

MESURA DEL SISTEMA RESPIRATORI DE TRANSPORT D'ELECTRONS (ETS) DELS ORGANISMES

Ted Packard,* Josep Anton Morguí ** i Josep Peñuelas **

Rebut: juliol de 1988

SUMMARY

The measurement of respiratory electron transport system (ETS) of organisms

The analysis of the respiratory capacity of electron transport in organisms is described as an index of ecosystems potential catabolism and biomass. The structure and function of electron transport system, the relation between ETS and actual respiration, the results interpretation, the usual problems, and the interest, applications and future perspectives of the technique are also described.

RESUM

Es descriu el mètode d'anàlisi de la capacitat respiratòria de transport d'electrons dels organismes, utilitzable com a índex del catabolisme potencial i de la biomassa d'un ecosistema. Es passa revista a l'estructura i el funcionament dels sistemes transportadors d'electrons, a la relació entre respiració real i ETS, a la interpretació dels resultats, als problemes més habituals de l'anàlisi, i a l'interès, aplicacions i perspectives futures d'aquesta metodologia d'estudi dels ecosistemes.

INTRODUCCIÓ

El mètode d'anàlisi de la capacitat transportadora d'electrons dels organismes vius va ésser desenvolupat per PACKARD (1971). La mesura de l'activitat del sistema de transport d'electrons (ETS) es dirigeix a donar informació de la respiració (aeròbia o anaeròbia), i d'aquesta manera, del metabolisme i de la biomassa viva dels ecosistemes aquàtics. El desenvolupament d'aquest mètode està inspirat en la utilit-

zació dels pigments vegetals per a estimar la biomassa del fitoplàncton (KREPS & VERJBINSKAYA, 1930), i en l'ús de l'activitat de la succinat-deshidrogenasa per a mesurar la respiració del zooplàncton (CURL & SANDBERG, 1961). Es va pensar en una taxa de reacció que controlés la respiració dels organismes i que fos universal. Aquest és el cas del sistema respiratori de transport d'e⁻.

L'ATP, moneda d'intercanvi d'energia fisiològicament útil en les diferents reac-

* National Science Foundation. Washington, DC, 20550. Estats Units d'Amèrica.

** Departament d'Ecologia. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona.

cions cel·lulars, pot formar-se per fosforilació d'ADP a nivell de substrat o per fosforilació oxidativa. En la fosforilació oxidativa els electrons són transportats en salts a través dels citocroms fins a un acceptor final d'electrons. L'energia que es desprèn sembla generar un gradient protònic a través de les membranes que és el responsable de la transferència energètica necessària per a la síntesi de l'ATP a partir de l'ADP. La fosforilació oxidativa és el mecanisme més important de generació d'energia en els organismes.

També en la fotosíntesi, la radiació solar captada canvia l'estat d'oxidoreducció de molècules sensibles i els electrons retornen als compostos inicials a través d'un sistema de transport que genera gradients electroquímics usats en la síntesi d'ATP i compostos reductors com NADH i NADPH. Per això, per a conèixer l'activitat catabòlica (respiratòria) d'un sistema, en aquesta tècnica s'hauran de separar prèviament els transportadors fotosintètics tot eliminant els cloroplasts. Per a estimar específicament la biomassa dels organismes vegetals, s'ha pensat a mesurar altres paràmetres com ara els enzims fotosintètics, però, per exemple, la utilització de la Ru-1,5-bifosfat carboxilasa (EC 4.1.1.39) no ha tingut èxit. Se n'han de provar d'altres, fotosintètics o no, com la nitrat reductasa (EC 1.6.6.1), que seria un bon índex.

El coneixement de l'ETS dona un índex del metabolisme catabòlic d'un sistema a través d'una mesura sensible, ràpida i fàcil. Representa l'activitat de l'enzim limitant del transport d'electrons a la cadena respiratòria, i es basa en la mesura espectrofotomètrica de la taxa de canvi de color de les sals de tetrazole que es redueixen a una forma colorejada (formazan) en capturar, a nivell del complex III, els electrons aportats a la cadena respiratòria pel NADH, NADPH o succinat (figura 1). Aquesta mesura dona, doncs, la taxa màxima de flux de la cadena de transport d'electrons. La quantitat d'enzim en un sistema depèn de la biomassa present, del tipus d'organismes i podria ser també de l'estat fisiològic. Els seus valors poden convertir-se estequiòmicament en respiració potencial. La respiració real és menor. Cal tenir-ho present davant dels objectius de l'estudi que es du a terme i davant de la possibilitat d'ús d'altres mètodes

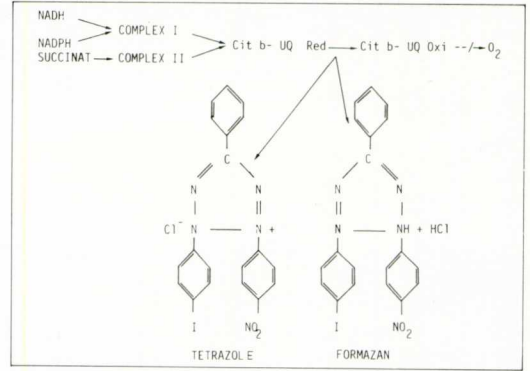


Fig. 1. Reacció d'oxidoreducció entre l'INT i el complex ubiquinona-citocrom b i esquema del sistema respiratori de transport d'electrons. The oxidation-reduction reaction between INT and the ubiquinone-cytochrome b complex, and scheme of the respiratory electron transport system.

todes directes de mesura del consum d'oxigen o de les taxes de respiració.

Estructura i funcionament dels sistemes de transport d'e⁻

A totes les membranes respiratòries de bacteris i mitocondris i a les fotosintètiques dels cloroplasts, les cadenes de transport d'e⁻ entre les deshidrogenases i la citocromoxidasa, i entre els dos fotosistemes, respectivament, tenen bàsicament els mateixos components, amb estructures similars (BINDER, 1982).

El procés responsable del consum d'oxigen, la fosforilació oxidativa (TZAGALOFF, 1982), té lloc a la membrana interna dels mitocondris i a la membrana cel·lular dels bacteris. La fosforilació oxidativa és duta a terme en cinc complexos moleculars fins a l'acceptor final: l'oxigen. L'últim complex és el constituït per la citocromoxidasa, però no és el limitant; ho és el primer, el format per la NADH deshidrogenasa i la SDH deshidrogenasa. Més que no pas linealment en una cadena respiratòria, els complexos s'agrupen aleatòriament en el pla de la membrana mitocondrial, tot formant un sistema multienzimàtic; d'ací el nom d'ETS (sistema de transport d'electrons, en l'ordre anglès de les inicials). Les subunitats de l'ETS es poden aïllar i estudiar independentment. Es dis-

cuteix si es poden moure en resposta a forces electroforètiques (CAPALDI, 1982). La transferència d'e⁻ sembla tenir lloc per colisió de la ubiquinona, mòbil entre I, II i III i del citocrom c, mòbil entre els complexos III i IV. Els complexos del transport d'e⁻ generen i mantenen un diferencial protònic i de càrrega elèctrica a través de la membrana. La suma dels dos diferencials (pH i càrrega elèctrica) produeix l'energia per a la síntesi d'ATP mitjançant l'ATP sintasa. El control sembla que el realitza l'ADP extramitocondrial.

Encara que el 90 % de l'oxigen utilitzat pels éssers vius estudiats ho és a la fosforilació oxidativa, hi ha molts altres enzims que requereixen oxigen. Així, també hi ha transport d'e⁻ no fosforilatiu en tota una sèrie de vies en el reticle endoplasmàtic i en alguns bacteris, que juguen, però, un paper menor en el consum global d'oxigen (degradació d'àcids grassos, hormones esteroidiques i xenobiòtics, oxidases no lligades a membranes que degraden aminoàcids i compostos fenòlics, etcètera).

Hi ha algunes petites diferències entre procarïotes, plantes i animals, però l'estructura general és la mateixa per a tots. Sembla que la NADH deshidrogenasa és la més activa en l'ETS respiratori dels eucariotes i la NADPH deshidrogenasa ho és en els procarïotes estudiats fins ara, per la qual cosa s'ha suggerit que la seva diferent proporció pot servir com un índex de la importància relativa d'aquests dos tipus de cèl·lules en les mostres de plàncton. Quant a la succinat-DH potser necessitaria una diferència de potencial redox més gran entre les sals de tetrazole i el succinat (RODIER *et al.*, 1987) per a ser més activa.

Mesura de l'activitat transportadora d'e⁻

El protocol que se segueix en aquesta tècnica és l'il·lustrat a la figura 2.

La preparació dels reactius a emprar es fa de la manera següent:

A. Tampó estoc d'homogeneïtzació (0,05M PO₄³⁻)

Afegir seqüencialment a 900 ml d'aigua —es tracta sempre d'aigua destil·lada i desionitzada— els següents productes, tot

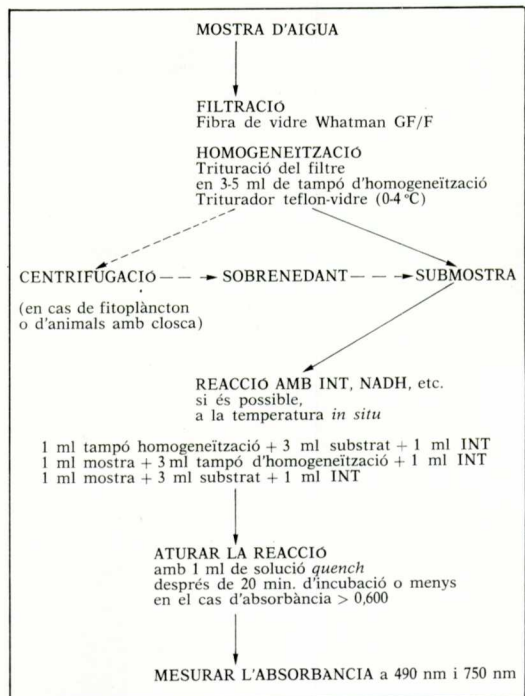


FIG. 2. Protocol metodològic per a la mesura de l'ETS.

Methodological protocol for ETS measurement.

permetent la dissolució de cadascun d'ells abans d'afegir-n'hi un de nou: a) 6,72 g Na₂HPO₄. b) 0,362 g KH₂PO₄. c) 18,5 mg MgSO₄·7H₂O. d) 1,5 g polivinil pirrolidona (PVP). e) 2 ml Triton X-100. Ajustar el pH a 8,0 amb NaOH i H₃PO₄ i aigua fins a arribar a 1 litre. Fer alíquotes de 49 ml en botelles de plàstic i guardar-les al congelador.

B. Solució estoc de cianur

Afegir 0,735 g de NaCN a 150 ml d'aigua i emmagatzemar a 0-4 °C.

C. Tampó diari d'homogeneïtzació

Afegir 1 ml de la solució estoc de cianur als 49 ml del tampó estoc d'homogeneïtzació. La concentració final de CN és 2mM. Guardar en gel o a la nevera (0 a 4 °C).

D. Solució estoc de substrat

Afegir seqüencialment a 900 ml d'aigua

els següents reactius, tot permetent que cada un es dissolgui abans d'afegir-hi els altres: a) 6,72 g Na_2HPO_4 . b) 0,362 g KH_2PO_4 . c) 2 ml Triton X-100. d) 36,0 g disodi succinat hexahidrat. Ajustar el pH a 8,0 amb NaOH i H_3PO_4 i aigua fins a 1 litre. Fer alíquotes de 24 ml i emmagatzemar-les al congelador.

E. Solució diària de substrat

Afegir 15 mg B-NADH i 5 mg NADPH a 24 ml de solució estoc de substrat. Guardar-la en gel o a la nevera (0 a 4 °C).

F. Solució de tetrazole (2 mg ml⁻¹)

Afegir 1 g d'INT clorur de 2-(4-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5 feniltetrazole (PM 505,7) a 500 ml d'aigua. Agitar durant 1 hora i filtrar les partícules que no s'hagin dissolt. Fer alíquotes de 16 ml en ampelles de plàstic i guardar-les al congelador. No utilitzar INT de Sigma.

G. Solució blanc de substrat

Preparar la solució estoc de substrat sense el succinat ni el B-NADH ni NADPH.

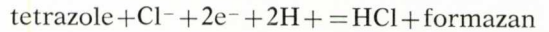
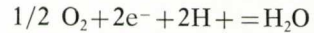
H. Solució aturadora de la reacció

Afegir 250 ml d'1M H_3PO_4 i 250 ml de formol 36 %, barrejar i guardar a 0-4 °C.

En aquest mètode s'utilitza NADH i succinat per a saturar l'ETS mitocondrial, NADPH per a saturar alguns ETS bacterians i l'ETS microsomal, i l'acceptor d'e⁻ artificial clorur de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazole (INT) per a registrar la taxa de transmissió d'e⁻ (ALTMAN, 1976). D'aquesta manera, l'assaig, anomenat ETS, mesura l'activitat total màxima de la succinat-deshidrogenasa (EC 1.3.99.1), NADH deshidrogenasa (EC 1.6.99.3), NADPH deshidrogenasa (EC 1.6.99.6) i la NADPH citocrom reductasa (EC 1.6.2.4). El paper jugat per altres enzims consumidors d'oxigen no associats amb aquests sistemes es pot considerar mínim i no es mesura.

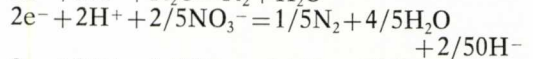
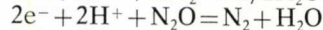
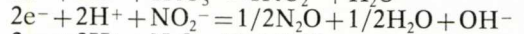
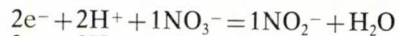
El lloc de reacció de l'INT és abans del sensible a la rotenona/amitol, al nivell de l'oxidasa de succinat i NADH. Com que la limitació de l'ETS es produeix després de les deshidrogenases, l'ús d'INT indica la V_{max}, capacitat màxima de transport d'e⁻.

L'assaig redueix el tetrazole a una taxa de 0,5 mol per equivalent d'e⁻ subministrats pels substrats. A la cèl·lula viva, el mateix subministrament d'e⁻ reduiria 0,25 mols d'O₂, per la qual cosa es pot calcular el consum potencial d'O₂ a partir del tetrazole reduït (formazan) en un temps determinat:



La reducció d'INT a formazan requereix dos electrons equivalents per cada mol de formazan que es produeix. Aleshores, a partir de la taxa de producció de formazan es pot calcular, en una aigua rica en oxigen, el nombre de mols d'oxigen que el sistema de transport d'e⁻ hauria reduït de no haver estat interceptat per l'INT.

Si la mostra fos d'aigües anòxiques, amb nitrat, la taxa de desnitrificació es podria calcular com el nombre de mols de nitrat reduïts a nitrogen:



L'activitat de l'ETS es calcula amb l'expressió següent:

$$\text{Activitat ETS (meq h}^{-1} \text{l}^{-1}) = [7.54 \frac{\text{S}}{\text{H (A-B)}}] / \text{fV.}$$

On S són els ml de la barreja de reacció, H els ml de l'homogeneïtzat, A el canvi d'absorbància, B l'increment d'absorbància en el blanc, 7.54 el resultat de l'extinció molar de l'INT-formazan (A₄₉₀ = 15.9 * 1000/M cm), dels 2 e⁻ de la reducció de l'INT, i d'una conversió de temps, f els ml utilitzats de l'homogeneïtzat, i V els litres mostrejats.

Com que es mesura a temperatura constant, T_o, i les mostres són tretes de l'aigua a diferent temperatura, s'ha de corregir la temperatura per a cada lloc. Basant-se en l'equació d'Arrhenius,

$$\text{ETS}_i = \text{ETS}_o \exp 15.8/R (1/T_o - 1/T_i)$$

(R, constant dels gasos; 15.8, energia d'activació en kcal/mol.)

El mètode consisteix, doncs, a mesurar la formació de formazan pels enzims de transport d'e⁻ lliurats pels homogenats de les mostres en presència de succinat, NADH i NADPH com a donadors d'e⁻ i INT com a acceptor d'e⁻. La reducció a formazan es determina espectrofotomètricament. Per conèixer la història del desenvolupament del mètode, vegeu PACKARD (1985).

Els valors normals al mar oscil·len entre els 8,3 i els 16,6 ml O₂ h⁻¹ m⁻² o, el que és equivalent, els 0,1 i els 5,5 ml O₂ h⁻¹ m⁻³. A la zona fòtica del mar estan entre 1 i 20 µl O₂ h⁻¹ l⁻¹, són del voltant de 0,05 a sota, i de 0,001 a 0,01 més avall de 100 m de fondària (PACKARD, 1979).

Taxa respiració/ETS

Com a mesura indirecta de la respiració, l'ETS requereix una calibració directa enfront de la respiració real. La taxa respiració/ETS reflecteix la fracció de la capacitat respiratòria que l'organisme utilitza.

Per a estimar la respiració, es pot fer amb un factor de conversió prèviament determinat empíricament o calcular-la tot suposant una cinètica anàloga a la de Michaelis-Menten:

$$v = [S / (K_m + S)] V_{max}$$

on S/K_m+S és el factor i S la concentració de la substància de control, que, en realitat, no es coneix si és l'ADP, l'ATP/ADP o la càrrega energètica.

Per això, de moment, el millor és calcular empíricament un factor de conversió. Ja s'ha fet en força tipus de procariotes i eucariotes. Hi ha equacions de regressió lineal per a descriure els parells ETS-respiració (taula I). Com és lògic, l'ETS també està altament correlacionat amb la DBO.

La interpretació

A l'hora de la interpretació dels valors de l'ETS cal tenir present que s'està davant d'una taxa, amb significació per tant dinàmica, no estàtica. És un índex de la dinàmica del sistema. No es tracta d'una propietat estàtica com ara la temperatura,

la clorofilla, els nutrients o el pH, que es mesuren fàcilment, sinó d'una propietat dinàmica, una taxa de reacció. Les taxes de reacció solen ésser difícils i lentes de mesurar (en la majoria dels casos, es triga d'hores a dies). Amb aquesta tècnica es pot fer en minuts. L'ETS representa la taxa instantània de respiració potencial. Expressa l'estat bioquímic del sistema en aquell moment i reflecteix els esdeveniments passats, la història de la respiració, de la mateixa manera que la clorofilla reflecteix la història de les condicions de llum i producció. En aquest aspecte és diferent d'altres mètodes com les incubacions, l'oxigen, el ¹⁴C, ³H, ¹⁵N, que són dependents de les condicions futures del sistema. Dóna valors potencials en contraposició a aquests altres mètodes que donen valors reals a través de la simulació de les condicions futures del sistema.

Per a interpretar bé l'ETS s'ha de conèixer el sistema que s'estudia, per exemple si és anaerobi o aerobi.

Els problemes

Els problemes que planteja l'ús d'aquesta tècnica han d'ésser tinguts presents i s'ha de procurar resoldre'ls amb una sèrie de precaucions.

El mètode es basa a suposar: 1) que els ETS respiratoris de mitocondris, parets bacterianes i microsomes són els principals responsables del consum d'oxigen respiratori, i 2) que la relació entre respiració i activitat ETS és suficientment constant d'organisme a organisme perquè pugui ésser utilitzat un simple factor de conversió per a calcular el consum d'oxigen respiratori. La primera hipòtesi és àmpliament acceptada (TZAGALOFF, 1982), la segona no, ja que les proporcions no són clarament constants. Com que els diferents autors han utilitzat diferents versions del mètode, els resultats no són fàcilment comparables. S'han d'utilitzar factors per a relacionar-los (OWEN & KING, 1975; CHRISTENSEN & PACKARD, 1979; taula I). El problema de la transformació a respiració real s'ha de solucionar amb un calibratge estadístic.

Tot això dóna ja una idea de la dificultat a trobar una conversió entre els valors d'ETS (respiració potencial) i els valors reals de consum d'oxigen (aproximació a

la respiració real). De tota manera, la taula I presenta els valors dels factors de conversió calculats per alguns grups d'organismes i sistemes diferents.

L'ETS és una mesura a nivell químic i indirecta que necessita calibratge previ. Després de l'extracció s'han de mantenir les condicions cellulars, el pH, la força iònica, el nivell de substrats, etc. Si les condicions de l'assaig o la preparació no són òptimes, l'ETS subestimarà la V_{max} (capacitat respiratòria). S'ha de vigilar molt la temperatura. Entre 5 i 30 °C es pot variar de temperatura, però quan aquesta és menor de 5 °C s'incorre en error.

També hi interfereix en el cas de fitoplàncton el sistema de transport d'electrons fotosintètic. S'ha d'investigar a fons però sembla que es pot eliminar per centrifugació o amb inhibidors. També s'ha de mantenir la cambra de reacció a les fosques perquè, a més a més, l'INT és sensible a la llum. Amb la centrifugació els mitocondris no sedimenten i sí que ho fan els cloroplasts, que així poden ésser eliminats. Per comprovar la puresa d'ambdues fraccions es pot mirar al microscopi electrònic.

També s'han de tenir en compte les cadenes alternatives i les diverses oxidases no lligades directament amb la respiració, que poden interferir, encara que la seva proporció és petita.

S'ha de procurar treballar a absorbàncies no gaire baixes per una millor lectura espectrofotomètrica i per evitar, a més, accentuar els problemes de terbolesa. Es recomana fer un escombratge de l'absorció a diferents longituds d'ona per estar segurs de la mesura INT i la del control basal.

L'aplicació

L'interès de l'ETS ve donat perquè la respiració no és sempre tan fàcil de mesurar a les aigües naturals com ho poden ésser els nutrients, la salinitat o la temperatura. L'ETS permet de 40 a 50 mesures persona⁻¹ dia⁻¹ quan es fa manualment, o de 40 a 80 de manera automatitzada.

El mètode de l'ETS presenta una manera útil d'estudiar el metabolisme respiratori, per la seva sensibilitat i, sobretot, facilitat i rapidesa. Permet prendre mostres amb intervals de temps mínims en no estar basat en incubacions de la mostra d'aigua. És força adequat i avantatjós en casos com els següents:

— Mesura del potencial respiratori en mostres amb tan poca quantitat d'organismes (aigua fonda del mar, zones oligotròfiques) que les variacions d'oxigen són tan petites que no permeten estimar-ne el consum.

— Mesura eficient de la respiració en suficients punts de mostreig sobre àrees àmplies de masses d'aigua (transectes i cartografies). Respecte a aquesta qüestió, vegeu els darrers treballs de PACKARD (1979, 1985) per a l'automatització de les anàlisis.

— Estima de la partició de la respiració entre diferents classes d'organismes (bacterio-, fito- i zooplàncton) o de la contribució a la respiració de diferents parts d'un mateix organisme (per exemple, arrels, rizomes i fulles dels macròfits).

— Estima de la respiració de mostres de característiques especials (neuston, superfícies higropètriques) on no és fàcil usar altres mètodes.

TAULA I. Equacions (estandaritzades) de regressió lineal per a calcular el consum respiratori d'oxigen a partir de les mesures de l'activitat ETS (de PACKARD, 1985).
Regression equations for calculating respiratory oxygen consumption from ETS activity measurements (After PACKARD, 1985).

| <i>Mostra</i> | <i>Equació</i> | <i>Unitats</i> |
|---------------|----------------------------------|--|
| Bacteris | $R = 0,494 \text{ ETS} + 10,920$ | $10^{-10} \mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}$ per cèl·lula |
| Bacteris | $R = 0,225 \text{ ETS} + 4,99$ | $\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$ per litre de cultiu |
| Protozous | $R = 0,250 \text{ ETS} + 0,0105$ | $\text{nl O}_2 \text{ h}^{-1}$ per cèl·lula |
| Zooplànton | $R = 0,382 \text{ ETS} + 0,458$ | $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}$ per organisme |
| Aigua marina | $R = 0,288 \text{ ETS} - 0,395$ | $\mu\text{l O}_2 \text{ h}^{-1}$ per litre |

— Estima de la respiració anaeròbica (amb altres acceptors d'electrons que no l'oxigen, com ara el nitrat, el sulfat, o el CO₂) sempre que a l'hora de l'anàlisi s'hagin tret o rentat els compostos que puguin reduir l'INT (H₂S, CH₄) (TORRETON, comunicació personal).

— Estudi de canvis fisiològics d'un sistema, per exemple els deguts a pol·lució químics.

— Mesura de processos respiratoris a masses d'aigua mòbils quan el punt de mostreig és fix, com ara en estuaris, aigües costaneres o rius o plomes d'emissaris pol·luidors en rius, mars o embassaments, zones d'influència mareal, etc. Respecte a alguns d'aquests casos es pot considerar, a més, la bona correlació entre l'ETS i la DBO trobada per JONES & SIMON (1979).

Les perspectives

S'ha de fer encara un esforç important per caracteritzar els sistemes ETS en tot tipus de plàncton per a poder utilitzar l'assaig en l'anàlisi d'aigües amb garanties, ja que no es coneix tan bé com en mamífers, plantes superiors o bacteris entèrics.

L'ETS requereix calibratge. I encara hi ha molts grups per a estudiar: cianobacteris, diatomees, dinoflagel·lats, ciliats, copèpodes, eufausiacis, meduses, etc. Mentrestant, l'ETS es continua utilitzant per la seva sensibilitat, facilitat i rapidesa de mesura. El seu desavantatge, que està en el fet que la conversió a respiració requereix diferents coeficients per diferents grups d'organismes i estats fisiològics, és resolt, en part, perquè en limnologia i oceanografia freqüentment hi ha un tipus dominant d'organismes en unes aigües determinades. Per exemple, els bacteris dominen els fons oceànics, les microalgues els *blooms* d'algues, i els metazoos el zooplàncton.

Obviament, una lectura directa de la respiració és preferible, però no sempre és possible o fàcil (profunditats majors de 100 m), i quan es pot fer la mesura de la respiració, consumeix temps i presenta els problemes de totes les anàlisis que requereixen incubació.

Els organismes són ubics a totes les masses d'aigua. La respiració és comuna a

tots els organismes. És el procés mitjançant el qual generen energia en forma d'ATP, produeixen esquelets de carboni per a la biosíntesi de material cel·lular i formen equivalents reductors (NADH i NADPH) per al manteniment metabòlic de la cèl·lula (BURRIS, 1980). La disminució de la concentració d'oxigen a l'aigua reflecteix el metabolisme de consum d'aquest gas, catalitzat enzimàticament a la fosforilació oxidativa, procés responsable del 90 % d'aquest consum, i per oxigenases no fosforilatives dels microsomes i del citoplasma. Si no hi haguessin organismes a les aigües, el consum d'oxigen cessaria, puix que la utilització no enzimàtica d'aquest gas és gairebé negligible (RICHARDS, 1957). Si no hi ha disponibilitat d'oxigen, certs microbis poden utilitzar nitrat, nítrid, sulfat o CO₂ com a acceptors d'e⁻ alternatius. En tots els casos, l'ETS constitueix un bon índex de la dinàmica dels ecosistemes aquàtics.

BIBLIOGRAFIA

Ateses les característiques d'aquest article hom ha afegit algunes referències no citades al text però que són d'interès per als qui vulguin aplicar o interpretar la tècnica de l'ETS.

- BINDER, A. 1982. Respiration and photosynthesis in energy transducing membranes of cyanobacteria. *Journal Bioenergetics Biomembranes*, 120: 271-286.
- BLASCO, D., PACKARD, T. T. & GARFIELD, P. C. 1982. Size dependence of growth rate, respiratory electron transport system activity, and chemical composition in marine diatoms in the laboratory. *J. Phycol.*, 18: 58-63.
- BROBERG, A. 1983. Effects of heavy metals on electron transport system activity (ETSA) in freshwater sediments. In: *Environmental Biogeochemistry*. (Hallberg, R. ed.). *Ecol. Bull.*, 35: 403-418.
- CAPALDI, R. A. 1982. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane (BBA 85326). *Biochimica Biophysica Acta*, 694: 291-306.
- CHRISTENSEN, J. P. & PACKARD, T. T. 1977. Sediment metabolism from the northwest African upwelling system. *Deep-Sea Research*, 24: 331-343.
- CHRISTENSEN, J. P. & PACKARD, T. T. 1979. Respiratory electron transport activities in phytoplankton and bacteria: Comparison of methods. *Limnol. Oceanogr.*, 24 (3): 576-583.
- CURL, H. & SAMBERG, J. 1961. The measurement of dehydrogenase activity in marine organisms. *J. Marine Research*, 19: 123-138.
- DEVOL, A. H. & PACKARD, T. T. 1978. Seasonal changes in respiratory enzyme activity and productivity in Lake Washington microplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 23 (1): 104-111.

- GARDFIELD, P. C., PACKARD, T. T., FRIEDERICH, G. E. & CODISPOTTI, L. A. 1983. A subsurface particle maximum layer and enhanced microbial activity in the secondary nitrite maximum of the northeastern tropical Pacific Ocean. *J. Marine Research*, 41: 747-76.
- JONES, J. G. 1979. Microbial activity in lake sediments with particular reference to electrode potential gradients. *J. General Microbiology*, 115: 19-26.
- JONES, J. G. & SIMON, B. M. 1979. The measurement of electron transport system activity in freshwater benthic and planktonic samples. *J. Applied Bacteriology*, 46: 305-315.
- KREPS, E. & VERJBINSKAYA, N. 1930. Seasonal changes in the phosphate and nitrate content and in hydrogen ion concentration in the Barents Sea. *J. Conseil*, 5: 329-346.
- PRISCU, J. C. & GOLDMAN, C. R. 1984. The effect of temperature on photosynthetic and respiratory electron transport system activity in the shallow and deep-living phytoplankton of a subalpine lake. *Freshwater Biology*, 14: 143-155.
- OWEN, T. G. & KING, F. D. 1975. The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Marine Biology*, 30: 27-36.
- PACKARD, T. T. 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in marine phytoplankton. *J. Marine Research*, 29: 235-244.
- PACKARD, T. T. 1979. Respiration and respiratory electron transport activity in plankton from the Northwest African upwelling area. *J. Marine Research*, 37 (4): 711-742.
- PACKARD, T. T. 1985. Measurement of electron transport activity of microplankton. *Adv. aquatic microbiology*, 3: 207-261.
- PACKARD, T. T. & WILLIAMS, P. J. le B. 1981. Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface seawater from the Northwest Atlantic. *Oceanologica Acta*, 4 (3): 351-358.
- PACKARD, T. T., GARFIELD, P. C. & CODISPOTTI, L. A. 1983. Oxygen consumption and denitrification below the Peruvian upwelling. In: *Coastal Upwelling*. (Suess, E. Thiede, J. eds.): 147-173. Plenum Press. New York.
- PACKARD, T. T., DENIS, M., RODIER, M. & GARFIELD, P. In press. Deep ocean metabolic CO₂ production: An estimate from ETS activity. *Mecanoscrit. Deep-Sea Research*.
- RICH, P. H. & DEVOL, A. H. 1978. Analysis of five North American lake ecosystems. VII. Sediment processing. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 20: 598-604.
- RODIER, M., PACKARD, T. T. & DENNIS, M. 1987. Dehydrogenase and respiratory electron transport activity in some marine organisms. *Mecanoscrit*.
- TREVORS, J. T. 1984. The measurement of electron transport system (ETS) activity in freshwater sediment. *Water Res.*, 18 (5): 581-584.
- TREVORS, J. T. 1984. Electron transport system activity in soil, sediment, and pure cultures. *CRC Critical Rev. Microbiology*, 11(2): 83-100.
- TZAGALOFF, A. 1982. *Mitochondria*. Plenum Press. New York.
- VOSJAN, J. H. 1982. Respiratory electron transport system activities in marine environments. *Hydrobiological Bull.*, 16 (1): 61-68.
- ZIMMERMAN, A. P. 1975. Electron transport analysis as an indicator of biological oxidations in freshwater sediments. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19: 1518-1523.