteínas, tal como ocurre en la digestión de las proteínas de los alimentos, la movilización de proteínas tisulares, neuropéptidos, hormonas y el procesamiento de proenzimas. Dentro de las proteasas, tenemos a aquellas enzimas denominadas peptidasas o exoproteasas que cortan la unión peptídica en el grupo amino terminal (aminopeptidasas) o en el carboxilo terminal (carboxipeptidasas). Las enzimas que hidrolizan uniones peptídicas

en el centro del péptido se denominan proteinasas o endoproteasas (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997).

La mayoría de las proteinasas y peptidasas pertenecen al grupo de las serin-proteinasas, tal es el caso de la tripsina y la quimotripsina. La tripsina hidroliza uniones peptídicas donde el residuo ácido carboxílico es un aminoácido catiónico tal como la Arginina o Lisina. La quimotripsina hidroliza uniones peptídicas en el ácido carboxílico de los aminoácidos aromáticos tales como Fenilalanina, Tirosina y Triptófano (García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996).

Las tripsinas son los efectores principales en la red de funciones enzimáticas, ya que su activación es el primer paso en una serie de reacciones consecutivas, en la que la función de múltiples proteinasas de diferentes clases es parte de un proceso fisiológico coordinado. Presentan características específicas para cada especie ya que existen grandes diferencias en los hábitos alimenticios, composición de la comida ingerida y diferencias en los procesos de digestión de proteínas acordes a los requerimientos de cada una. Estas diferencias son respuestas adaptativas a diferentes estilos de vida, ambientes y en mayor medida, diferentes habilidades de supervivencia entre especies. Sin embargo, las tripsinas comparten algunas características generales principalmente relacionadas con sus rasgos catalíticos (masa molecular, pH óptimo, sensibilidad a inhibidores) (Muhlia-Almazán et al., 2008).

A diferencia de las demás enzimas, las proteinasas carecen de especificidad hacia un sustrato. Ellas reconocen el lado carboxílico de un aminoácido formando una unión peptídica sin importar a que proteína pertenezca. Es por esto que su actividad puede ser evaluada usando sustratos sintéticos. La identidad de una proteinasa se descubre utilizando moléculas específicas. Estas moléculas son: (1) sustratos sintéticos, (2) inhibidores y (3) quelantes. Utilizando una combinación de estas moléculas específicas es posible clasificar una proteasa (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997).

Usualmente los sustratos sintéticos están formados por (1) un aminoácido, para el cual la enzima es específica (por ejemplo, BAPNA y SAPNA), (2) un grupo bloqueador del lado amino del aminoácido y (3) un grupo reportero formando una unión peptídica virtual para hidrolizar.

Los inhibidores son sustancias que alteran la actividad de una enzima combinándose con ésta de manera tal que influyen en su enlace con el sustrato (Carrillo y González, 2000). Estas sustancias reaccionan con el centro activo de la enzima reduciendo su capacidad de unirse e hidrolizar el sustrato. Hay dos clases de inhibidores: (a) los de sitio activo específico, inhibidores de peso molecular bajo los cuales irreversiblemente modifican el residuo aminoácido del centro activo de la enzima y (b) inhibidores naturales, los cuales son pseudo sustratos. (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). El PMSF es un inhibidor reconocido de las serinoproteasas tales como la tripsina y la quimotripsina, las cuales son las principales enzimas digestivas de proteínas en invertebrados pertenecientes al Phylum Arthropoda (García-Carreño, 1992).

Dado que la síntesis y almacenaje de proteinasas activas impone un riesgo de daño tisular por autohidrólisis proteica, los organismos deben poseer un mecanismo de control de la activación antes de ser utilizadas. Esto se logra a través de un complejo sistema que involucra control de la síntesis, transcripción y translación, almacenaje, secreción y activación de zimógenos (Muhlia-Almazán et al., 2008). Los polipéptidos con actividad inhibidora de proteasas forman parte de los complejos mecanismos de control y regulación en los seres vivos, al impedir la proteólisis no deseada. Su presencia en animales, vegetales y microorganismos sugiere un papel importante relacionado con procesos vitales como la defensa del organismo, reproducción y otros (Carrillo y González, 2000). Otro método natural de control de la actividad proteínasa es mediante la síntesis de una forma inactiva de la enzima, el zimógeno. En este mecanismo de control, una proenzima es sintetizada con anterioridad, esperando por la activación después del ingreso de comida al sistema digestivo. Los zimógenos son usualmente activados por la acción de otras proteinasas en el sistema digestivo y también durante los procesos fisiológicos regulatorios (García-Carreño y Hernández-Cortés, 1996; Carrillo y González, 2000; Muhlia-Almazán et al., 2008).

Las formas múltiples de una enzima son llamadas isoenzimas y catalizan la misma reacción. Estas pueden encontrarse en la misma especie, el mismo tejido o en la misma célula. Las diferentes formas generalmente difieren en propiedades regulatorias o cinéticas en la distribución subcelular y tienen por lo general, secuencias aminoacídicas similares pero no idénticas (Carrillo y González, 2000).

Aunque funcionalmente son similares a las serinproteasas de los vertebrados, existen profundas diferencias que han sido reportadas para las serinproteasas de insectos y crustáceos. Estas diferencias radican en la especificidad por el sustrato y los efectos de los inhibidores sintéticos de serin-proteinasas de vertebrados conocidos. En general, las tripsinas de los crustáceos decápodos poseen puntos isoeléctricos menores que los de las enzimas bovinas respectivas y son resistentes a la autodigestión (Dall y Moriarty, 1983; vonElert et al., 2004). Los estudios realizados muestran un alto grado de similitud en la estructura tridimensional y en la actividad entre las tripsinas de invertebrados y vertebrados sugiriendo que las tripsinas aparecieron antes que los invertebrados y los vertebrados divergieran (Muhlia-Almazán et al., 2008).

Se ha reportado que el fluido estomacal en la mayoría de los crustáceos es un poco ácido, usualmente en el rango de pH 5-7. Muchas enzimas digestivas muestran una actividad óptima dentro o cerca de este rango, pero algunas, como las de tipo tripsina, tienen pH óptimos más alcalinos. El pH óptimo de una enzima es influenciado por la naturaleza del centro activo, la naturaleza del sustrato, y la composición iónica del medio (Dall y Moriarty, 1983).

## 2. Celulasas

La celulosa y la hemicelulosa forman parte de las paredes de las células vegetales y son los carbohidratos estructurales principales de las plantas. La celulosa es hidrolizada a glucosa por enzimas denominadas celulasas y la hemicelulosa es a su vez hidrolizada por un complejo grupo de hemicelulasas incluyendo laminarinasas, liquenasas y xilanasas. La digestión de la celulosa y hemicelulosa involucra en primera instancia una fragmentación mecánica por parte del cangrejo antes de la ingestión, para aumentar así la superficie de acción en la hidrólisis enzimática. En dicha fragmentación intervienen tanto las quelas como las piezas bucales y el molinillo gástrico.

Las celulasas pueden tener dos funciones en la digestión: (1) convertir celulosa en glucosa como fuente de energía; (2) permitir a otras enzimas digestivas penetrar en la pared celular de las plantas (Dall y Moriarty, 1983). Generalmente se reconocen tres clases de enzimas celulolíticas: endoglucanasas [Comisión de Enzimas (CE) 3.2.1.4], exoglucanasas

(CE 3.2.1.74 y 3.2.1.91), y  $\beta$ -glucosidasas (CE 3.2.1.21). El primer grupo, hidroliza al azar enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos a lo largo de la cadena de celulosa; las exoglucanasas, hidrolizan el extremo no reductor de las cadenas de celulosa liberando unidades de celobiosa y finalmente las  $\beta$ -glucosidasas, hidrolizan celobiosa a glucosa desde los extremos no reductores (Martín, 1991; Watanabe y Tokuda, 2001; 2010).

Muchos microorganismos pueden vivir en materiales de celulosa. En contraste, se creía que la mayoría de los animales no la pueden utilizar como fuente de energía. Sin embargo, una reciente y creciente evidencia indica que las enzimas celulolíticas se distribuyen en una amplia gama de animales eucariotas (más de 300 especies de animales repartidos en 11 clases y 5 phyla (Arthropoda, Mollusca, Annelida, Echinodermata y Chordata) (Watanabe y Tokuda, 2001; Lo et al., 2003; Davison y Blaxter, 2005). En consecuencia, podría haber sido un rasgo evolutivo presente en el momento de pre-colonización de la tierra por los cangrejos, dando la beneficiosa habilidad de digerir celulosa en las etapas tempranas de la invasión de los hábitats terrestres (Linton y Greenaway, 2007).

Los primeros estudios en enzimas celulolíticas animales fueron hechos en caracoles de tierra y a partir de entonces, la digestión de celulosa en insectos, principalmente termitas, ha sido estudiada extensivamente (Watanabe y Tokuda, 2010). La herbivoría en crustáceos, y principalmente en cangrejos marinos y terrestres, es un fenómeno conocido que ha tomado gran interés en las últimas décadas (Warner, 1977). Algunos cangrejos obtienen claramente la mayoría de sus componentes nutricionales a partir del consumo de plantas aunque la herbivoría se da también en especies consideradas como carnívoras (Wolcott y O'Connor, 1992).

Hasta el presente, los mecanismos de digestión de la celulosa por cangrejos terrestres y semiterrestres no están claros. Mientras la producción endógena de endo 1,4-glucanasa ha sido demostrada en algunas especies, la posible producción de las otras celulasas 1,4-glucosidasa y celobiohidrolasa necesita ser investigada (Linton y Greenaway, 2007). Por otra parte, si bien se conoce que algunas especies son capaces de utilizar y degradar metabolitos secundarios de las plantas, conocidos como taninos, y que pueden ser disuasivos de la digestión, los mecanismos por los cuales esto se logra permanecen sin ser dilucidados (Linton y Greenaway, 2007).

### 3. Amilasas

Otra enzima carbohidrasa importante y ampliamente extendida entre los crustáceos, la  $\alpha$ -amilasa, es responsable de la degradación parcial de almidón y su actividad se ha demostrado en todos los organismos investigados (Dall y Moriarty, 1983).

## Capítulo 4:

### **Diferencias adaptativas en la actividad enzimática digestiva en el cangrejo *Neohelice granulata* en relación al sexo y al hábitat**

#### **Introducción**

El patrón de alimentación de los cangrejos en el medio natural incluye herbívoros, carnívoros, sedimentívoros, carroñeros y en algunas ocasiones, filtradores, aunque la mayoría de ellos tienen la capacidad para afrontar una gran variedad de dietas y se los podría considerar como "omnívoros oportunistas" (Warner, 1977). Diferentes tipos de comida (por ejemplo, animales enteros con diferentes partes esqueléticas, carroña, macroalgas, microalgas silíceas, plantas vasculares, etc.) requieren diferentes estrategias de procesamiento digestivo (diferentes tratamientos mecánicos, enzimas, tiempo de digestión, etc.) y la comprensión del proceso digestivo constituye un puente mecanístico entre los procesos fisiológicos que se producen en el tracto digestivo, la alimentación y la ecología nutricional (Karasov y Martínez del Río, 2007).

Ha sido ampliamente confirmado que las enzimas digestivas en los crustáceos se sintetizan en la glándula digestiva (hepatopáncreas) y posteriormente se liberan al estómago formando el jugo gástrico (Icely y Nott, 1992). Además, el perfil de las enzimas digestivas de los crustáceos decápodos varía en función de sus estrategias particulares de alimentación (Figueiredo y Anderson, 2009). Por ejemplo, las especies carnívoras, cuyas dietas están predominantemente compuestas de proteínas, pueden producir altos niveles de enzimas proteolíticas tales como la tripsina y la quimotripsina. Las especies omnívoras expresan actividades proteinasas y carbohidrasas, mientras que los herbívoros muestran altas actividades de enzimas celulasas y hemicelulasas, ya que ingieren grandes cantidades de hidratos de carbono de las paredes celulares de las plantas (Johnston y Freeman, 2005; Linton et al., 2009).

Muchos cangrejos terrestres y semiterrestres son principalmente herbívoros y detritívoros, a pesar de que pueden actuar como depredadores no especializados o comer carroña siempre que les sea posible (Wolcott y O'Connor, 1992). La alimentación

oportunista de estos cangrejos los hace modelos adecuados para examinar la hipótesis de modulación adaptativa. Sobre la base de la suposición de que la selección natural actúa para maximizar la ganancia neta de energía, esta hipótesis predice que las características de la fisiología digestiva están flexiblemente adaptadas a la dieta predominante, por lo que se podría esperar una relación positiva entre los niveles (incluyendo la cantidad y la estructura) de hidratos de carbono, proteínas y lípidos de la dieta natural y la presencia o cantidad de las enzimas intestinales necesarias para la digestión (Karasov y Diamond, 1988; Karasov y Martínez del Rio, 2007). Como consecuencia de ello, podrían aparecer diferencias intraespecíficas en las enzimas digestivas como resultado de la variable disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, diferencias de microhábitat). Además, dado que los cangrejos se diferencian en las necesidades energéticas entre sexos (por ejemplo, las hembras pueden alimentarse más que los machos, debido a mayores requerimientos de energía en la ovogénesis (Cannicci et al., 1996); también pueden aparecer diferencias intraespecíficas en las enzimas digestivas como resultado de las diversas necesidades individuales.

Los objetivos de este estudio son dos: detectar diferencias relacionadas al sexo en las enzimas digestivas presentes en la glándula digestiva de *N. granulata* y refinar los resultados previos concernientes a diferencias entre microhabitats (cangrejos de la marisma vs planicie de marea) de éstas enzimas. Para alcanzar el primer objetivo, se comparó la actividad específica de enzimas proteolíticas, celulolíticas y amilolíticas entre machos y hembras colectados en invierno, cuando los machos se encuentran en un período de descanso post-reproductivo, mientras que las hembras, que no se alimentan cuando son ovígeras durante el período estival, están desarrollando sus ovarios y se preparan para la próxima temporada reproductiva (Ituarte et al., 2006). Para lograr el segundo objetivo, se midió la actividad específica de las mismas enzimas en cangrejos recolectados en la marisma y en la planicie de marea, ayunados por 5 días y luego alimentados con *S. densiflora* y sedimento del hábitat natural, respectivamente, con el fin de estar seguros de la calidad del alimento ingerido.

## **Materiales y métodos**

### **Recolección de los cangrejos y preparación de la comida**

El presente estudio se llevó a cabo con cangrejos de la laguna Mar Chiquita. Con el fin de maximizar la homogeneidad entre las muestras utilizadas en los experimentos, los cangrejos fueron capturados en invierno, cuando están en reposo post-reproductivo y todas las hembras presentan la misma fase de desarrollo ovárico (Ituarte et al., 2006). Se seleccionaron cangrejos en intermuda según Drach y Tchernigovtzeff (1967) y sólo se utilizó un pequeño rango de tamaño de adultos. Veinte hembras ( $23,5 \pm 2,8$  mm de ancho de caparazón, AC) y 20 machos ( $26,5 \pm 2,8$  mm AC) fueron colectados de cada hábitat (marisma y planicie de marea) y mantenidos según lo especificado en la metodología general. Todos los animales se mantuvieron cinco días sin comer para asegurarse que los estómagos estuviesen vacíos antes de comenzar los experimentos. El alimento ofrecido fue obtenido y conservado según lo especificado en la metodología general.

### **Alimentación de los animales y extracción del hepatopáncreas**

La glándula del intestino medio se utilizó para evaluar la actividad enzimática, en vez de los jugos gástricos en el estómago, lo que nos ofrece la simplicidad de la extracción y la posibilidad de obtener mayores volúmenes.

Después de cinco días de ayuno, 10 machos y 10 hembras recogidos de la marisma se alimentaron durante una hora (entre 12 AM y 1 PM) con las hojas y otros 10 machos y 10 hembras continuaron sin alimentarse como grupo de control. De manera similar, 10 machos y 10 hembras recogidos de la planicie de marea fueron alimentados con sedimento durante una hora (paralelamente con el grupo anterior), y un grupo similar se mantuvo sin alimentarse como control. Este período de alimentación es suficiente para garantizar el llenado del estómago del cangrejo (Lancia, observación personal). Ambos tipos de comida se ofrecieron según lo especificado en la metodología general, obteniéndose cuatro grupos; machos y hembras alimentados de sedimento (MS y HS respectivamente) y machos y hembras alimentados con hojas de *S. densiflora* (MH y HH respectivamente).

Todos los individuos (alimentados y los controles ayunados) fueron crioanestesiados y rápidamente se los mató mediante la introducción de pinzas en el vientre

del cefalotorax. Para extraer el hepatopáncreas, se abrió caparazón dorsalmente y se quitaron los órganos con unas pinzas, luego se lo colocó en microtubos en hielo y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los estómagos de los individuos alimentados fueron controlados en su contenido estomacal y solo se utilizaron aquellos que tuvieran al menos la mitad de su volumen lleno.

### Ensayos bioquímicos

Inicialmente, se evaluó la actividad enzimática individual en diez hepatopáncreas de cangrejos de cada tratamiento con el fin de determinar la variabilidad entre ellos. Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la actividad enzimática entre individuos del mismo tratamiento (test de t, todos los valores  $P > 0,05$ ) y el pequeño tamaño de los mismos (y en consecuencia el poco volumen de hepatopáncreas obtenido), todos los hepatopáncreas del mismo grupo experimental se agruparon para asegurar suficiente material para todos los análisis, se homogeneizaron con agua destilada fría (1:3 p/v) y se centrifugaron durante 30 min (10 000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ ) de acuerdo con Fernández-Gimenez et al. (2002). Las mediciones de todos los ensayos se hicieron por triplicado. La proteína soluble, usada como referencia para expresar la actividad enzimática específica, se evaluó en el sobrenadante (Bradford, 1976); se utilizó seroalbúmina bovina como estándar ( $1\text{ mg ml}^{-1}$ ).

Antes de realizar cada ensayo de actividad, el pH y la concentración de sustrato óptimos fueron determinados para la actividad específica celulasa,  $\beta$ -1,4-glucosidasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, amilasa y proteinasa.

#### pH óptimo:

El pH óptimo de las celulasas fue medido en un rango de pH de 4-9. Para valores de pH de 4 y 5,5, se utilizó buffer acetato y buffer Tris para los valores de pH 7-9 (Linton y Greenaway, 2004). Las concentraciones óptimas de sustrato fueron determinadas antes de realizar cada ensayo de actividad. El pH óptimo de la actividad proteasa se evaluó utilizando azocaseína al 1% como sustrato en buffers universales de pH 4-10 (Stauffer, 1989).

#### Actividad celulasa:

La actividad celulasa específica y las actividades de  $\beta$ -1,4-glucosidasa (celobiasa; EC 3.2.1.21) y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) fueron evaluadas de acuerdo a Linton y Greenaway (2004). Las reacciones e incubaciones se llevaron a cabo a 40 °C en microtubos de 1,5 ml en un baño termal con agitación para permitir la comparación con las actividades celulasas de otros invertebrados. Los azúcares reductores se determinaron con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) modificado de Miller (1959). Se obtuvo una curva estándar usando diferentes concentraciones (0 a 20 mg ml<sup>-1</sup>) de glucosa al 1%.

La actividad celulasa específica se midió como la tasa de producción de glucosa a partir de celulosa microcristalina (Sigmacell 20, Cat. N° S3504, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EE.UU). Los homogenatos (50  $\mu$ l) se mezclaron con 100  $\mu$ l de celulosa microcristalina al 2% (p/v) en solución buffer acetato 100 mM, pH 5.5. La suspensión de celulosa se realizó por agitación de la celulosa stock inmediatamente después de pipetear. Un blanco (50  $\mu$ l de homogenato + 100  $\mu$ l de buffer) se preparó para cada muestra analizada para permitir la corrección debido a la absorbancia del homogenato a la longitud de onda medida. El buffer utilizado fue acetato 100 mM, pH 5,5. La mezcla se incubó y se agitó durante 60 min a 40 °C en un baño térmico, la reacción se detuvo mediante la adición de 25  $\mu$ l de ácido tri-cloro acético (TCA) 0,3 M. El exceso de ácido se neutralizó con 5  $\mu$ l de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5 M y la mezcla de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. La concentración de azúcares reductores se determinó en una alícuota de 100  $\mu$ l del sobrenadante mezclado con agua destilada y el reactivo DNS [DNS 2 mM en NaOH 0.2 N, Tartrato sodio potasio tetrahidratado 2,12 M; Vega-Villasante et al. (1993)] hasta completar 1 ml de solución, la mezcla fue agitada y colocada en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos y luego enfriada con agua corriente hasta temperatura ambiente. Se agregó agua destilada (5 ml) y se leyó la absorbancia a 540 nm. Los valores de absorbancia se tradujeron luego a concentración de glucosa utilizando el gráfico estándar obtenido anteriormente.

La actividad  $\beta$ -1,4-glucosidasa específica se midió como la tasa de producción de glucosa a partir de celobiosa (Cat. N°. C-7252, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EE.UU). El homogenato (25  $\mu$ l) se mezcló con 25  $\mu$ l de buffer acetato 100 mM (pH 5,5) y 50  $\mu$ l de celobiosa 14,61 mM en el mismo buffer y la mezcla se incubó a 40 °C durante 30

min. La reacción fue detenida mediante la adición de 25  $\mu\text{l}$  de TCA 0,3 M y el exceso de ácido se neutralizó con 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2,5 M. La proteína precipitada se sedimentó por centrifugación durante 10 min a 10000 g. Los blancos contenían 25  $\mu\text{l}$  de homogenato + 75  $\mu\text{l}$  de buffer. La concentración de azúcares reductores se determinó en una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante por el método de DNS como se describió para la actividad celulasa específica.

La actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa específica se midió como la tasa de producción de azúcares reductores a partir de carboximetil celulosa como sustrato (Cat. Sigma. N°. C-5678, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EE.UU). El homogenato (20  $\mu\text{l}$ ) se mezcló con 80  $\mu\text{l}$  de buffer y 100  $\mu\text{l}$  de carboximetilcelulosa 2% (p/v) en el mismo buffer. Los blancos contenían 20  $\mu\text{l}$  de homogenato y 180  $\mu\text{l}$  de buffer. El buffer fue de acetato 100 mM, pH 5,5. Las muestras y los blancos se incubaron a 40 °C durante 10 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 25  $\mu\text{l}$  de HCl 0,3 M. El exceso de ácido se neutralizó con la adición de 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  2,5 M y la mezcla de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g. Los azúcares reductores producidos se midieron por el método de DNS como se describió antes.

La actividad amilasa específica se midió siguiendo a Bernfeld (1951) modificado por Vega-Villasante et al. (1993) como la tasa de producción de glucosa a partir de almidón como sustrato. El homogenato (10  $\mu\text{l}$ ) se mezcló con 490  $\mu\text{l}$  de buffer acetato 50 mM (pH 5,5) y 500  $\mu\text{l}$  de almidón al 1% (disuelto en buffer). La mezcla se incubó a 30 °C durante 20 min. Los blancos contenían 10  $\mu\text{l}$  de homogenato y 990  $\mu\text{l}$  de buffer. La mezcla de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g, y la glucosa producida durante la incubación se midió por el método de DNS como se describió antes. Las actividades enzimáticas fueron expresadas como  $\mu\text{g}$  de glucosa  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### Actividad proteinasa:

La actividad proteolítica específica se analizó utilizando azocaseína al 1% en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Triplicados de 5  $\mu\text{l}$  de los extractos enzimáticos se mezclaron con 0,5 ml de solución buffer y 0,5 ml de sustrato y se incubaron durante 10 min a 25 °C. La proteólisis fue detenida con la adición de 0,5 ml de TCA al 20%, la mezcla se centrifugó a

14 000 g durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se registró a 366 nm (García-Carreño, 1992).

Las actividades específicas de tripsina y quimotripsina de los cangrejos controles no pudieron ser evaluadas y sólo aquellas de los cangrejos alimentados se evaluaron midiendo la tasa de hidrólisis de los sustratos sintéticos. La actividad específica de tripsina se midió utilizando *N*-benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida (BAPNA) como sustrato específico. Se disolvió BAPNA (1 mM) en 1 ml de dimetilsulfóxido y se ajustó a 100 ml con buffer Tris-HCl, pH 7,5 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM. Se agregaron triplicados de muestras de hepatopáncreas (5 $\mu$ l) a 0,75 ml de solución de sustrato a 37 ° C y los cambios en la absorbancia a 410 nm se registraron a intervalos de 30 segs. durante 10 minutos (Erlanger et al., 1961). La actividad específica de quimotripsina se evaluó utilizando succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (SAPNA) 0,1 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, que contenía  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Triplicados de muestras de hepatopáncreas (5 $\mu$ l) fueron agregados a 0,75 ml de solución de sustrato a 37 ° C y los cambios en la absorbancia a 410 nm se registraron a intervalos de 20 segs. durante 5 minutos (del Mar et al., 1979). Fueron utilizados agua y enzimas comerciales (1 mg ml<sup>-1</sup>) como blancos y controles internos respectivamente. Las actividades enzimáticas específicas fueron expresadas como el cambio de absorbancia min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína de la enzima utilizada en los ensayos ( $\Delta$  Abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína).

#### Caracterización de las proteínas:

La separación de las proteínas a partir de preparaciones enzimáticas fue realizada con extractos de especímenes alimentados con hojas y con sedimento por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) según Laemmli (1970). Un volumen de la preparación enzimática conteniendo 20  $\mu$ g de proteína se mezcló con un volumen de buffer de la muestra, se cargó en cada calle y la electroforesis se llevó a cabo a 4 ° C en una cuba vertical a 20 mA. Después de la corrida, los geles se sumergieron en una solución conteniendo 40% de metanol, 7% de ácido acético y 0,05% de azul brillante de Coomassie R-250 durante 24 hs. Después de este período de tinción, los geles se destiñeron con la misma solución sin el colorante.

La actividad proteinasa en PAGE se estudió después de la separación de las proteínas por el sustrato-SDS-PAGE (García-Carreño y Haard, 1993) cargando 10 mU de actividad azocaseinolítica en cada calle. Después de corrido, el gel se sumergió en una solución de caseína al 3% en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, luego se fijaron y se tiñeron como se mencionó antes. Las bandas claras sobre un fondo azul oscuro fueron consideradas proteínas con actividad proteolítica.

Para caracterizar los tipos de proteinasas, se incubaron extractos enzimáticos con inhibidores de proteinasas. N- $\alpha$ -p-tosilo-L-lisina clorometil cetona (TLCK) fue utilizado como un inhibidor específico de la tripsina y la N-tosilo-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) se utilizó como inhibidor específico de la quimotripsina. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el inhibidor de tripsina de soja (SBTI) fueron utilizados como inhibidores de proteasas de la clase serina. Las soluciones de inhibidores se añadieron por separado a los extractos enzimáticos (10 mU) en una proporción 1:2 (inhibidor/extracto) y se incubaron a 25 ° C durante 60 min. Los inhibidores fueron reemplazados por agua destilada en los controles. Después de la incubación, las muestras se mezclaron con buffer y se cargaron en los geles. Después de la electroforesis, los carriles del control e inhibición se tiñeron para detectar actividad como se describió anteriormente. Las bandas de enzimas con inhibidores de proteasa fueron comparados con los controles para identificar el tipo de enzima en la banda (Fernández-Gimenez et al., 2001; 2002; Díaz-Tenorio et al., 2006).

#### Análisis estadístico:

El efecto del pH sobre la actividad celulolítica y proteolítica específicas se analizó con un ANOVA de una vía. Las diferencias en proteína soluble, actividades específicas de celulasa,  $\beta$ -1,4-glucosidasa, endo- $\beta$ -1,4-glucanasa,  $\alpha$  amilasa y proteinasa fueron analizadas con ANOVA de 3 vías, con tipo de comida (hojas, sedimento), condición alimentaria (alimentados, no alimentados) y sexo como factores. Las diferencias entre actividades específicas de tripsina y quimotripsina fueron evaluadas con ANOVA de 2 vías con tipo de alimento y sexo como factores. Se comprobó normalidad y homocedasticidad y se transformaron los datos cuando los supuestos no se cumplieron. Se realizaron comparaciones pos-hoc con la prueba de Tukey. En todos los casos, el nivel de significación se estableció como  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1979).

## **Resultados**

La actividad celulasa específica fue afectada por el pH del buffer de incubación (Fig. 4. 1); la actividad óptima se encontró a pH 5,5 ( $F = 21,67$ ,  $P < 0,001$ ).

Dado que la actividad celulasa específica es el resultado de la actividad combinada de endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y  $\beta$ -1,4-glucosidasa (Linton y Greenaway, 2004) y que también sus valores de pH óptimos han sido demostrados no ser muy diferentes del pH óptimo de celulasa total, este valor de pH se utilizó para todos los ensayos enzimáticos de celulasas.

La actividad proteínasa específica fue la misma para todos los pH testeados ( $P = 0,254$ ) sin embargo, como un valor de pH máximo se pudo obtener a partir de la curva ajustada (pH 7,5; Fig. 4. 2), éste se utilizó posteriormente para todos los análisis de actividad enzimática de proteinasas.

El contenido de proteína soluble del hepatopáncreas varió entre los diferentes grupos experimentales, pero en todos los casos fue mayor en el control que en los animales alimentados (Tabla 4. 1). Se detectó la presencia de interacciones significativas entre los pares de factores ( $P < 0,001$  en todos los casos). En comparación con el control, los cangrejos de la marisma, alimentados con hojas, mostraron una disminución más notable del contenido de proteína que los de la planicie de mareas alimentados con sedimentos.

Una actividad celulolítica específica pudo ser detectada en los homogenatos de hepatopáncreas de todos los grupos, ya sea con celulosa microcristalina, celobiosa o carboximetil celulosa como sustratos. En general, las actividades celulasa,  $\beta$ -1,4-glucosidasa y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa específicas, fueron mayores en los cangrejos de la marisma, alimentados con hojas de *S. densiflora*, que la de los controles no alimentados y los cangrejos alimentados con sedimento (Fig. 4. 3, .4 y .5, respectivamente). Los machos presentaron mayor actividad celulasa y  $\beta$ -1,4-glucosidasa específicas que las hembras en el grupo alimentado con hojas (Fig. 4. 3b y 4b) y mayor actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa específica en los alimentados con sedimento (Fig. 4. 5b), mientras que las hembras control de la marisma mostraron mayor actividad que los machos para la actividad de ésta última enzima (Fig. 4. 5a). La condición alimentaria fue el factor más influyente en las actividades celulasa y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa específicas ( $F = 97,86$  y  $F = 55,77$ , respectivamente), pero el factor que más influyó sobre la actividad  $\beta$ -1,4-glucosidasa específica, fue el tipo de alimento ( $F = 67,38$ ).

La actividad amilasa específica fue mayor en los cangrejos control de la marisma en comparación a los grupos restantes (Fig. 4. 6). No hubo diferencias entre los cangrejos control de la planicie de mareas y los alimentados con sedimento. La actividad amilasa de los cangrejos alimentados con hojas fue la más baja observada (Fig. 4. 6b). La condición alimentaria fue el factor más influyente en la actividad específica de la  $\alpha$  amilasa ( $F = 73.39$ ).

La actividad proteínasa específica fue muy variable entre los grupos (Fig. 4. 7a, 7b), y existió una interacción entre el tipo de comida y sexo ( $P < 0,001$ ). La actividad fue relativamente alta en machos y hembras de la marisma. Sin embargo, cuando los cangrejos de ambos sexos fueron alimentados, la actividad específica se mantuvo sin cambios en los machos pero decayó notoriamente en las hembras (Fig. 4. 7a, 7b). Los cangrejos control de la planicie de mareas mostraron una menor actividad específica y diferencia entre sexos. Además, en este caso, mientras que los machos alimentados mostraron una menor actividad específica, las hembras alimentadas no presentaron ninguna diferencia en la actividad proteolítica específica respecto a los controles. La condición alimentaria fue el factor más influyente ( $F = 111,2$ ).

Las actividades específicas de tripsina y quimotripsina de los cangrejos de la marisma alimentados de hojas, fueron mayores que las de los cangrejos de la planicie de mareas alimentados con sedimento (Fig. 4. 8 y .9). Las hembras alimentadas con sedimento mostraron una mayor actividad específica de tripsina que los machos (Fig. 4. 8) mientras que no hubo diferencias entre sexos en la actividad específica de quimotripsina (Fig. 4. 9). El tipo de alimento fue el factor más influyente en la actividad específica de ambas enzimas ( $F = 526,8$  y  $F = 152$ , respectivamente).

La composición proteica evaluada por SDS-PAGE mostró ocho diferentes fracciones proteicas con masas moleculares de 14 a 76 kDa (F1 a F8, respectivamente, en la Fig. 4. 10). El patrón de bandas fue similar para todos los sitios, condición alimentaria o sexos (Fig. 4. 10).

La Fig. 4. 11 muestra el zimograma de los homogenatos de hepatopáncreas de *N. granulata*. En general, los cangrejos presentaron el mismo patrón caracterizado por tres bandas con actividad proteínasa (13,9; 15,0 y 35,8 kDa). Las dos bandas más pequeñas fueron inhibidas por TLCK y SBTI y se las clasificó como tripsinas. La más grande

(posiblemente quimotripsina), fue inhibida por SBTI y PMSF pero ninguna inhibición se registró con TPCK.

## **Discusión**

La actividad específica de las enzimas digestivas de *N. granulata* mostró diferencias entre los grupos en la mayoría de los sustratos testeados. Esto sugiere diferentes condiciones fisiológicas de los individuos y soporta la idea de que esta especie posee la capacidad potencial de modular su actividad enzimática en función del sexo, el hábitat y la disponibilidad de alimentos. Esta plasticidad puede ser considerada como ecológicamente adaptativa, ya que esta especie habita en ambientes donde la alimentación no es continua (dependiendo, entre otras variables, de ciclos de mareas irregulares) y al mismo tiempo, la disponibilidad de uno u otro tipo de alimento está influenciada por la combinación de una serie de factores físicos y biológicos (Capítulo 1 de esta tesis). A pesar de que estos cangrejos pueden moverse entre microhábitats contiguos, permitiéndole a un individuo cambiar la fuente de alimento entre sedimento y hojas de plantas halófitas (Luppi et al., 2012), parece que prefieren alimentarse de la comida disponible cerca de sus cuevas (Iribarne et al., 1997) y una segregación compleja de individuos se ha observado entre microhábitats en función del sexo y edad de los cangrejos (Spivak et al., 1994). Por otra parte, en invierno (cuando los experimentos se llevaron a cabo), la especie ha finalizado el período reproductivo y las hembras están re-madurando sus ovarios, aun cuando la reproducción se reinicia recién al final de la primavera (Ituarte et al., 2004); los machos en cambio, se encuentran presumiblemente en un período de reposo. Esto podría explicar en cierta medida las diferencias observadas entre ambos sexos.

Muchas investigaciones se han hecho en diversos aspectos de la fisiología digestiva de crustáceos decápodos, pero la mayor parte de los estudios disponibles están hechos con especies de interés económico que tienen una actividad de alimentación constante y una alta tasa de crecimiento, ambas correlacionadas con una dieta rica en proteínas (carnívoros). Estos estudios se centraron principalmente en las enzimas proteolíticas (Navarrete del Toro et al., 2006; Muhlia-Almazán et al., 2008) y, en menor medida, en carbohidrasas. Basados en esos estudios, el papel de las enzimas celulolíticas (y el papel de las plantas vasculares

como los alimento) se consideraron de menor importancia (Cuzon et al., 2000). Sin embargo, recientemente se llevaron a cabo una serie de estudios en parastácidos y palaemonidos de agua dulce cultivados, cangrejos del mangle, y braquiuros terrestres (Pavasovic et al., 2004; Crawford, 2006; Linton y Greenaway, 2007; Pavasovic, 2008). Todas estas especies se alimentan, en mayor o menor proporción, de plantas terrestres o de sus detritos para sostener su crecimiento y desarrollo, y presentan una serie de adaptaciones metabólicas y de historia de vida a dietas altas en fibra y bajo contenido de nitrógeno (Linton y Greenaway, 2007). Estos estudios claramente han establecido la capacidad de algunos decápodos para utilizar la celulosa como fuente de energía. Hasta no hace mucho, era aceptado que la mayor parte de la actividad celulolítica detectada en los artrópodos correspondían a las habilidades digestivas de los protozoos y bacterias que habitan en el tracto intestinal de sus hospedadores, como ocurre en las bien estudiadas termitas e isópodos terrestres (Martin, 1991). Dentro de los crustáceos acuáticos, algunos isópodos parecen depender de endosimbiontes bacterianos para digerir celulosa (Zimmer y Bartholmé, 2003). Sin embargo, la mayoría de los crustáceos, incluyendo los herbívoros, tienen tractos digestivos muy simples y periodos de tiempo de paso de los alimentos por el intestino cortos (por ejemplo: 12 horas en cangrejos omnívoros costeros y herbívoros terrestres; (Hopkin y Nott, 1980; Greenaway y Linton, 1995) y por lo tanto, no tienen tiempo suficiente para una fermentación bacteriana que pueda contribuir sustancialmente a la digestión de carbohidratos como la celulosa (Dall y Moriarty, 1983; Linton y Greenaway, 2007). Al mismo tiempo, se ha proporcionado recientemente, evidencia molecular directa de endoglucanasas endógenas en una serie de decápodos (Crawford, 2006; Linton et al., 2006; Allardyce y Linton, 2008) y en un isópodo terrestre (Kostanjsek et al., 2010). Por otra parte, sobre la base de datos similares de diferentes artrópodos y nematodos, Watanabe y Tokuda (2001) sugieren que las enzimas celulolíticas endógenas pueden ser un rasgo común en los invertebrados.

Los extractos de hepatopáncreas de *N. granulata* degradaron celulosa en sus diferentes formas, dado que se pudo detectar actividad específica a partir de celulosa microcristalina, carboximetil celulosa y celobiosa como sustratos. Sin embargo, no puede descartarse a partir de este estudio la posible contribución de enzimas exógenas

(proveniente de endosimbiontes y/o microorganismos de vida libre ingeridos con los alimentos) en la actividad enzimática, y debe ser objeto de futuras investigaciones.

La actividad amilasa específica fue considerablemente más alta que la actividad celulolítica específica. Esto parece ser un rasgo distintivo de los crustáceos ya que el almidón es considerado como el hidrato de carbono más eficientemente degradado (Coccia et al., 2011).

De una manera similar a la actividad amilasa, la actividad proteolítica, de tripsina y quimotripsina específicas estuvieron siempre presentes, lo que parece ser también un rasgo común entre muchos invertebrados, incluidos los crustáceos decápodos (Muhlia-Almazán et al., 2008). Sin embargo, se observaron patrones de actividad muy diferentes entre grupos al comparar las actividades proteínasa total con el grupo de las tripsinas. A pesar de que el grupo de las tripsinas está presente en muchos organismos, otros grupos de proteasas, como el aspártico, han demostrado ser muy importantes en muchos crustáceos decápodos (Navarrete del Toro et al., 2006), teniendo actividades complementarias, con un pH óptimo diferente al de las serin-proteasas (Le Boulay et al., 1996), o incluso a veces, son el principal grupo de proteasas presentes (Teschke y Saborowski, 2005). Aunque no se midieron actividades de otros grupos de proteinasas, se puede hipotetizar que las diferencias observadas entre las actividades específicas de proteínasa, tripsina y quimotripsina en los distintos grupos experimentales de *N. granulata*, podrían ser consecuencia de la actividad diferencial de otros grupos proteolíticos, como por ejemplo, las proteasas aspárticas (Le Boulay et al., 1996).

Cuando todas las actividades enzimáticas analizadas son consideradas en conjunto, aparecen dos tipos de respuesta. En una de ellas, observada en celulasas, la actividad en el hepatopáncreas de los cangrejos alimentados con hojas fue mayor que en individuos control sin alimentarse (en los alimentados con sedimento no hubo respuesta alguna). En la otra, encontrada en las actividades específicas de amilasa y proteasa, la respuesta consistió en una menor actividad en los cangrejos alimentados comparados con los controles no alimentados. Esto debe estar relacionado con la forma en que la actividad de las enzimas correspondientes es regulada. Durante el ciclo digestivo, las enzimas de los crustáceos, que se sintetizan en el hepatopáncreas, son liberadas en la cámara cardíaca de estómago, donde comienza la degradación de los alimentos (Icely y Nott, 1992). Entonces, una caída de la

actividad enzimática en el hepatopáncreas de cangrejos alimentados durante una hora, como ocurrió con la amilasa y proteasas, sugieren que estas enzimas estaban listas para ser utilizadas, y fueron liberados al principio del ciclo digestivo. En contraste, una elevada actividad enzimática en el hepatopáncreas de los cangrejos después de una hora de alimentación (en comparación con los individuos ayunados), como se observa en la actividad específica de las celulasas, parece indicar que la presencia de algún tipo de alimento (hojas) en el estómago estimula algún paso en la síntesis o la activación de las enzimas, las cuales no estaban dispuestas para actuar inmediatamente después de la ingestión de alimentos. Para poner a prueba ambas hipótesis se deberá estudiar el ciclo digestivo completo y la actividad enzimática en el estómago y hepatopáncreas.

En general, las actividades enzimáticas de los cangrejos de la marisma alimentados con hojas de *S. densiflora* fueron más altas que las de los cangrejos de la planicie de mareas alimentados con sedimento. Esto podría estar relacionado con la necesidad de degradar una fuente de alimento de baja calidad (pobre contenido de proteína: de 0,7 a 5% en peso seco, (Mattson, 1980) y baja digestibilidad (alto contenido de fibra: hasta el 40% del peso seco constituido sólo por celulosa) (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Un patrón similar, con alta actividad proteínica, se observó en camarones alimentados con alimentos de bajo contenido proteico y en cangrejos herbívoros (Johnston y Freeman, 2005). Algunos animales que se alimentan de plantas responden de una manera compensatoria produciendo más enzimas (Karasov y Martínez del Rio, 2007), proporcionando un ejemplo ecológico de flexibilidad enzimática digestiva.

Se supone que los sedimentos son un recurso alimenticio capaz de proporcionar una cantidad suplementaria de proteína teniendo en cuenta que, además de restos vegetales (Botto et al., 2005), están presentes algunos elementos ricos en N como los nematodos, poliquetos y pequeños crustáceos (D' Incao et al., 1990). Sin embargo, en algunos casos no se observaron diferencias, por ejemplo cuando se compararon cangrejos alimentados con sedimento con individuos sin alimentar. Las condiciones de alimentación de los cangrejos alimentados con sedimento en el laboratorio podrían no parecerse mucho a las naturales, ya que la manipulación del sedimento probablemente causó una mezcla de la capa superficial del barro ofrecido y la consecuente disminución de la materia vegetal y de pequeños organismos disponibles para los cangrejos.

Ha sido sugerido por Pinoni et al. (2011) que las diferencias observadas en la actividad proteolítica total y otras características bioquímicas entre machos adultos de *N. granulata* de la planicie de mareas y la marisma de la laguna costera de Mar Chiquita, son estrategias de adaptación metabólica para afrontar las variaciones del hábitat. Los resultados de este estudio mostraron que las diferencias en las actividades específicas celulolíticas, amilolítica y proteolítica existen no sólo entre los tipos de alimento, sino también entre sexos. La plasticidad observada es un prometedor punto de partida para entender la capacidad de los cangrejos intermareales de lidiar con fuentes de alimentos discontinuos y variables con el fin de maximizar la obtención de energía a partir de los alimentos disponibles y cumplir los diversos requisitos a lo largo de sus ciclos de vida. Además, ayuda a entender el exitoso establecimiento y mantenimiento de densas poblaciones de esta especie en diferentes hábitats a lo largo de su amplia distribución geográfica latitudinal.

**Figuras y tablas**

	Contenido de proteína (mg ml <sup>-1</sup> )			
	Ayunados		Alimentados	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Marisma	18.22 ± 0.19 <sup>a</sup>	18.25 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.71 <sup>c</sup>	8.58 ± 0.20 <sup>e</sup>
Planicie de mareas	20.88 ± 0.25 <sup>b</sup>	18.70 ± 0.42 <sup>a</sup>	14.73 ± 0.36 <sup>d</sup>	13.47 ± 0.20 <sup>d</sup>

Tabla 4. 1. Contenido de proteína soluble en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata* bajo diferentes condiciones. Media de tres replicas ± desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ )

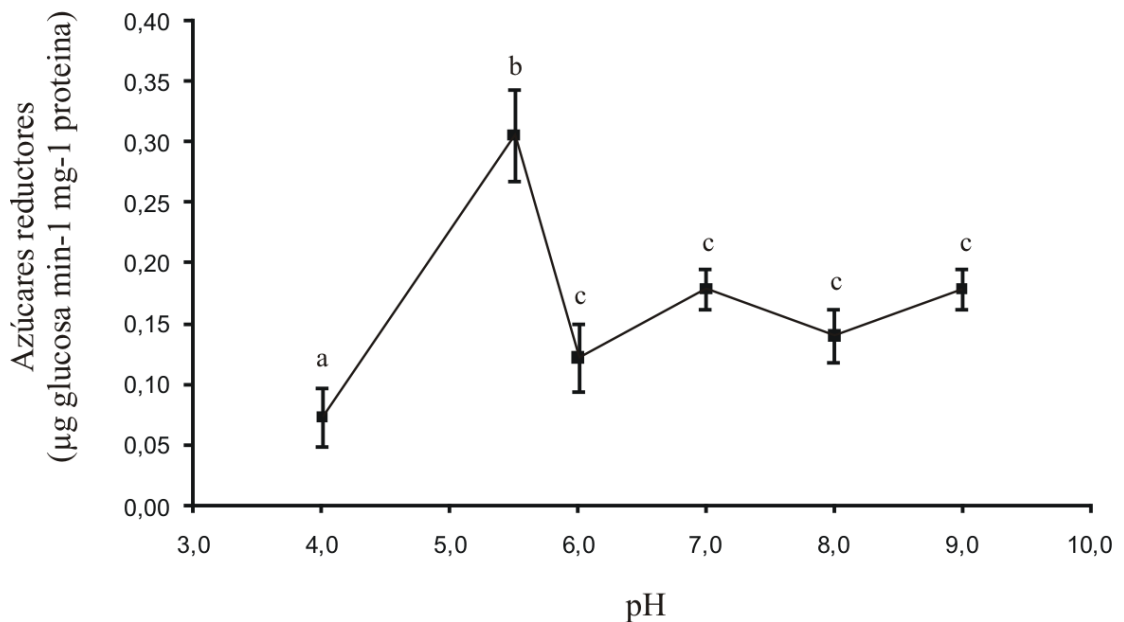


Fig. 4. 1. Efecto del pH sobre la actividad celulolítica en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. Los puntos de datos representan la media ± desviación estándar, N = 3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de pH ensayados (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

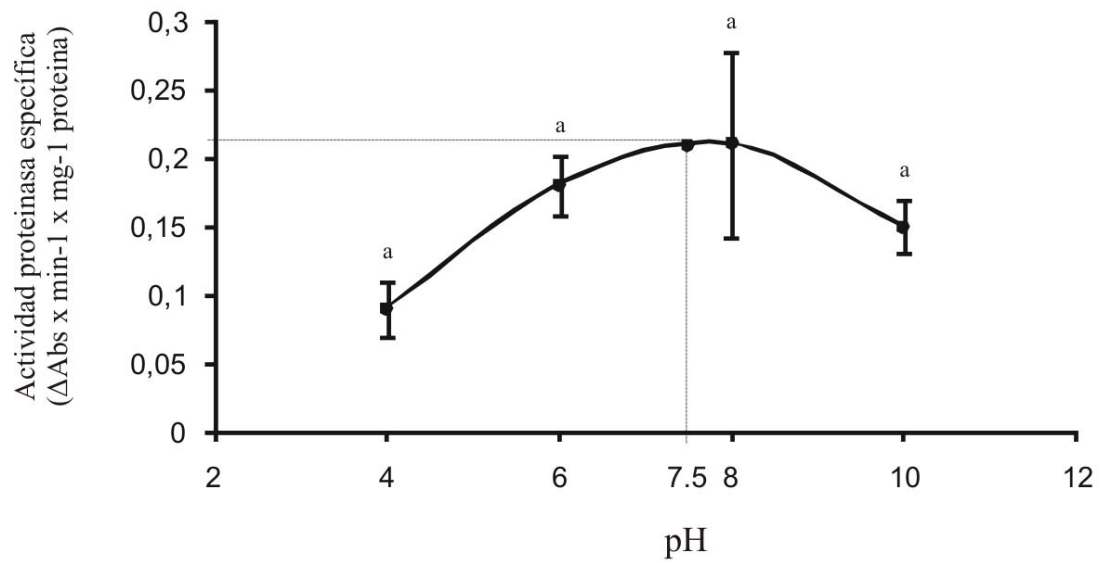


Fig. 4. 2. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. Los puntos de datos representan la media  $\pm$  desviación estándar,  $N = 3$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de pH ensayados (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

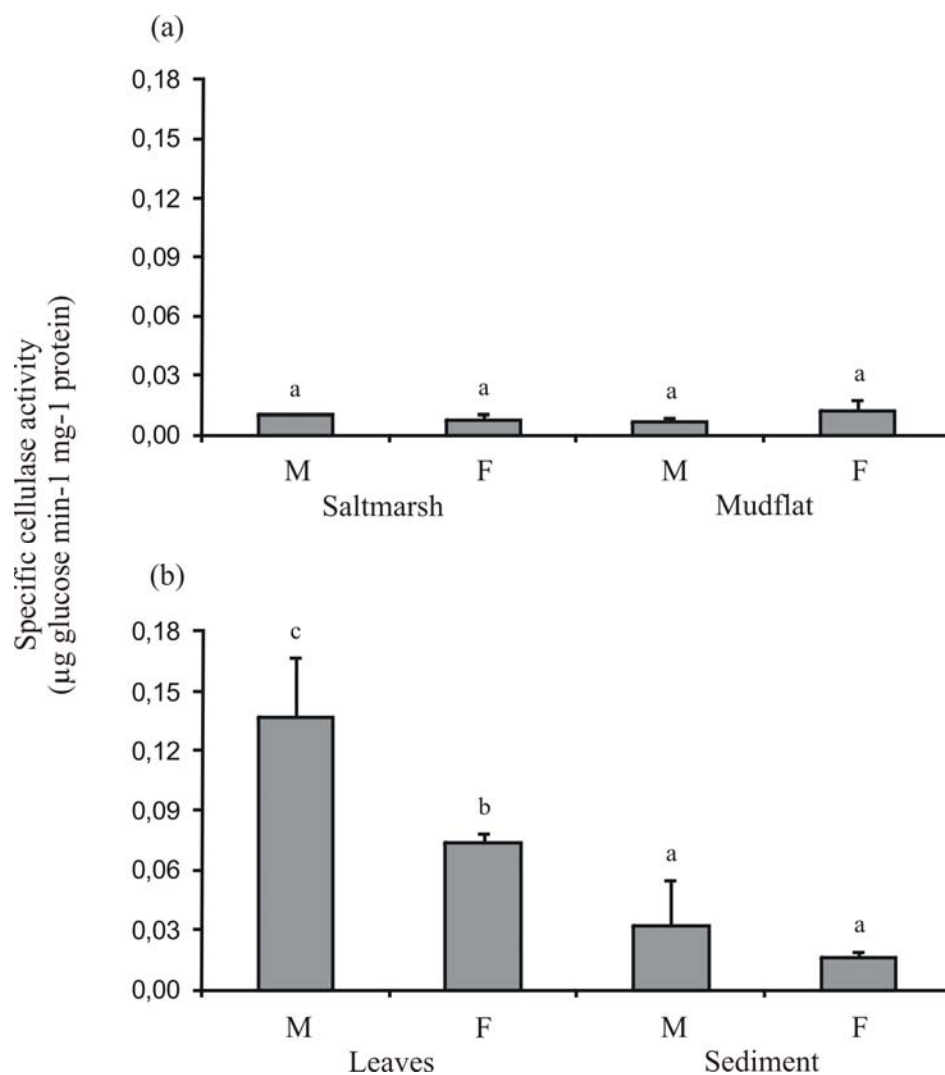


Fig. 4. 3. Actividad celulolítica específica en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. a) Machos (M) y hembras (F) control, (sin alimentación), de la marisma (saltmarsh) y la planicie de mareas (mudflat), b) Machos y hembras de la marisma y planicie de mareas alimentados con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment), respectivamente. La actividad se expresó como µg min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína de azúcares reductores liberados. Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

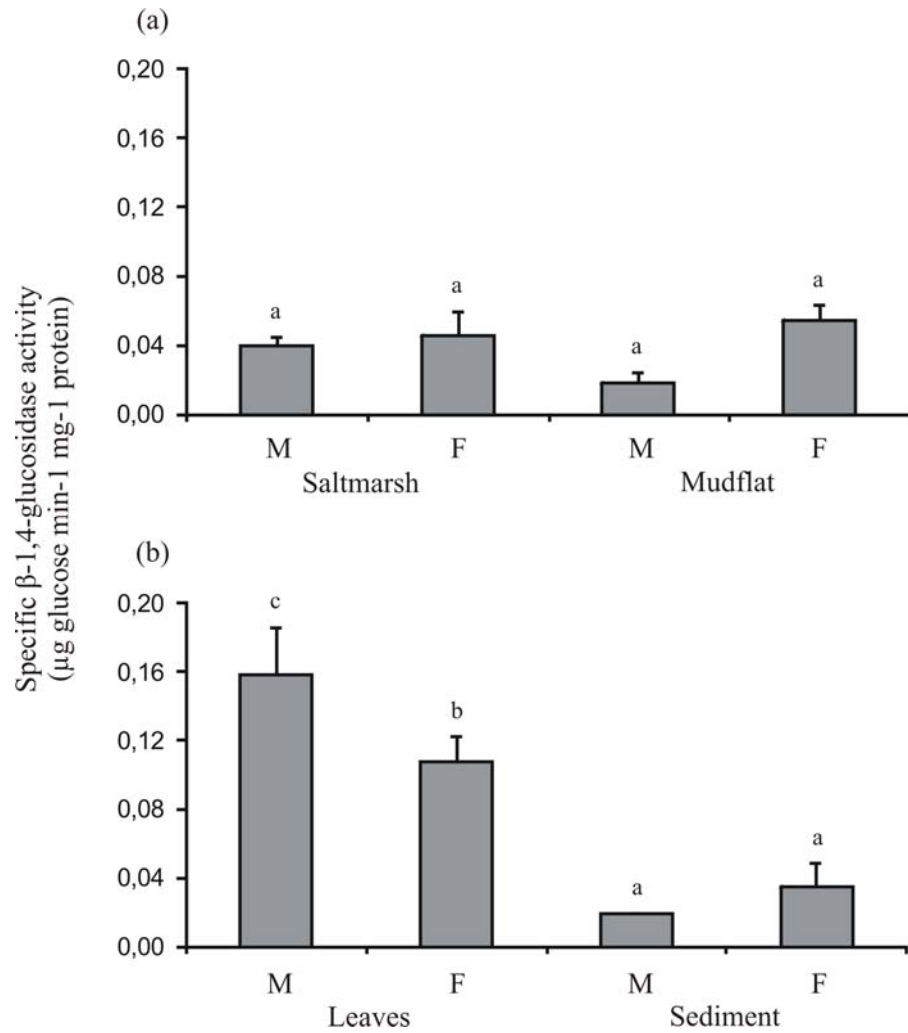


Fig. 4. 4. Actividad específica de  $\beta$ -1,4-glucosidasa en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. a) Machos (M) y hembras (F) control, (sin alimentación), de la marisma (saltmarsh) y la planicie de mareas (mudflat), b) Machos y hembras de la marisma y planicie de mareas alimentados con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment), respectivamente. La actividad se expresó como  $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína de azúcares reductores liberados. Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

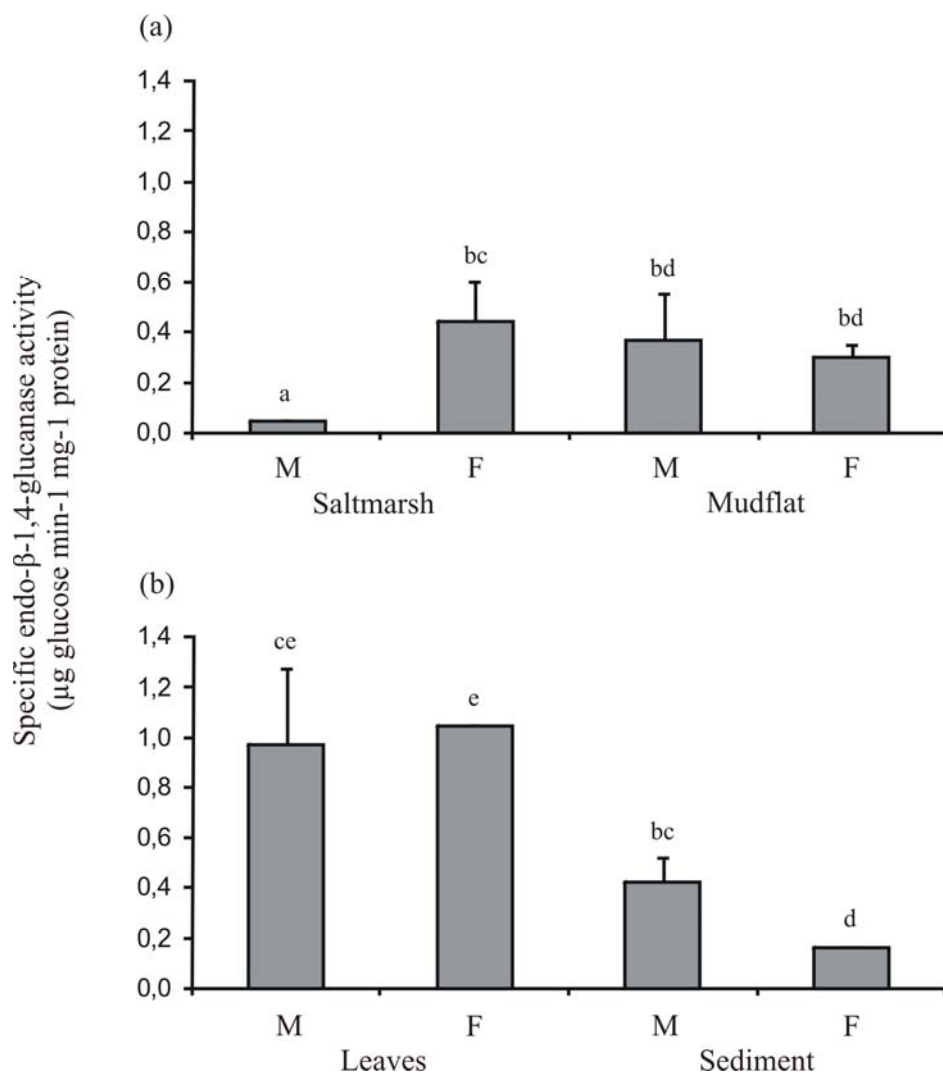


Fig. 4. 5. Actividad específica de β-1,4-glucanasa en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. a) Machos (M) y hembras (F) control, (sin alimentación), de la marisma (saltmarsh) y la planicie de mareas (mudflat), b) Machos y hembras de la marisma y planicie de mareas alimentados con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment), respectivamente. La actividad se expresó como µg min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína de azúcares reductores liberados. Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

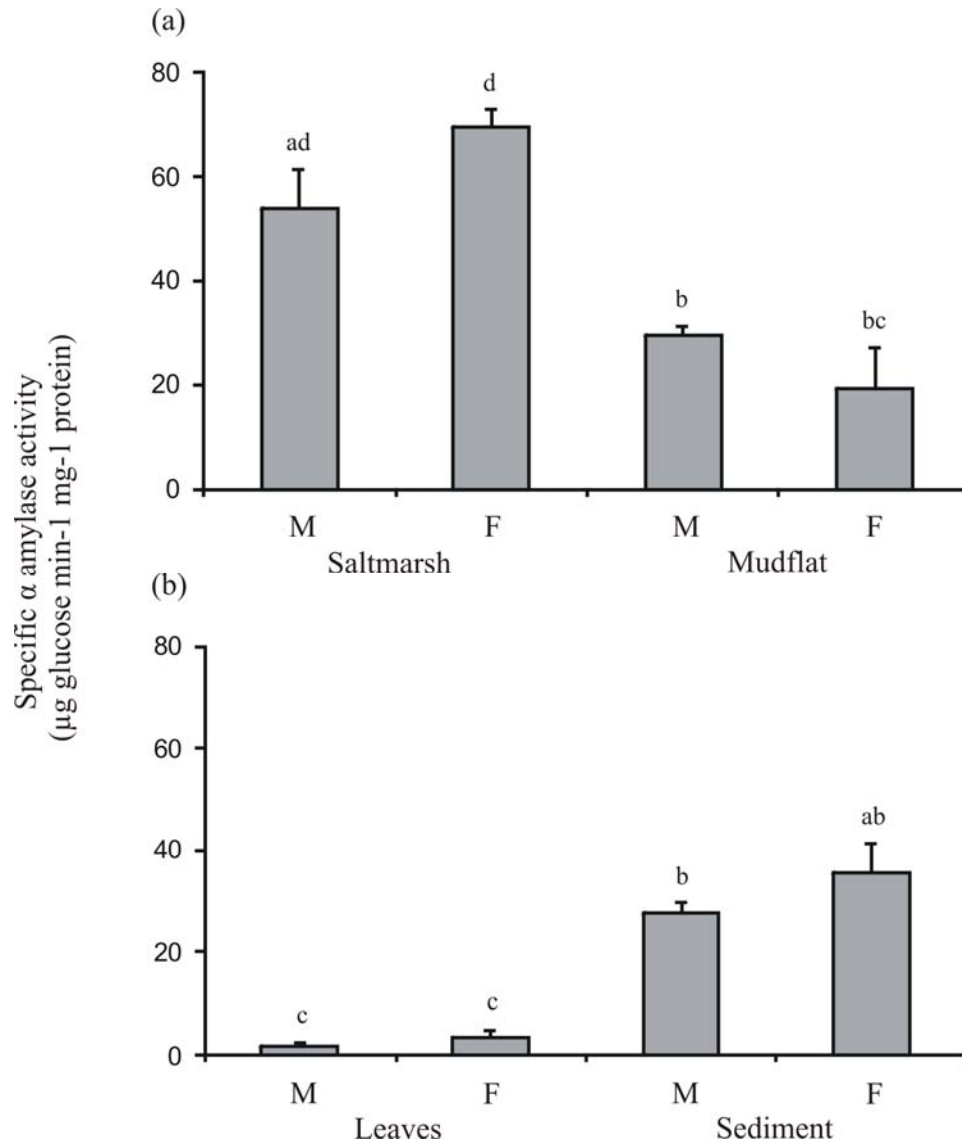


Fig. 4. 6. Actividad específica de  $\alpha$ -amilasa en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. a) Machos (M) y hembras (F) control, (sin alimentación), de la marisma (saltmarsh) y la planicie de mareas (mudflat), b) Machos y hembras de la marisma y planicie de mareas alimentados con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment), respectivamente. La actividad se expresó como  $\mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína de azúcares reductores liberados. Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

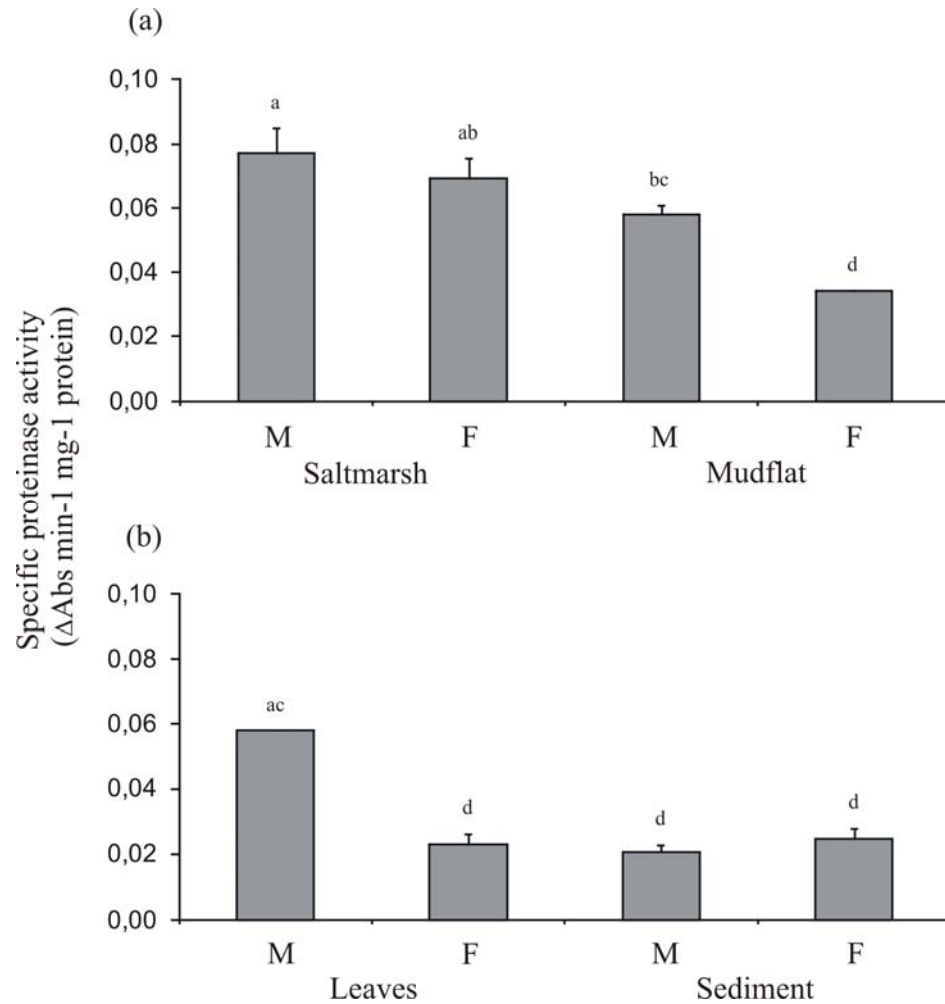


Fig. 4. 7. Actividad proteinasa específica en homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. a) Machos (M) y hembras (F) control, (sin alimentación), de la marisma (saltmarsh) y la planicie de mareas (mudflat), b) Machos y hembras de la marisma y planicie de mareas alimentados con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment), respectivamente. La actividad se expresó como el cambio en la absorbancia min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína ( $\Delta$  Abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

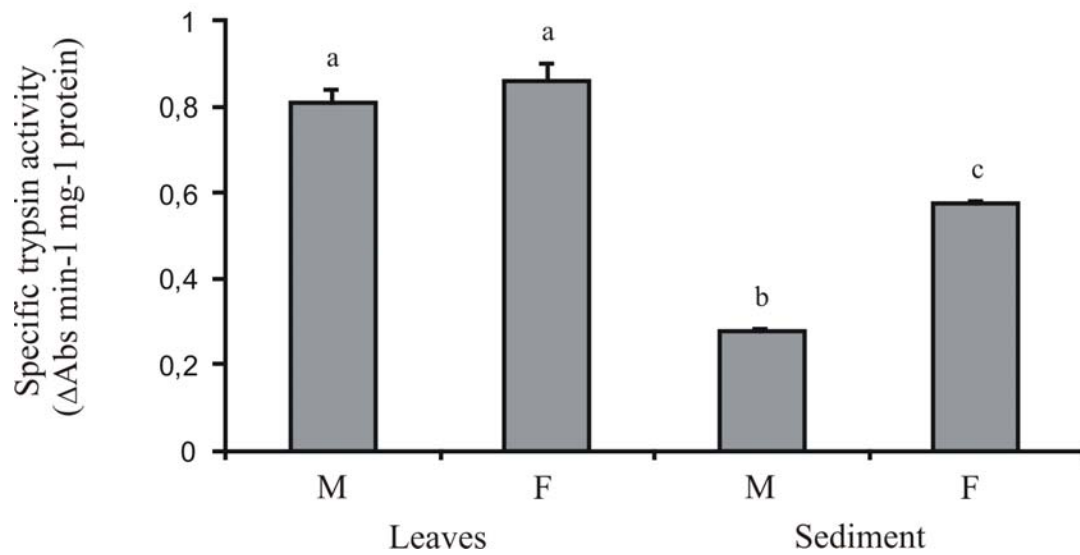


Fig. 4. 8. Actividad específica de tripsina (BAPNA como sustrato) en *Neohelice granulata* de cangrejos machos (M) y hembras (F) alimentados [con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment)]. La actividad se expresó como el cambio en la absorbancia min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína ( $\Delta$  Abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

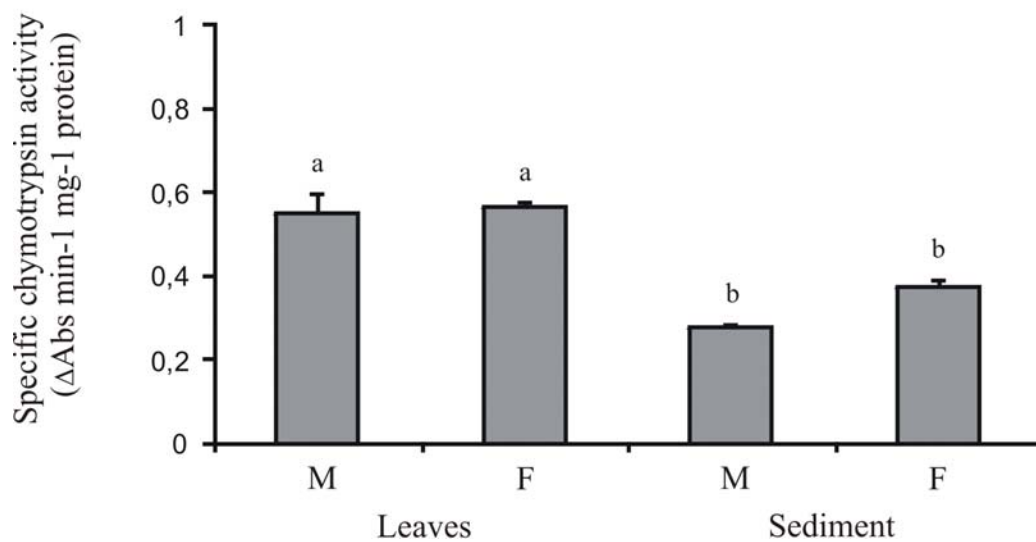


Fig. 4. 9. Actividad específica de quimotripsina (SAPNA como sustrato) en *Neohelice granulata* de cangrejos machos (M) y hembras (F) alimentados [con hojas de *S. densiflora* (leaves) y sedimento (sediment)]. La actividad se expresó como el cambio en la absorbancia min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína ( $\Delta$  Abs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína). Media de tres replicas + desviación estándar. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

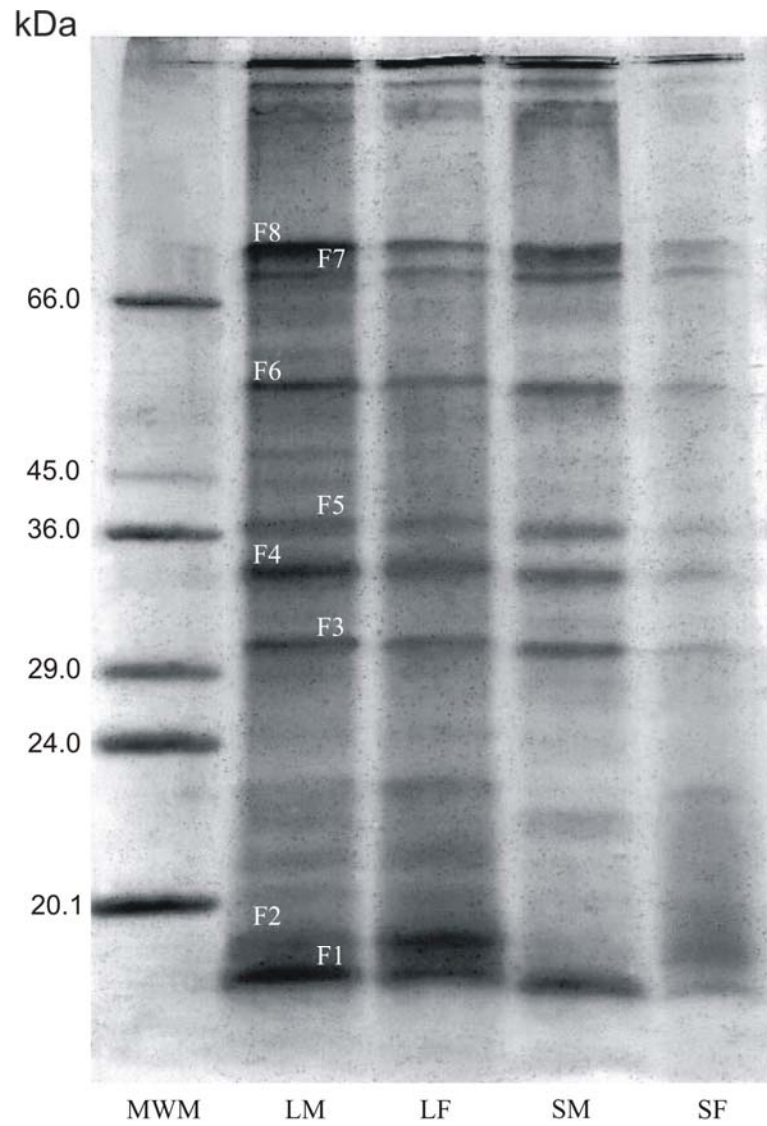


Fig. 4. 10. Composición proteica determinada por SDS-PAGE de homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. MWM: marcador de peso molecular, LM, LF y SM, SF: Machos y hembras alimentados con hojas de *S. densiflora* o sedimento respectivamente. F1-F8: fracciones proteicas.

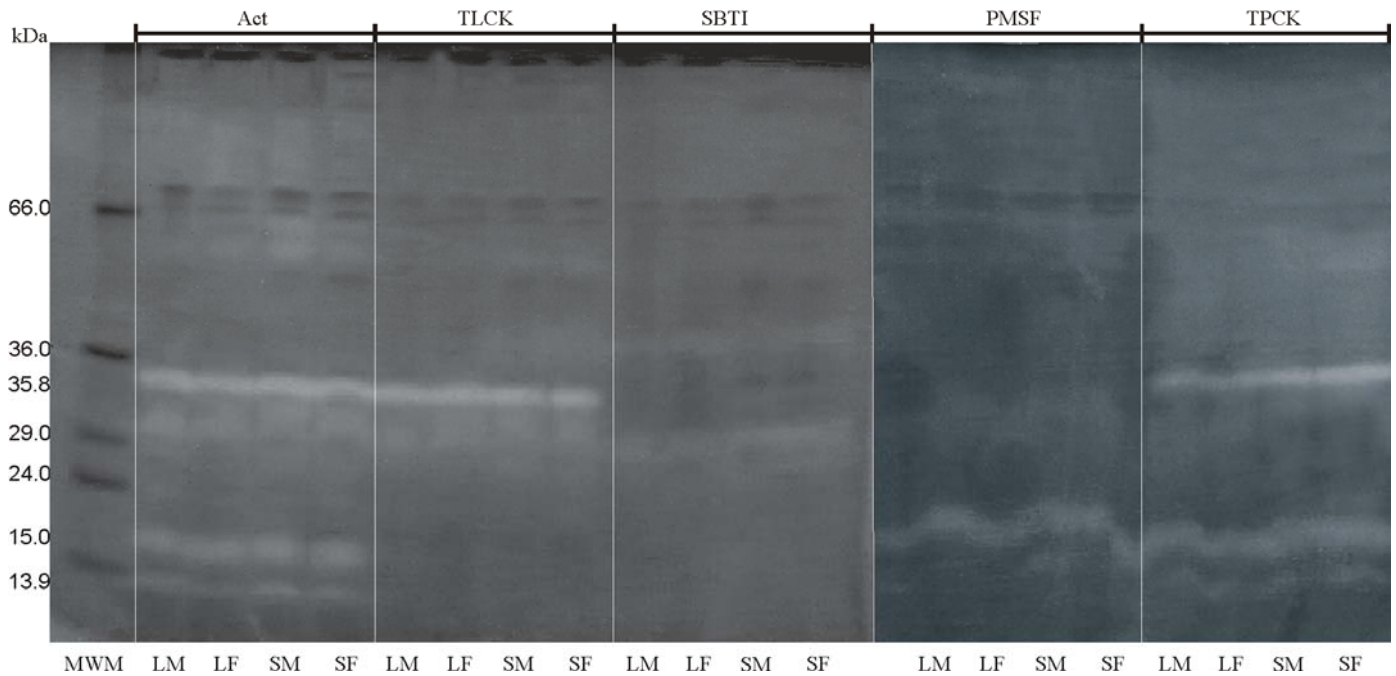


Fig. 4. 11. Actividad proteinasa evaluada por SDS-PAGE de homogenatos de hepatopáncreas de *Neohelice granulata*. MWM: marcador de peso molecular, LM, LF y SM, SF: Machos y hembras alimentados con hojas de *S. densiflora* o sedimento respectivamente Act: actividad proteinasa; TLCK: inhibición de la tripsina; SBTI y PMSF: Inhibición de proteinasas tipo serina; TPCK: inhibición de quimotripsina.

## Capítulo 5:

### **Estimación de la capacidad de aprovechamiento de los diferentes componentes de la dieta de *Neohelice granulata***

#### **Introducción**

La mayor parte de los escasos estudios sobre estrategias digestivas y eficiencia de asimilación de nutrientes en crustáceos no cultivables se han realizado con algunas especies de cangrejos herbívoros terrestres (Wilde et al., 2004). Estas especies se alimentan, en mayor o menor proporción, de plantas o de sus detritos para sostener su crecimiento y desarrollo, y presentan una serie de adaptaciones metabólicas y de historia de vida a dietas altas en fibra (hasta el 40% del peso seco constituido sólo por celulosa, Karasov y Martínez del Rio, 2007) y bajo contenido de proteína (de 0,7 a 5% en peso seco, Mattson, 1980). Dichas adaptaciones incluyen selección de ítems alimenticios, tasa de consumo, fragmentación mecánica de la comida, la combinación de enzimas digestivas producida, la anatomía del tracto digestivo, y el tiempo de retención de la ingesta dentro del estómago (Linton y Greenaway, 2007).

La alometría en el tamaño del intestino ha sido extensamente estudiada en vertebrados, sobre todo mamíferos y aves, pero muy poco se sabe en invertebrados (Karasov y Martínez del Rio, 2007). Los estudios indican que en los primeros existe una clara asociación entre la superficie de absorción y las necesidades energéticas, ya sea debido a una dieta pobre o a una gran exigencia metabólica, que lleva a una variación de la superficie intestinal en función de la necesidad de nutrientes (Karasov y Martínez del Rio, 2007). La mayoría de los crustáceos, incluyendo los herbívoros, tienen tractos digestivos muy simples, la morfología es altamente conservada dentro de los decápodos, y si bien no se encuentra en este grupo una asociación entre baja calidad de alimento y mayor longitud del intestino, recientemente (Griffen y Mosblack, 2011), trabajando con varias especies de distintas familias de braquiuros, encontraron una clara correlación entre el tamaño del estómago cardíaco y el grado de herbivoría de las especies, excepto en las especies de la

familia Ocypodidae. En ese contexto, *N. granulata* presenta un estómago “grande” en relación al tamaño corporal (ver Discusión, Capítulo 1).

Las estrategias digestivas en cangrejos herbívoros oscilan entre dos extremos. Uno de ellos está asociado con una alta tasa de ingesta de alimento, un tiempo de retención de la comida corto y una baja tasa de asimilación de la materia seca, altamente restringido a los nutrientes fácilmente digeribles. En el otro, hay una tasa de consumo baja, un tiempo de retención alto y una alta asimilación de la materia seca (Wilde et al., 2004).

Los períodos de paso de los alimentos por el intestino son en general cortos, independientemente del tipo de alimento en muchas de las especies estudiadas (por ejemplo: 12 horas en cangrejos omnívoros costeros y herbívoros terrestres (Hopkin y Nott, 1980; Greenaway y Linton, 1995). Sin embargo, existen reportes de tiempos mayores para el gran cangrejo ermitaño de los cocoteros *Birgus latro* (Anomura: Coenobitidae) con un tiempo de retención de alrededor de 27 hs (Wilde et al., 2004), lo que indica que el tiempo de retención del alimento es un elemento potencialmente variable del ciclo digestivo para mejorar la obtención de energía.

El objetivo de esta parte del trabajo fue el de medir el tiempo de retención y el porcentaje de asimilación de los componentes principales de la dieta, tanto en peso como en contenido de C y N, para poder establecer, junto a los resultados previos, cuál es la estrategia digestiva de *N. granulata*.

## **Materiales y métodos**

### **Tiempo de retención del alimento**

Para medir el tiempo de retención (en minutos) de los componentes principales de la dieta (sedimento y *S. densiflora*) se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio grupos de hembras y machos adultos de *N. granulata*, provenientes de las poblaciones de Mar Chiquita y San Antonio. Se utilizaron dos temperaturas experimentales, 20 y 12°C. La colecta y mantenimiento se realizó según lo especificado en la metodología general. Los ensayos se hicieron con grupos de cinco cangrejos por vez para poder seguir individualmente a aquellos que efectivamente se alimentaron. Sólo fueron considerados aquellos individuos que se alimentaron como mínimo media hora y como máximo una. Una

vez alimentados, los individuos fueron trasladados a recipientes individuales, con agua a la misma temperatura que durante el proceso de alimentación, en los cuales se procedió a recolectar las heces producidas. Los recipientes contaban con un doble fondo perforado para facilitar la caída de las heces a la cámara inferior evitando en lo posible la disgregación por la actividad del cangrejo y facilitando su recolección.

El momento de colocación de los individuos en los recipientes individuales fue registrado como “hora de inicio” del experimento. Se registró también el momento de aparición de las primeras heces y de ahí en adelante, se tomaron los tiempos de aparición de las heces posteriores en períodos de media hora a lo largo de 12 hs (tiempo aproximado de evacuación total). Se estimó un tiempo promedio, mínimo y máximo de retención para cada tipo de alimento, a las dos temperaturas para el total de hembras y machos testeados.

Los datos correspondientes a los tiempos de finalización del proceso digestivo, se ajustaron a una curva para determinar el tiempo de evacuación 50 (TE<sub>50</sub>), tiempo al cual el 50% de los cangrejos evacuaron por completo el alimento ingerido. Esto se calculó para los cangrejos de ambos sitios, temperaturas y tipo de alimento, estimando para cada intervalo de 30 minutos, el porcentaje de individuos que concluía la evacuación intestinal, a partir de tiempo en el cual el 100% de los individuos estaba produciendo heces, y hasta que la totalidad hubieran terminado.

#### Asimilación en peso de hojas de *Spartina densiflora*

Dado que el análisis de la asimilación en peso de la dieta requiere la cuantificación precisa del alimento ofrecido, el efectivamente ingerido y las heces producidas, no se encontró un modo eficiente de hacerlo para el sedimento como alimento dada la enorme pérdida durante la manipulación por parte del cangrejo y el lavado producido por el necesario contacto con el agua. Por lo tanto sólo se evaluó la alimentación con hojas de *S. densiflora* que, aunque fue un proceso dificultoso y con diversas fuentes de error, resultó aplicable.

El estudio se llevó a cabo con cangrejos de la laguna Mar Chiquita. Se utilizaron machos de un rango de tamaño de 24-27 mm de ancho de caparazón los cuales fueron alimentados con hojas de *S. densiflora*. La forma de obtención y administración del alimento son las detalladas en la metodología general. Se proporcionó a cada individuo una

cantidad de alimento previamente pesada. Los restos de alimento sin digerir se retiraron y colocaron en cápsulas de aluminio pesadas para ser secados en estufa 48 hs a 60°C y pesados. Las heces producidas también se colectaron, secaron y pesaron y fueron agrupadas en iniciales, intermedias y finales teniendo en cuenta el tiempo de aparición (0-3, 3-6 y posteriores a 6 hs. respectivamente) con el fin de detectar si existen diferencias durante el ciclo digestivo completo.

El coeficiente de asimilación (CA) se estimó como:

$CA = 1 - \text{peso seco de las heces producidas} / \text{peso seco del alimento efectivamente ingerido},$

expresado como porcentaje (Greenaway y Linton, 1995). Dado que el coeficiente se estima en base al peso seco y el alimento no puede ser secado antes de proporcionarlo a los cangrejos, que lo consumen habitualmente fresco, se estimó para cada uno el contenido promedio de humedad para realizar la corrección en el peso de alimento proporcionado.

#### Composición proximal y asimilación del C y N del alimento

Se utilizaron hembras provenientes de la población de Mar Chiquita. El contenido de C y N de los componentes de la dieta y de las heces producidas se midió con un microanalizador (Thermo Finigan Flash EA 1112). Para ello se tomaron cinco muestras de cada tipo de alimento, sedimento y hojas de *S. densiflora* frescos (colectado del modo descrito en la metodología general pero utilizado inmediatamente, no congelado), que se colocaron en cápsulas de aluminio previamente pesadas, y muestras de heces de 5 hembras alimentadas (según lo descrito en la metodología general) con cada alimento, tomando una fracción del inicio, mitad y fin del proceso de evacuación para cada una, que se colocaron también en cápsulas previamente pesadas. Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas (-20 °C) y liofilizadas hasta su análisis una vez obtenida la totalidad del material.

Dado que en el sedimento de Mar Chiquita existe gran cantidad de C en forma inorgánica (como carbonato) que interfiere con la estimación del C orgánico, único de interés en este caso, aquel debió ser eliminado previamente tratando las muestras con ácido sulfuroso según la técnica de (Verardo et al., 1990).

Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de N y C por mg de muestra (sedimento u hojas de *S. densiflora*). Además, debido a que los ítems alimenticios utilizados tienen pesos muy diferentes, el contenido de C y N se relativizó al peso correspondiente de un volumen conocido; en este caso se utilizó el volumen promedio de un estómago de *N. granulata* lleno (aproximadamente 0,2 ml), y fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de N y C por 0,2 ml de muestra. Para ello se estimó el peso seco de 3 muestras de *S. densiflora* cortada finamente y prensada en una jeringa de 1 ml hasta un volumen de 0.2 ml, y de modo similar el peso seco de 3 muestras del sedimento utilizado como alimento. El peso de cada una se estimó como el promedio de las tres réplicas. De éste modo se obtuvo una estimación del contenido de C y N de una cantidad de alimento correspondiente al llenado del estómago de *N. granulata* en una comida.

Para comparar los contenidos de C y N de las heces con los del alimento antes de ser ingerido y estimar un porcentaje de asimilación, se utilizó el valor promedio del contenido de los tres grupos de heces para cada tipo de alimento.

#### Análisis estadístico:

Las diferencias entre los tiempos de retención inicial y final, en minutos, del sedimento y las hojas de *S. densiflora* fueron evaluadas con ANOVA de tres vías con temperatura, sitio y tipo de alimento como factores. Los contenidos de N y C fueron comparados con ANOVA de una vía. Se comprobó normalidad y homocedasticidad y se transformaron los datos cuando fue necesario. Se realizaron comparaciones pos-hoc con la prueba de Tukey. En todos los casos, el nivel de significación se estableció como  $P < 0,05$  (Sokal y Rohlf, 1979).

### **Resultados**

#### Tiempo de retención del alimento

El tiempo de retención promedio fue variable dependiendo del sitio de origen de los cangrejos, la temperatura a la que se hicieron los experimentos y el tipo de alimento que fue ofrecido (Fig. 5. 1a y b). Dado que no se detectaron diferencias significativas entre sexos ( $P > 0,05$ ), los datos fueron agrupados para sus posteriores análisis. En general, el tiempo de

retención, tanto inicial como final, fue menor para el sedimento que para hojas de *S. densiflora*; fue mayor en Mar Chiquita que en San Antonio y menor a 20°C que a 12°C (Fig. 5. 1a y b). Las diferencias en el tiempo de retención entre los dos tipos de alimento fueron más marcadas en los tiempos iniciales de aparición de heces que en el tiempo de finalización del proceso digestivo (Fig. 5. 1a y b).

Los TE<sub>50</sub> estimados para los dos tipos de alimento y las dos temperaturas de alimentación, fueron similares entre sí para los cangrejos de Mar Chiquita y no reflejaron las diferencias iniciales y promedio entre temperaturas y entre tipos de alimento, siendo de aproximadamente 7 horas ± 1 hora en todos los casos (Figura 5. 2, a-d). Para los cangrejos de San Antonio por su parte, los TE<sub>50</sub>, además de ser siempre menores que los correspondientes de MC, fueron claramente diferentes entre temperaturas y entre tipos de alimento, variando entre 3,8 y 6,4 horas para el sedimento a 20 y 12° C respectivamente (Fig. 5. 2e, f), y entre 6,5 y 8,2 horas para las hojas de *S. densiflora* a 20 y 12 °C respectivamente (Fig. 5. 2g, h).

#### Asimilación de hojas de *Spartina densiflora*

El coeficiente de asimilación para hojas de *S. densiflora* fue  $54,25 \pm 28,14\%$  (n = 10).

#### Composición proximal y asimilación de C y N del alimento

El contenido de N estimado para el sedimento fue de 1,3 µg/mg mientras que en las hojas de *S. densiflora* alcanzó los 11,9 µg/mg, es decir unas 10 veces más (Fig. 5. 3a). El mismo contenido, expresado por volumen promedio de estómago resultó en 150 µg/0,2ml y 740 µg/0,2ml para el sedimento y las hojas respectivamente, es decir, alrededor de 5 veces más N en el contenido de un estómago lleno de hojas respecto de uno lleno de sedimento (Fig. 5. 3b). El contenido de C orgánico del sedimento fue estimado en 8,4 µg/mg, mientras que el valor para las hojas de *S. densiflora* fue de 431 µg/mg, es decir algo más de 50 veces mayor (Fig. 5. 4a), mientras que expresados por volumen, representaron 1,1 mg/0.2 ml y 26,9 mg/0,2ml respectivamente, casi 25 veces más C en un estómago lleno de hojas que de sedimento (Fig. 5. 4b).

El contenido de N en los tres grupos de heces (iniciales, intermedios y finales), indican que las heces iniciales del sedimento tuvieron un contenido de N mayor al de las heces finales ( $P = 0,045$ ); esta tendencia fue similar en las heces de hojas de *S. densiflora* si bien no se detectaron diferencias significativas. Respecto al contenido de C, las concentraciones entre heces iniciales, intermedias y finales fueron similares entre sí ( $P > 0,05$ ).

Los porcentajes de asimilación de C y N fueron paradójicos cuando se ofreció sedimento como alimento. El contenido de N por mg de muestra (promedio de los tres grupos de heces) de las heces de los cangrejos alimentados con sedimento fue 2,4 veces mayor al del sedimento ofrecido como alimento (Fig. 5. 3a). En cambio, el contenido de N en las heces de hojas, fue menor respecto al del alimento antes de ser ingerido; alcanzando  $4,27 \mu\text{g}/\text{mg}$ , lo que representó un porcentaje de asimilación del 64 % (Fig. 5. 3a, b). En cuanto a la asimilación del C, el contenido de C en las heces de los cangrejos alimentados con sedimento fue 2,7 veces mayor al del sedimento ofrecido, mientras que en las heces de hojas el contenido cayó algo menos de la mitad, indicando una asimilación de alrededor de 42,5% (Fig. 5. 4a, b).

La relación C:N del sedimento y las heces producidas por los cangrejos que se alimentaron del mismo fueron similares entre si y cercanas a 7. Esas relaciones, en el caso de *S. densiflora* fueron aproximadamente de 36 (5 veces mayor al sedimento) y 57,9 respectivamente. Eso significa que la relación C:N de las heces fue 1,6 veces mayor que la del alimento antes de ser ingerido (Fig. 5. 5) debido a la asimilación proporcionalmente mayor del N.

### **Discusión**

El ciclo digestivo de *N. granulata* fue afectado por el tipo de alimento ingerido y la temperatura, y varió de acuerdo a la población de la que provenían los individuos. Además de los tiempos de retención, los porcentajes de asimilación también estuvieron influenciados por el tipo de alimento.

Los animales pueden, potencialmente, variar una serie de características fisiológicas y de comportamiento que le permitan ajustarse a variaciones en la calidad de la dieta. Esto

incluye la selección de ítems alimenticios, el volumen de ingesta, la fragmentación mecánica del alimento, la producción de enzimas, el tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo y la anatomía del mismo. En el corto plazo, y dentro de una misma especie, tales variaciones estarán limitadas por el grado de plasticidad fenotípica (Linton y Greenaway, 2007). *Neohelice granulata* ha mostrado, en relación con el proceso digestivo, plasticidad en el tiempo de retención, probablemente relacionada con la calidad de la dieta. Considerando los dos componentes de la dieta analizados, el tránsito del sedimento fue más rápido que el de las hojas de *S. densiflora*. Comúnmente, la incorporación de fibra (en forma de hojas) aumenta la velocidad de tránsito intestinal en algunas especies de crustáceos donde ha sido estudiada, llegando a impedir la absorción normal de nutrientes cuando la proporción de fibra es alta (Pavasovic et al., 2006). Sin embargo, esas especies son en general carnívoras, es decir que carecen de la totalidad o la mayoría de las enzimas necesarias para aprovechar ese tipo de alimento. *Neohelice granulata* por su parte es, en buena medida, herbívoro y posee tanto la capacidad de digerir hidratos de carbono fácilmente digeribles como aquellos más complejos (celulosa en sus distintas formas) (Capítulo 4). Por ello, el pasaje de las hojas a través del tracto digestivo debe ser lo suficientemente lento como para permitir, por una parte, la fragmentación mecánica que permite actuar a las enzimas, y por otra, la acción coordinada de las diversas enzimas que llevan a la degradación de la celulosa (Capítulo 4). El sedimento, en comparación con las hojas, puede ser considerado de menor calidad, dado que la mayor parte de él es material inerte (Capítulo 1), por lo cual su paso por el intestino es esperable que sea más rápido. Al mismo tiempo, el alimento disponible allí es mayoritariamente proteína animal y restos de plantas parcialmente degradados (Capítulo 2), ambos de más fácil absorción que las plantas frescas, lo cual coincide con un tiempo de tránsito corto.

Paralelamente a la diferencia en el tiempo de retención entre alimentos, se encontró una diferencia entre miembros de distintas poblaciones que puede responder también a variaciones en la calidad del alimento, los individuos provenientes de San Antonio tuvieron un pasaje más rápido de ambos tipos de alimento por el tracto digestivo en comparación con los de Mar Chiquita. Varias características de la historia de vida de la población de *N. granulata* de San Antonio parecen estar relacionadas con una limitación en la obtención de energía (Bas et al., 2005; Luppi et al., 2012). Si bien no existe ningún estudio sobre la

extracción de organismos del sedimento cuando *N. granulata* se alimenta en San Antonio, se sabe que el contenido de materia orgánica de ese sedimento (alrededor de 1,4 %) es mucho menor que el hallado en otras poblaciones (por ejemplo: alrededor de 5 % en Mar Chiquita) y, del mismo modo, el contenido de proteína de la especie de *Spartina* predominante en la marisma de San Antonio (*S. alterniflora*), es también menor al medido en hojas de la especie *densiflora* de Mar Chiquita de la misma estación (Bas, com. pers.). Si esto ocurre consistentemente en San Antonio, entonces es esperable un cambio en la estrategia de alimentación de *N. granulata* en esa población, como una respuesta plástica o aún una diferencia genética, que permita compensar una menor calidad o cantidad de alimento. Tal respuesta podría involucrar el procesamiento de un volumen de alimento mayor (probablemente asociado a una actividad enzimática más alta), con la consecuente disminución del tiempo de retención del mismo.

Las variaciones en el tiempo de retención registradas en relación con la temperatura son compatibles con el efecto de la temperatura en el metabolismo de los organismos poiquiloterms, tanto sobre la actividad de las enzimas digestivas como sobre otros procesos metabólicos (Willmer et al., 2000).

El tiempo de retención del alimento registrado para *N. granulata* cae dentro del rango determinado para otras especies de cangrejos herbívoros (Greenaway y Linton, 1995; Greenaway y Raghaven, 1998; Wilde et al., 2004). Las variaciones halladas entre especies parecen responder en gran medida al tipo de moléculas que son finalmente asimiladas. Por ejemplo, *Cardisoma hirtipes* alimentándose de hojas verdes de *Fycus microphylla* presentó un tiempo medio de retención de 3,47 horas pero fue más del doble cuando se alimentó de hojas marrones de la misma planta. En el primer caso, el material asimilado correspondió en un 84% a material celular soluble, fácilmente digerible, mientras que en el segundo, la contribución más sustancial correspondió a celulosa y hemicelulosa, de digestión mucho más dificultosa (Greenaway y Raghaven, 1998). En el caso de *Gecarcoidea natalis* alimentándose de hojas marrones de *Erythrina variegata*, y asimilando mayoritariamente polisacáridos complejos, el tiempo medio de retención fue de 11,6 horas. Finalmente, el mayor tiempo de residencia registrado corresponde al cangrejo ermitaño de los cocoteros, *Birgus latro*, con 27 horas (Wilde et al., 2004). Esta especie, además de su gran tamaño (hasta 3kg de peso), difiere de las anteriores en que consume gran cantidad de grasas, cuya

emulsión y posterior digestión requiere de tiempos largos de retención, lo que podría explicar los valores registrados. Es interesante notar que cuando se ofreció a esta especie una dieta rica en grasas, la asimilación de la celulosa y hemicelulosa alcanzaron valores muy altos, mucho mayores que los hallados con dietas ricas en hidratos de carbono (Wilde et al., 2004), reforzando la idea de que se necesitan tiempos largos para una eficiente digestión de estos compuestos. Los tiempos registrados para *N. granulata*, aun considerando las diferencias entre poblaciones, son compatibles con una utilización, al menos parcial, de los hidratos de carbono estructurales presentes en la dieta, lo cual concuerda con la actividad celulolítica detectada (Capítulo 4). Por otra parte, *N. granulata* no tiene la posibilidad de alimentarse continuamente o por largos períodos como lo hacen especies totalmente terrestres (Capítulo 1), con lo cual una estrategia de rápido pasaje de alimento con retención sólo de los elementos fácilmente asimilables y un consumo de grandes cantidades de materia verde, no sería efectiva para esta especie.

Por su parte la asimilación en peso de hojas verdes de *S. densiflora* alcanzó un valor promedio (54%) algo más alto que los reportados para *G. natalis* alimentándose de hojas marrones (entre 40.9 y 45.7% según la especie) (Greenaway y Linton, 1995), y que *C. hirtipes* alimentándose de hojas verdes (38.9%) (Greenaway y Raghaven, 1998). Sin embargo la gran dispersión de los datos debida a las dificultades del método para recuperar el alimento no ingerido y la totalidad de las heces, y para evitar el lavado del material por su permanencia en el agua, hace que la comparación deba ser tomada con cautela.

El carbono y nitrógeno asimilados son usados por los animales para mantenimiento y crecimiento (Thongtham y Kristensen, 2005). La fracción usada para el mantenimiento es devuelta al ecosistema como metabolitos vía emisiones respiratorias y excreción, y todo el C y N remanente será destinado al crecimiento, incluyendo la expansión de los tejidos, reproducción y muda (Linton y Greenaway, 2000).

La baja proporción de N típicamente encontrada en hojas de plantas superiores y la consecuente alta relación C:N hace que esta fuente de alimento sea considerada limitante en proteína para los herbívoros en general (Mattson, 1980) y para los cangrejos en particular (Linton y Greenaway, 2007). En cangrejos que se alimentan parcialmente de hojas y consumen también sedimento, se ha propuesto incluso que el consumo de hojas sería básicamente un modo de enriquecer el sedimento, lo cual explicaría la utilización de un

alimento de tan baja calidad (Skov y Hartnoll, 2002). En cualquier caso, una fuente alternativa de proteína debería suplir el déficit producido por el consumo de hojas.

Si bien la relación C:N de las hojas de *S. densiflora* (36) resultó mucho más alta que 17, que según algunas estimaciones, es la mínima necesaria para sostener el crecimiento y la reproducción (Skov y Hartnoll, 2002), la asimilación del N fue alta, mayor que la de C, y aparentemente continuó aumentando cuanto mayor fue el tiempo de retención dentro del tracto intestinal. La aparente “pérdida” de N ocurrida cuando los cangrejos fueron alimentados con sedimento, indica que el contenido de N (y C) medido en el sedimento no se relaciona con el efectivamente ingerido por los individuos. Si tenemos en cuenta la capacidad de *N. granulata* de seleccionar efectivamente y acumular los elementos ricos en N presentes en el sedimento, podemos explicar la incongruencia hallada entre los contenidos de N y C de sedimento y heces. Si asumimos una eficiencia de asimilación para el N y C del sedimento igual a la hallada para las hojas, entonces el N de las heces de sedimento representa el 36% del originalmente ingerido (asimilación del 64%), lo que implica que el contenido de N del alimento efectivamente ingerido fue 7 veces mayor que el medido para el sedimento y sólo un 35% menor al contenido de N medido en las hojas, mientras que el C efectivamente ingerido fue 4,5 veces mayor al medido en el sedimento (con una asimilación del 42.5 %), lo que da a su vez una relación C/N para el sedimento efectivamente ingerido de 4.8, mucho mejor que la estimada originalmente para el sedimento de 8.3. Sin embargo, aun considerando que el comportamiento de selección de los cangrejos mejora la calidad del sedimento ingerido, éste sigue teniendo menor contenido neto de N y mucho menor de C que las hojas.

En suma, estos resultados sugieren que la estrategia de alimentación de *N. granulata* incluye la ingestión de hojas verdes de *Spartina* spp. y su retención en el tracto digestivo el tiempo suficiente como para extraer de allí, además de los compuestos solubles de las células, al menos parte de los hidratos de carbono estructurales y una alta proporción de la proteína presente. El posible déficit de N ocasionado por este tipo de dieta es, probablemente, suplementado por aquellos pequeños organismos ricos en N seleccionados del sedimento.

## Figuras

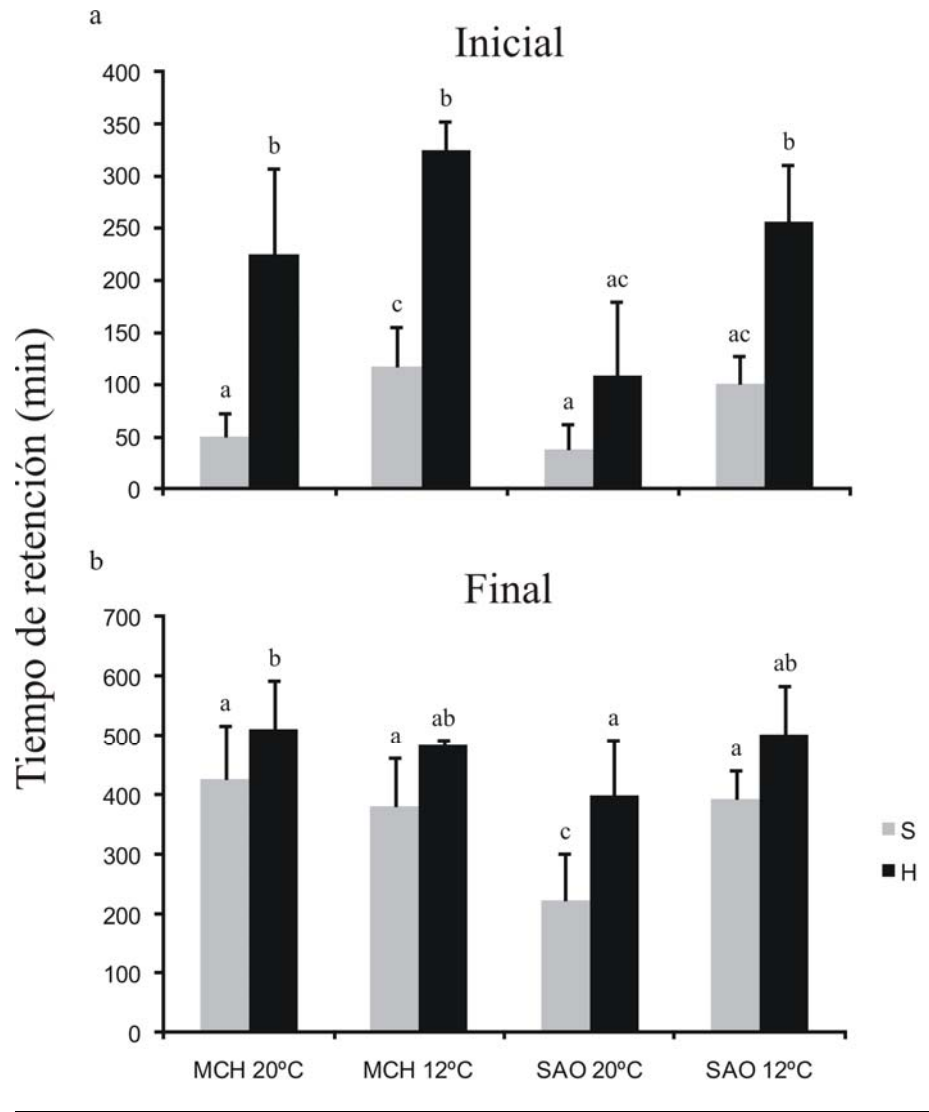


Fig. 5. 1. Tiempos de retención (en minutos) a) inicial y b) final del sedimento (S) y de hojas de *S. densiflora* (H) a 12°C y 20°C de temperatura en cangrejos de *N. granulata* provenientes de las poblaciones de Mar Chiquita (MCH) y San Antonio (SAO).

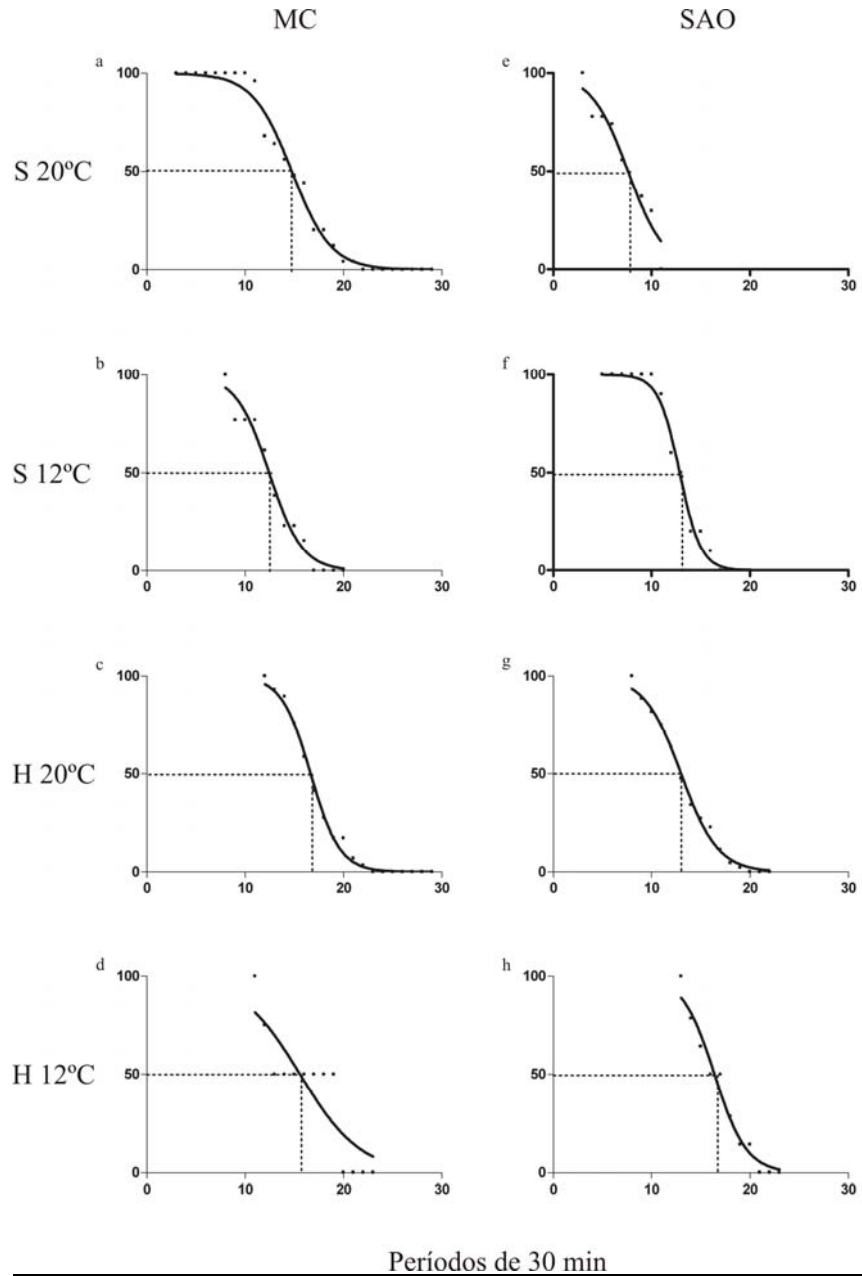


Fig. 5. 2. Tiempos de evacuación 50 (TE<sub>50</sub>) para cangrejos de *N. granulata* provenientes de las poblaciones de Mar Chiquita (MCH), a-d y San Antonio (SAO), e-h alimentados con hojas de *S. densiflora* a dos temperaturas: 20°C, (a, c, e y g) y 12°C (b, d, f y h).

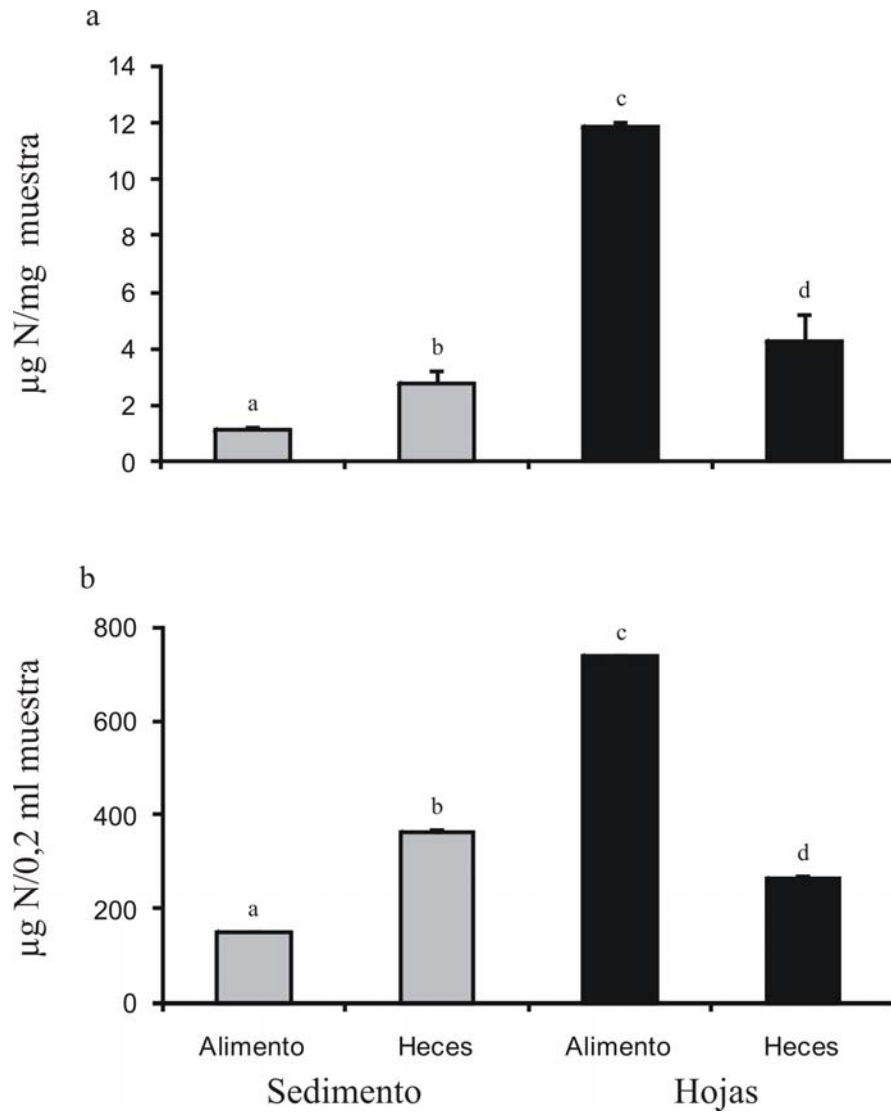


Fig. 5. 3. Concentración de N expresada: a)  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de muestra y b)  $\mu\text{g}$  en  $0,2$  ml de muestra, en sedimento y hojas de *S. densiflora* ofrecidas como alimento y en sus respectivas heces. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

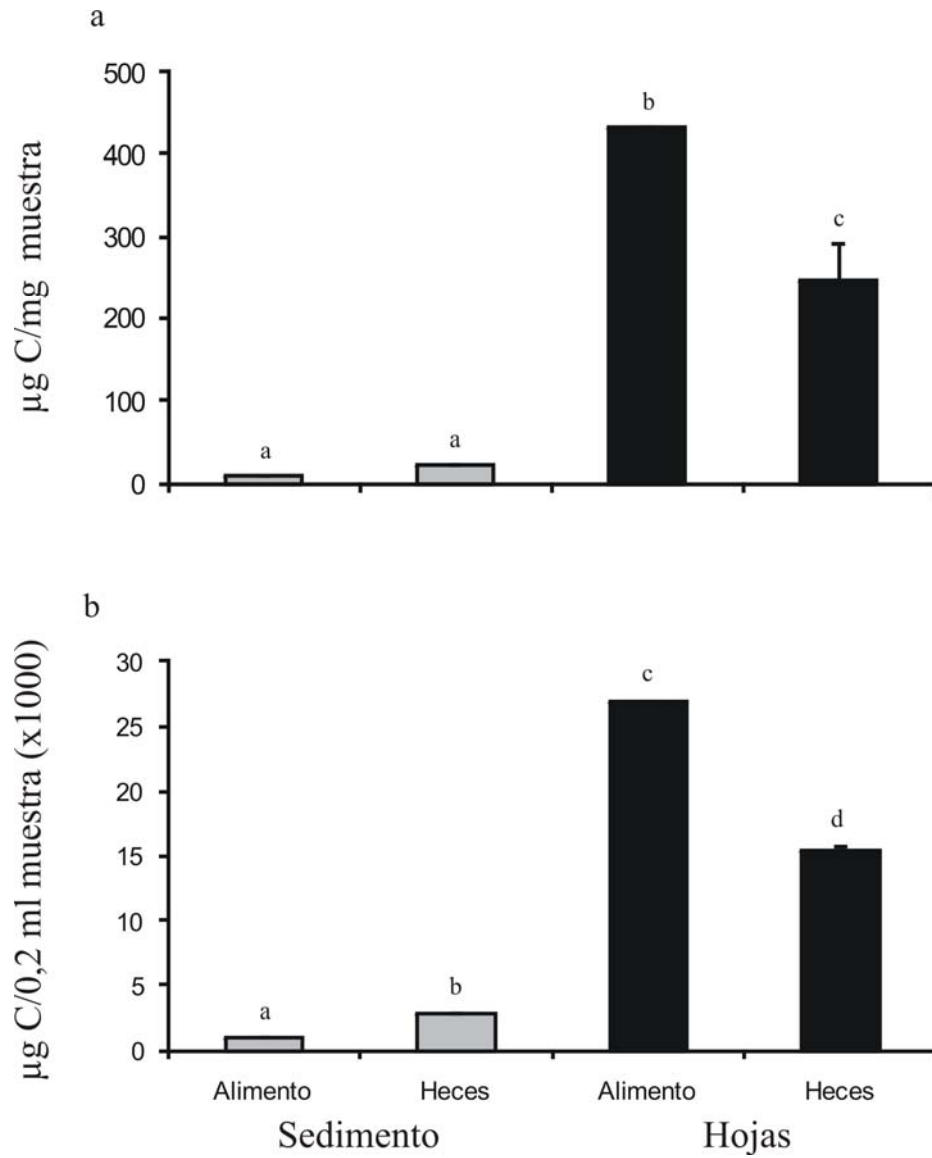


Fig. 5. 4. Concentración de C expresada: a)  $\mu\text{g}$  por mg de muestra y b)  $\mu\text{g}$  en 0,2 ml de muestra, en sedimento y hojas de *S. densiflora* ofrecidas como alimento y en sus respectivas heces. Las diferencias significativas se indican con letras diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0,05$ ).

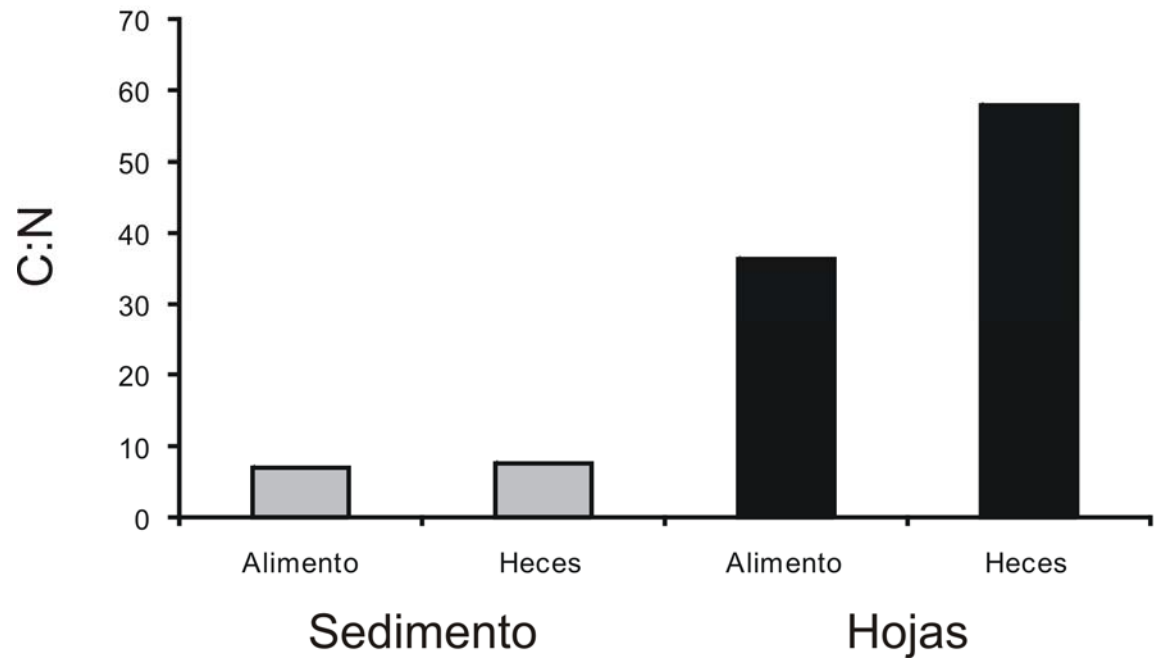


Fig. 5. 5. Relación C:N en sedimento y hojas de *S. densiflora* ofrecidas como alimento y en sus respectivas heces.

## Conclusiones globales sobre el sistema en estudio

El ambiente estuarial se caracteriza por una mezcla continuamente cambiante de agua dulce y salada y por estar dominado por material sedimentario fino de origen marino, fluvial o terrestre, que se acumula formando planicies de barro ricas en alimento pero escasas en oxígeno (McLusky y Michael, 2004). Los estuarios son sistemas heterogéneos: en cada punto de un estuario la salinidad depende de la relación entre los volúmenes de agua de mar y de agua dulce, de la amplitud de mareas, de la topografía y del clima de la localidad, y experimenta variaciones diarias. La mayoría de los estuarios incluye marismas (praderas de *Spartina* spp.) en zonas templadas y manglares en zonas tropicales (McLusky y Michael, 2004).

Los cangrejos (Decapoda: Brachyura) son típicos habitantes del litoral estuarino y su patrón de actividad, su distribución y abundancia están influenciados por muchos factores (físicos y biológicos) que usualmente cambian rítmicamente siguiendo ciclos de marea o diurnos como la disponibilidad de alimentos, los severos estreses fisiológicos de estos ambientes, la diversidad de hábitats, la competencia interespecífica, la exposición a la desecación entre otros (Spivak, 1997; Luppi et al., 2012).

*Neohelice granulata*, como principal habitante de estos ambientes en las costas del Atlántico sudoccidental, presenta una variedad de características comportamentales y fisiológicas flexibles que responden a una serie de restricciones ambientales sobre la alimentación. Estas características podrían resumirse como: una actividad alimentaria plástica, capacidad de seleccionar parcialmente componentes ricos en proteína del sedimento que consume, maduración de ovarios mediante la ingesta mixta de los ítems principales de la dieta, flexibilidad enzimática respecto al alimento que consume, y una estrategia digestiva con tiempos de retención variables según la temperatura y el componente principal de la dieta.

Los cangrejos semiterrestres y terrestres que se alimentan de plantas superiores y sus detritos, habitan generalmente las zonas de manglares tropicales y subtropicales donde ocupan el ambiente intermareal o las áreas internas del manglar (Linton y Greenaway, 2007). En éstas áreas los cangrejos se mueven y se alimentan durante largos períodos, generalmente nocturnos, aunque muchas especies lo hacen también durante el día, trepando

a los árboles o protegidos por las raíces (Goshima, 1978; Micheli et al., 1991). Por otra parte, los detritívoros, principalmente de la familia Ocypodidae, son activos durante los períodos de bajamar, alimentándose hasta que la marea cubre nuevamente las cuevas (Dunham y Gilchrist, 1988). Esto permite, entre otras cosas, una alta tasa de consumo para equilibrar la baja calidad del alimento (Greenaway y Raghaven, 1998).

En respuesta a una presión de predación por parte de predadores generalmente visuales, como las aves que habitan las marismas, y al peligro de desecación debido a la insolación, la mayoría de los cangrejos adultos de *N. granulata* de todos los sitios y hábitats estudiados se alimentaron preferentemente en la oscuridad y durante las mareas altas que llegan a cubrir la zona de marisma, o inmediatamente después de las mareas altas cuando el sedimento permanecía húmedo en la planicie de marea (Capítulo 1). Esto implica períodos de alimentación efectiva probablemente más cortos que los de otras especies de hábitos similares. Por otra parte, dada la gran influencia de las mareas y la desecación, *N. granulata* se ve frecuentemente expuesto a largos períodos (horas a días) sin alimentarse, debido a la combinación de mareas de escasa altura y altas temperaturas. Probablemente en relación con esta presión ambiental, esta especie ha desarrollado su gran capacidad de tolerancia al ayuno (Vinagre y Da Silva, 2002).

Al mismo tiempo, dado que estos cangrejos no se alejan demasiado de sus cuevas (Luppi et al., 2012), han equilibrado éstas restricciones en el movimiento adoptando la capacidad de alimentarse del ítem más cercano que, dependiendo de la zona de la marisma que está ocupando, puede ser sedimento u hojas de *S. densiflora* principalmente. Esta capacidad, a su vez, es respaldada por una gran flexibilidad enzimática, dependiendo del tipo de alimento que es consumido, como fue descrito en el Capítulo 4.

Además de una considerable plasticidad en las estrategias digestivas (variación de las tasas de consumo, tiempos de retención, y consecuentemente la asimilación de nutrientes), los cangrejos herbívoros comparten una serie de rasgos característicos de su historia de vida que los definen como un grupo adaptado a la alimentación de plantas, es decir, una dieta pobre en N; éstas incluyen un crecimiento lento y consecuentemente longevidad, una baja frecuencia de actividad reproductiva, gran tamaño corporal con sus consecuentes bajas tasas metabólicas y requerimientos de N mínimos, y separación temporal de actividades con gran demanda de N (oogenesis y muda) (Linton y Greenaway,

2007). Las características morfológicas, de crecimiento e historia de vida de *N. granulata* no se corresponden estrechamente con ese conjunto de características ya que presentan una talla máxima moderada, de alrededor de 30 mm de ancho de caparazón (Spivak et al., 1994) y una longevidad estimada de 3 años (Kittlein et al., 2000; Luppi et al., 2004). Por otra parte, la muda de los adultos ocurre mayoritariamente fuera del período reproductivo (López Greco y Rodríguez, 1998) y la maduración completa de los ovarios no es posible mientras las hembras están cargando embriones en su abdomen (Ituarte et al., 2004), sugiriendo limitaciones energéticas. Las características comportamentales y fisiológicas aquí estudiadas, se corresponden con las de un animal con un tipo de alimentación generalista u omnívora, dado que comparte algunas características de una especie netamente herbívora, (como su capacidad de digerir la celulosa en todas sus formas, alimentándose en algunos casos casi exclusivamente de plantas, y un volumen estomacal comparativamente grande) y otras de una especie depredadora (como seleccionar e ingerir pequeños animales del sedimento y por tasas a veces altas de canibalismo). La omnivoría es un estilo de vida trófico mucho más común de lo que se creía previamente en muchas especies de invertebrados y vertebrados. Los omnívoros a menudo poseen una mezcla de rasgos morfológicos, fisiológicos y comportamentales característicos de los estrictamente depredadores, y otros rasgos que poseen los estrictamente herbívoros (Barbosa y Castellanos, 2005). La mezcla de dieta, en donde la calidad nutricional de un tipo de comida (por ejemplo: material vegetal) es aumentada por la ingesta de otro tipo de alimento (por ejemplo: material animal), ocurre en muchas especies omnívoras y pueden afectar fuertemente su fitness (Barbosa y Castellanos, 2005).

Si bien se considera que las dietas herbívoras son limitantes en N (Mattson, 1980; Linton y Greenaway, 2007), algunos cangrejos herbívoros parecen, sin embargo, poder desarrollar su ciclo de vida completo alimentándose exclusivamente de hojas caídas de mangle, como lo indican las estimaciones de forrajeo y de los requerimientos mínimos de N para el crecimiento, la muda y la reproducción del gecarcínido *Gecarcoidea natalis* (Linton y Greenaway, 2000). En el caso de *N. granulata*, la restricción de N parece existir, ya que las hembras alimentadas con un solo tipo de dieta (hojas de *S. densiflora*, o sedimento), no pudieron remadurar sus ovarios, mientras que aquellas alimentadas con la dieta mixta o un alimento con exceso de proteína, cumplieron la remaduración de manera exitosa (Capítulo

3). Los requerimientos de N de las hembras durante la oogénesis es la suma del requerimiento de N normal de mantenimiento más la cantidad de N requerido para la maduración de los ovarios. La cantidad de N necesaria para la oogénesis puede ser substancial, dado que la masa de huevos en los cangrejos braquiuros constituye aproximadamente el 10% del peso seco corporal de la hembra (Hines, 1982; 1991) y el principal componente del vitelo son lipoproteínas (Harrison y Humes, 1992).

El modelo de digestión óptima establece que cuando los animales consumen alimentos nutricionalmente de baja calidad, ellos deben ingerir mayor cantidad de esa comida (Sibly, 1981). En el caso de *N. granulata*, dadas las limitaciones que parecen existir en los tiempos de forrajeo, esa compensación en el volumen de ingesta posiblemente no sea aplicable. El modelo asume además, que el proceso digestivo maximiza la tasa a la cual la energía es obtenida por digestión. Para un volumen estomacal dado, un alimento de calidad alta debería ser retenido por períodos de tiempo más cortos que alimentos de calidad menor. Así, el grado (o eficiencia) de la reacción (hidrólisis, absorción, etc.) está positivamente relacionada a la concentración de enzimas y/o sustrato y el tiempo de retención de la comida en el estómago; el tiempo de retención por sí mismo, está positivamente relacionado con el volumen estomacal e inversamente relacionado al flujo de comida a través del estómago. En el caso de *N. granulata*, el sedimento permanece menos tiempo que las hojas de *S. densiflora* (Capítulo 5), posiblemente en relación con el mayor contenido de energía y menor relación C:N, no del volumen total de material ingerido, sino de los componentes digeribles de ese sedimento. Los organismos seleccionados activamente por los cangrejos exigen menor tiempo de procesamiento mecánico y enzimático en el aparato digestivo que los componentes celulares y estructurales de las plantas. Al mismo tiempo, la actividad proteolítica cuando éstos cangrejos se alimentan de plantas es muy alta, lo que permitiría extraer de ellas el poco contenido de proteínas disponible en esta fuente de alimento.

Las especies de crustáceos tanto estuariales como semiterrestres, terrestres y de agua dulce provienen de ancestros marinos (Anger, 1995). En el caso de *N. granulata*, su capacidad de colonizar el ambiente intermareal y supramareal, frecuentemente de salinidad variable, debió estar asociado seguramente con su capacidad de tolerar variaciones en la salinidad (Castilho et al., 2001) y de poder respirar fuera del agua (Halperin et al., 2004),

pero también seguramente estuvo asociada a su capacidad de consumir plantas superiores como fuente de alimento principal, al mismo tiempo que podía procesar cantidades relativamente grandes de sedimento para obtener el complemento necesario a una dieta escasa en N.

## Bibliografía

- Aagaard, A., Warman, C.G. y Depledge, M.H., 1995. Tidal and seasonal changes in the temporal and spatial distribution of foraging *Carcinus maenas* in the weakly tidal littoral zone of Kerteminde Fjord, Denmark. *Marine Ecology Progress Series*, 122: 165-172.
- Aguzzi, J., Company, J.B. y Sardà, F., 2004. Feeding activity rhythm of *Nephrops norvegicus* of the western Mediterranean shelf and slope grounds. *Marine Biology*, 144: 463-472.
- Alberti, J., Escapa, M., Daleo, P., Iribarne, O., Silliman, B. y Bertness, M., 2007a. Local and geographic variation in grazing intensity by herbivorous crabs in SW Atlantic salt marshes. *Marine Ecology Progress Series*, 349: 235-243.
- Alberti, J., Montemayor, D., Álvarez, F., Méndez Casariego, A., Luppi, T., Canepuccia, A., Isacch, J.P. y Iribarne, O., 2007b. Changes in rainfall pattern affect crab herbivory rates in a SW Atlantic salt marsh. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353: 126-133.
- Allardyce, B.J. y Linton, S.M., 2008. Purification and characterisation of endo- $\beta$ -1,4-glucanase and laminarinase enzymes from the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* and the aquatic crayfish *Cherax destructor*. *The Journal of Experimental Biology*, 211: 2275-2287.
- Anger, K., 1995. The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 193: 119-145.
- Barbosa, P. y Castellanos, I., 2005. Ecology of predator-prey interactions. Oxford University Press, Inc., New York, 413 pp.
- Barnes, R.D. y Harrison, F.W., 1992. Introduction to the Decapoda. In: F.W. Harrison and A.G. Humes (Editors), *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 1-6.
- Bas, C., Luppi, T. y Spivak, E., 2005. Population structure of the South American estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae) near the southern limit of

- its geographical distribution: comparison with northern populations. *Hydrobiologia*, 537: 217-228.
- Bas, C.C. y Spivak, E.D., 2000. Effect of salinity on embryos of two southwestern Atlantic estuarine grapsid crab species cultured in vitro. *Journal of Crustacean Biology*, 20(4): 647-656.
- Begon, M., Townsend, C.R. y Harper, J.L., 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 746 pp.
- Bernfeld, P., 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. In: F.F. Nord (Editor), *Advances in Enzymology*. Interscience Publications inc., New York, pp. 379-424.
- Bortolus, A. y Iribarne, O., 1999. Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Marine Ecology Progress Series*, 178: 79-88.
- Bortolus, A., Laterra, P. y Iribarne, O., 2004. Crab-mediated phenotypic changes in *Spartina densiflora* Brong. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 59: 97-107.
- Botto, F., Iribarne, O., Gutierrez, J., Bava, J., Gagliardini, A. y Valiela, I., 2006. Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 201-210.
- Botto, F., Valiela, I., Iribarne, O., Martinetto, P. y Alberti, J., 2005. Impact of burrowing crabs on C and N sources, control, and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Marine Ecology Progress Series*, 293: 155-164.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M. y West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7): 1771-1789.
- Buck, T.L. et al., 2003. Diet choice in an omnivorous salt-marsh crab: different food types, body size, and habitat complexity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292: 103-116.
- Canepuccia, A.D., Fanjul, M.S., Fanjul, E., Botto, F. y Iribarne, O., 2008. The intertidal burrowing crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* positively affects foraging

- of rodents in south western Atlantic salt marshes. *Estuaries and Coasts*, 31: 920-930.
- Cannicci, S., Dahdouh-Guebas, F., Anyona, D. y Vannini, M., 1996. Natural diet and feeding habits of *Thalamita crenata* (Decapoda: Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 16(4): 678-683.
- Cannicci, S., Paula, J. y Vannini, M., 1999. Activity pattern and spatial strategy in *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda: Grapsidae) from Mediterranean and Atlantic shores. *Marine Biology*, 133: 429-435.
- Carrillo, O.F. y González, R., 2000. Control de la digestión en camarones. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie and L.-E. Cruz-Suarez (Editors), *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B. C. S. Mexico.
- Castilho, P.C., Martins, I.A. y Bianchini, A., 2001. Gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 256: 215-227.
- Coccia, E., Varricchio, E. y Paolucci, M., 2011. Digestive enzymes in the crayfish *Cherax albidus* : Polymorphism and partial characterization. *International Journal of Zoology* (ID 310371): 1-9.
- Covelo de Zolessi, L. y Spiritoso, A.E., 1985. Contribucion al estudio de la anatomia del aparato digestivo de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Revista de la Facultad de Humanidades y Ciencias (Serie Ciencias Biológicas, 3ª época)*, 1(4): 33-60.
- Crawford, A.C., 2006. Evolution and function of cellulase genes in Australian freshwater crayfish. Doctor of Philosophy Thesis, Queensland University of Technology, Queensland, 153 pp.
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. y Van Wormhoudt, A., 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp. In: L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M.A. Olvera Novoa and R. Civera Cerecedo (Editors), *Avances en Nutrición Acuícola V: Memorias del Quinto Simposio Internacional de Nutrición y*

- Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. México, Mérida Yucatán, México, pp. 328-339.
- D' Incao, F., Silva, K.G., Ruffino, M.L. y Braga, A.C., 1990. Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlantica*, 12(2): 85-93.
- Dahdouh-Guebas, F., Giuggioli, M., Oluoch, A., Vannini, M. y Cannicci, S., 1999. Feeding habits of non-Ocypodid crabs from two mangrove forests in Kenia. *Bulletin of Marine Science*, 64(2): 291-297.
- Daleo, P. y Iribarne, O., 2009. The burrowing crab *Neohelice granulata* affects the root strategies of the cordgrass *Spartina densiflora* in SW Atlantic salt marshes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 373: 66-71.
- Dall, W. y Moriarty, D.J.W., 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. In: D.E. Bliss and L.H. Mantel (Editors), *The biology of Crustacea: Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press, New York, pp. 215-261.
- Davison, A. y Blaxter, M., 2005. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5): 1273-1284.
- del Mar, E., Largman, C., Brodrick, J. y Geokas, M., 1979. A sensitive new substrate from chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99: 316-320.
- Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M.A., 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus*. *Invertebrate Biology*, 125(2): 125-135.
- Drach, P. y Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie Milieu*, 18: 595-607.
- Dunham, D.W. y Gilchrist, S.L., 1988. Behavior. In: W.W. Burggren and B.R. McMahon (Editors), *Biology of the land crabs*. Cambridge University Press, New York, pp. 479.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N. y Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.

- Escapa, M., Minkoff, D.R., Perillo, G.M.E. y Iribarne, O., 2007. Direct and indirect effects of burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* activities on erosion of southwest Atlantic *Sarcocornia*-dominated marshes. *Limnology and Oceanography*, 52(6): 2340-2349.
- Fanjul, E., Grela, M.A., Canepuccia, A. y Iribarne, O., 2008. The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79: 300-306.
- Fathala, M., Iribarren, L., Kunert, M.C. y Maldonado, H., 2010. A field model of learning: 1. Short-term memory in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 196: 61-75.
- Felgenhauer, B.E., 1992. Internal anatomy of the decapoda: An overview. In: F.W. Harrison and A.G. Humes (Editors), *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 45-75.
- Fernández-Gimenez, A.V., Díaz, A.C., Velurtas, S.M. y Fenucci, J.L., 2009. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, Penaeidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6): 1379-1386.
- Fernández-Gimenez, A.V., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A. y Fenucci, J.L., 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130: 331-338.
- Fernández-Gimenez, A.V., García-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, M.A. y Fenucci, J.L., 2002. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132: 593-598.
- Fernández, M., Bock, C. y Pörtner, H.-O., 2000. The cost of being a caring mother: the ignored factor in the reproduction of marine invertebrates. *Ecology Letters*, 3: 487-494.
- Figueiredo, M.S.R.B. y Anderson, A.J., 2009. Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Portunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat. *Aquaculture Research*, 40: 282-291.

- García-Carreño, F.L., 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 103(3): 575-578.
- García-Carreño, F.L. y Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17: 97-113.
- García-Carreño, F.L. y Hernández-Cortés, M.P., 1996. Enzymes from the digestive system of shrimp. I. State of the art and future trends in protein digestion.
- García-Carreño, F.L. y Navarrete del Toro, M.A., 1997. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, 25(3): 161-167.
- Garm, A. y Høeg, J.T., 2001. Function and functional groupings of the complex mouth apparatus of the squat lobsters *Munida sarsi* Huus and *M. tenuimana* G.O. Sars (Crustacea: Decapoda). *Biological Bulletin*, 200: 281-297.
- González Trilla, G., 2010. Patrones de biomasa de *Spartina spp.* en dos marismas costeras de la provincia de Buenos Aires, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, 145 pp.
- Goshima, S., 1978. Daily activity and movement of the land crab, *Cardisoma hirtipes* DANA, by radio-telemetry during non-breeding season. *Publications from the Amakusa Marine Biological Laboratory*, 4(3): 175-187.
- Greenaway, P. y Linton, S.M., 1995. Dietary assimilation and food retention time in the herbivorous terrestrial crab *Gecarcoidea natalis*. *Physiological Zoology*, 68(6): 1006-1028.
- Greenaway, P. y Raghaven, S., 1998. Digestive strategies in two species of leaf-eating land crabs (Brachyura: Gecarcinidae) in a rain forest. *Physiological Zoology*, 71(1): 36-44.
- Griffen, B.D. y Mosblack, H., 2011. Predicting diet and consumption rate differences between and within species using gut ecomorphology. *Journal of Animal Ecology*, 80(4): 854-863.
- Halperin, J., Genovese, G., Tresguerresa, M. y Luquet, C.M., 2004. Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* by dopamine and cAMP. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 139: 103-109.

- Harrison, F.W. y Humes, A.G., 1992. Microscopic anatomy of invertebrates, 10. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Hartnoll, R.G., 1974. Variation in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda. Brachyura). *Crustaceana*, 27(2): 131-136.
- Hartnoll, R.G., 2006. Reproductive investment in Brachyura. *Hydrobiologia*, 557: 31-40.
- Hasek, B.E. y Felder, D.L., 2005. Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. reticulatum* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 140: 455-463.
- Hegele-Drywa, J. y Normant, M., 2009. Feeding ecology of the American crab *Rhithropanopeus harrisi* (Crustacea, Decapoda) in the coastal waters of the Baltic Sea. *Oceanologia*, 51(3): 361-375.
- Hines, A.H., 1982. Allometric constraints and variables of reproductive effort in brachyuran crabs. *Marine Biology*, 69: 309-320.
- Hines, A.H., 1991. Fecundity and reproductive output in nine species of *Cancer* crabs (Crustacea, Brachyura, Cancridae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 267-275.
- Hopkin, S.P. y Nott, J.A., 1980. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60: 891-907.
- Huey, R.B., 1991. Physiological consequences of habitat selection. *The American Naturalist*, 137: S91-S115.
- Icely, J.D. y Nott, J.A., 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. In: F.W. Harrison and A.G. Humes (Editors), *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss Inc, New York, pp. 147-201.
- Iribarne, O., Bortolus, A. y Botto, F., 1997. Between-habitat differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. *Marine Ecology Progress Series*, 155: 137-145.
- Iribarne, O., Bruschetti, M., Escapa, M., Bava, J., Botto, F., Gutierrez, J., Palomo, G., Delhey, K., Petracci, P. y Gagliardini, A., 2005. Small- and large-scale effect of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on habitat use by

- migratory shorebirds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 315: 87-101.
- Isacch, J.P., Costa, C.S.B., Rodriguez-Gallego, L., Conde, D., Escapa, M., Gagliardini, D.A. y Iribarne, O., 2006. Distribution of saltmarsh plant communities associated with environmental factors along a latitudinal gradient on the south-west Atlantic coast. *Journal of Biogeography*, 33: 888-900.
- Ituarte, R.B., Bas, C., Luppi, T.A. y Spivak, E.D., 2006. Interpopulational differences in the female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina*, 70(4): 709-718.
- Ituarte, R.B., Spivak, E.D. y Luppi, T.A., 2004. Female reproductive cycle of the Southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae). *Scientia Marina*, 68(1): 127-137.
- Johnston, D. y Freeman, J., 2005. Dietary preference and digestive enzyme activities as indicators of trophic resource utilization by six species of crab. *Biological Bulletin*, 208: 36-46.
- Karasov, W.H. y Diamond, J.M., 1988. Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience*, 38(9): 602-611.
- Karasov, W.H. y Martínez del Rio, C., 2007. *Physiological ecology. How animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton University Press, New Jersey, 741 pp.
- Kennish, R., 1996. Diet composition influences the fitness of the herbivorous crab *Grapsus albolineatus*. *Oecologia*, 105: 22-29.
- Kingsolver, J.G., 1989. Weather and the population dynamics of insects: Integrating physiological and population ecology. *Physiological Zoology*, 62(2): 314-334.
- Kittlein, M., Luppi, T., Bas, C. y Spivak, E., 2000. Estimación de la relación talla-edad en *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae) mediante un modelo de crecimiento discontinuo, Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, pp. 79.
- Kostanjsek, R., Milatovic, M. y Strus, J., 2010. Endogenous origin of endo- $\beta$ -1,4-glucanase in common woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Journal of Comparative Physiology B*, 180: 1143-1153.

- Krol, R.M., Hawkins, W.E. y Overstreet, R.M., 1992. Reproductive components. In: F.W. Harrison and A.G. Humes (Editors), *Microscopic anatomy of invertebrates*. Wiley-Liss Inc, New York, pp. 295-343.
- Kucharski, L.C. y Da Silva, R.S.M., 1991a. Seasonal variation in the energy metabolism in a estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 100(3): 599-602.
- Kucharski, L.C.R. y Da Silva, R.S.M., 1991b. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 99: 215-218.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature London*, 227: 680-685.
- Lancia, J.P., Fernández Gimenez, A., Bas, C. y Spivak, E., 2012. Adaptive differences in digestive enzyme activity in the crab *Neohelice granulata* in relation to sex and habitat. *Journal of Crustacean Biology*, 32(6): 940-948.
- Le Boulay, C., Van Wormhoudt, A. y Sellos, D., 1996. Cloning and expression of cathepsin-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermoult cycle. *Journal of Comparative Physiology B*, 166: 310-318.
- Lee, S.Y., 1995. Cheliped size and structure: the evolution of a multi-functional decapod organ. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 193: 161-176.
- Lee, S.Y. y Seed, R., 1992. Ecological implications of cheliped size in crabs: some data from *Carcinus maenas* and *Liocarcinus holsatus*. *Marine Ecology Progress Series*, 84: 151-160.
- Lim, S.S.L., 2004. A comparative study of some mouthpart adaptations of *Uca annulipes* (H. Milne Edwards, 1837) and *U. vocans* (Linnaeus, 1758) (Brachyura, Ocypodidae) in relation to their habitats. *Crustaceana*, 77(10): 1245-1251.
- Linton, S.M., Allardyce, B.J., Hagen, W., Wencke, P. y Saborowski, R., 2009. Food utilisation and digestive ability of aquatic and semi-terrestrial crayfishes, *Cherax destructor* and *Engaeus sericatus* (Astacidae, Parastacidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 179: 493-507.

- Linton, S.M. y Greenaway, P., 2000. The nitrogen requirements and dietary nitrogen utilization for the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73(2): 209-218.
- Linton, S.M. y Greenaway, P., 2004. Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 4095-4104.
- Linton, S.M. y Greenaway, P., 2007. A review of feeding and nutrition of herbivorous land crabs: adaptations to low quality plant diets. *Journal of Comparative Physiology B*, 177: 269-286.
- Linton, S.M., Greenaway, P. y Towle, D.W., 2006. Endogenous production of endo- $\beta$ -1,4-glucanase by decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 339-348.
- Lo, N., Watanabe, H. y Sugimura, M., 2003. Evidence for the presence of a cellulase gene in the last common ancestor of bilaterian animals. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: S69-S72.
- Lomovasky, B.J., Mendez Casariego, A., Brey, T. y Iribarne, O., 2006. The effect of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on the intertidal razor clam *Tagelus plebeius*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337: 19-29.
- Lopez, G.R. y Levinton, J.S., 1987. Ecology of deposit-feeding animals in marine sediments. *The Quarterly Review of Biology* 62(3): 235-260.
- López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M., 1998. Size at the onset of sexual maturity in *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Grapsidae, Sesarminae): a critical overall view about the usual criteria for its determination. In: F.R. Schram and J.C. Von Vaupel Klein (Editors), *Crustaceans and the biodiversity crisis: Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*. Brill Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 675-689.
- Luppi, T., Bas, C., Méndez Casariego, A., Albano, M., Lancia, J., Kittlein, M., Rosenthal, A., Farias, N., Spivak, E. y Iribarne, O., 2012. The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgoland Marine Research*, In press.

- Luppi, T.A., Spivak, E.D., Bas, C.C. y Anger, K., 2004. Molt and growth of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae), in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Journal of Applied Ichthyology*, 20: 333-344.
- Mann, K.H., 1988. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33(4(2)): 910-930.
- Martin, M.M., 1991. The evolution of cellulose digestion in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 333: 281-288.
- Martinetto, P., Iribarne, O. y Palomo, G., 2005. Effect of fish predation on intertidal benthic fauna is modified by crab bioturbation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318: 71-84.
- Martinetto, P., Valiñas, M., Palomo, G. y Iribarne, O., 2007. Negative interactions between two SW Atlantic intertidal crabs in soft-bottom habitats. *Marine Biology*, 151: 1479-1490.
- Mascaró, M., Castillo, A., Simoes, N. y Chiappa-Carrara, X., 2007. Variations in the feeding habits of *Callinectes rathbunae* in Las Palmas lagoon (Southern Gulf of Mexico) on three temporal scales. *Crustaceana*, 80: 139-160.
- Mattson, W.J., 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11: 119-161.
- McLusky, D.S. y Michael, E., 2004. *The estuarine ecosystem: Ecology, threats, and management*. Oxford University Press Inc., New York, 223 pp.
- McTigue, T.A. y Feller, R.J., 1989. Feeding of juvenile white shrimp *Penaeus setiferus*: periodic or continuous? *Marine Ecology Progress Series*, 52: 227-233.
- Micheli, F., 1993. Effect of mangrove litter species and availability on survival moulting, and reproduction of the mangrove crab *Sesarma messa*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 171: 149-163.
- Micheli, F., Gherardi, F. y Vannini, M., 1991. Feeding and burrowing ecology of two East African mangrove crabs. *Marine Biology*, 111: 247-254.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A. y García-Carreño, F.L., 2008. Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 178: 655-672.

- Navarrete del Toro, M.D.L.A., García-Carreño, F.L., Lopez, M.D., Celis-Guerrero, L. y Saborowski, R., 2006. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 305A: 645-654.
- Negreiros-Fransozo, M.L. y Fransozo, V., 2003. A morphometric study of the mud crab, *Panopeus austrobesus* Williams. 1983 (Decapoda. Brachyura) from a subtropical mangrove in South America. *Crustaceana*, 76(3): 281-294.
- Neilson, M.J., Giddins, R.L. y Richards, G.N., 1986. Effect of tannins on the palatability of mangrove leaves to the tropical sesarminid crab *Neosarmatium smithi*. *Marine Ecology Progress Series*, 34: 185-186.
- Nelson, K., 1991. Scheduling of reproduction in relation to molting and growth in malacostracan crustaceans. In: A. Wenner and A. Kuris (Editors), *Crustacean Egg Production, Crustacean Issues 7*. Balkema, Rotterdam, pp. 77-113.
- Nordhaus, I., Wolff, M. y Diele, K., 2006. Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 239-250.
- Norman, G. y Streiner, D., 1996. *Bioestadística*. Harcourt, Madrid.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C. y Da Silva, R.S.M., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 137: 383-390.
- Palomo, G., Martinetto, P. y Iribarne, O., 2004. Changes in the feeding behavior of the deposit-feeding polychaete *Laeonereis acuta* on soft sediments inhabited by burrowing crabs. *Marine Biology*, 145: 657-667.
- Paul, R.K.G., 1981. Natural diet, feeding and predatory activity of the crabs *Callinectes arcuatus* and *C. toxotes* (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Marine Ecology Progress Series*, 6: 91-99.
- Pavasovic, A., 2008. Evaluation of the nutritional requirements of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* Doctorate Thesis, Queensland University of Technology, Queensland, 179 pp.
- Pavasovic, A., Richardson, N.A., Mather, P.B. y Anderson, A.J., 2006. Influence of insoluble dietary cellulose on digestive enzyme activity, feed digestibility and

- survival in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Research*, 37: 25-32.
- Pavasovic, M., Richardson, N.A., Anderson, A.J., Mann, D. y Mather, P.B., 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 242: 641-654.
- Pinoni, S.A., Iribarne, O. y López Mañanes, A.A., 2011. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 158: 552-559.
- Robertson, R.J. y Newell, S.Y., 1982. A study of particle ingestion by three fiddler crab species foraging on sandy sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 65: 11-17.
- Ryer, C.H., 1987. Temporal patterns of feeding by blue crabs (*Callinectes sapidus*) in a tidal-marsh creek and adjacent seagrass meadow in the lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, 10(2): 136-140.
- Sakai, K., Türkay, M. y Si-Liang, Y., 2006. Revision of the Helice/Chasmagnathus complex. (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*, 565: 1-76.
- Santos, E.A. y Nery, L.E.M., 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus Granulata* (dana, 1851) exposed to different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 87(4): 1033-1035.
- Sal Moyano, M.P. y Gavio, M.A., 2012. Comparison of mating behavior and copulation in male morphotypes of the spider crab *Libinia spinosa* (Brachyura: Majoidea: Epialtidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(1): 31-38.
- Sayão-Aguiar, B., Amaro Pinheiro, M.A. y Develati Colpo, K., 2012. Sediment bioturbation potential of *Uca rapax* and *Uca uruguayensis* as a result of their feeding activity. *Journal of Crustacean Biology*, 32(2): 223-229.
- Seiple, W. y Salmon, M., 1982. Comparative social behavior of two grapsid crabs, *Sesarma reticulatum* (Say) and *S. cinereum* (Bosc). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 62: 1-24.

- Sibly, R.M., 1981. Strategies of digestion and defecation. In: C.R. Townsend and P. Calow (Editors), *Physiological Ecology: an evolutionary approach to resource use*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 109-139.
- Skov, M.W. y Hartnoll, R.G., 2002. Paradoxical selective feeding on a low-nutrient diet: why do mangrove crabs eat leaves? *Oecologia*, 131: 1-7.
- Sokal, R. y Rohlf, J., 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume, Madrid, 775 pp.
- Spivak, E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C. y Ismael, D., 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 48: 59-78.
- Spivak, E.D., 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°- 41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investigaciones Marinas, Valparaíso*, 25: 105-120.
- Spivak, E.D., 2010. The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64: 149-154.
- Spivak, E.D., Silva, P.V. y Luppi, T.A., 2012. Habitat related variation in reproductive traits among intertidal crabs from the Southwestern Atlantic. *Journal of Crustacean Biology*, 32(1): 57-66.
- Stauffer, C., 1989. Effect of pH on activity. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostrand Reinhold, New York: 61-76.
- Stephens, D.W., Brown, J.S. y Ydenberg, R.C., 2007. *Foraging : behavior and ecology*. The University of Chicago Press, Chicago, 626 pp.
- Strauss, R.E., 1979. Reliability estimates for Ivlev's electivity index, the forage ratio, and a proposed linear index of food selection. *Transactions of the American Fisheries Society*, 108: 344-352.
- Teschke, M. y Saborowski, R., 2005. Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of *Crangon crangon* and *Crangon allmani* (Decapoda: Caridea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316: 213-229.
- Thongtham, N. y Kristensen, E., 2005. Carbon and nitrogen balance of leaf-eating sesarmid crabs (*Neopisesarma versicolor*) offered different food sources. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65: 213-222.

- Thongtham, N., Kristensen, E. y Puangprasan, S.-Y., 2008. Leaf removal by sesarmid crabs in Bangrong mangrove forest, Phuket, Thailand; with emphasis on the feeding ecology of *Neopisesarma versicolor*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80: 573-580.
- Traut, B.H., 2005. The role of coastal ecotones: a case study of the salt marsh/upland transition zone in California. *Journal of Ecology*, 93: 279-290.
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Civera, R., 1993. The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I- properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 106(3): 547-550.
- Verardo, D.J., Froelich, P.N. y McIntyre, A., 1990. Determination of organic carbon and nitrogen in marine sediments using the Carlo Erba NA-1500 analyzer. *Deep Sea Research*, 37(1): 157-165.
- Vinagre, A.S. y Da Silva, R.S.M., 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Canadian Journal of Zoology*, 80: 1413-1421.
- vonElert, E., Agrawal, M.K., Gebauer, C., Jaensch, H., Bauer, U. y Zitt, A., 2004. Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 137: 287-296.
- Warner, G.F., 1977. *The biology of crabs*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Watanabe, H. y Tokuda, G., 2001. Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1167-1178.
- Watanabe, H. y Tokuda, G., 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 609-632.
- Wilde, J.E., Linton, S.M. y Greenaway, P., 2004. Dietary assimilation and the digestive strategy of the omnivorous anomuran land crab *Birgus latro* (Coenobitidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 174: 299-308.
- Willmer, P., Stone, G. y Johnston, I., 2000. *Environmental physiology of animals*. John Wiley and Sons Ltd, Oxford, 644 pp.
- Wolcott, D.L. y O'Connor, N.J., 1992. Herbivory in crabs: Adaptations and ecological considerations. *American Zoologist*, 32(3): 370-381.

- Wolfrath, B., 1992. Field experiments on feeding of European fiddler crab *Uca tangeri*. Marine Ecology Progress Series, 90: 39-43.
- Xue, X.M., Anderson, A.J., Richardson, N.A., Anderson, A.J., Xue, G.P. y Mather, P.B., 1999. Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) Aquaculture, 180: 373-386.
- Zimmer, M. y Bartholmé, S., 2003. Bacterial endosymbionts in *Asellus aquaticus* (Isopoda) and *Gammarus pulex* (Amphipoda) and their contribution to digestion. Limnology and Oceanography, 48(6): 2208-2213.