

Sistema automatizado para simulación en laboratorio de un gradiente térmico para estudios con organismos marinos

Automated system for laboratory simulation of a thermal gradient for studies with marine organisms

Gilberto González-Soriano¹, Rosa Isela Vázquez Sánchez¹, Carlos Pacheco Ayub², Salvador E. Lluch-Cota²

¹Programa de Acuicultura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS, México

²Programa de Ecología Pesquera. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS, México

Correspondencia: Salvador E. Lluch-Cota **E-mail:** slluch@cibnor.mx

Artículo original | Original article

Palabras clave

Preferencia térmica, comportamiento, desarrollo tecnológico

Keywords

Thermal preference, behavior, technological development

RESUMEN | Se presenta el diseño y pruebas de funcionamiento de un sistema de simulación de gradiente térmico para el estudio de las preferencias de temperatura en organismos bentónicos marinos. El sistema consistió en un tanque de fibra de vidrio dividido en un canal experimental flanqueado por secciones distales donde se controlan las temperaturas extremas del gradiente, enfriando o calentando con apoyo de bombas de calor. El sistema se encuentra automatizado en cuanto al control y registro de temperatura, cuenta con un módulo para adquisición de imágenes con una cámara de alta resolución y un controlador de relevadores, el cual permite el apagado de las bombas de aireación y el encendido de lámparas de luz justo antes de la toma de las fotografías. El sistema fue retado para evaluar su eficiencia y los resultados indican que 1) una aireación elevada a lo largo de todo el canal de experimentación permite mantener condiciones de saturación de oxígeno en el tanque y alcanzar un mejor comportamiento del gradiente térmico, 2) que la eficiencia del gradiente es mayor a menores profundidades del sistema y aceptable a 15 cm; 3) a partir de condiciones homogéneas el sistema tarda aproximadamente 30 h en que se establezca el gradiente, 4) el sistema alcanza dentro del canal experimental un 60% del gradiente programado en las bombas de calor y 5) el sistema es exitoso en mantener el gradiente por periodos largos (semanas), aún bajo condiciones experimentales con manipulación y recambios de agua. Se discuten oportunidades de mejora del sistema, incluyendo el crecimiento en unidades experimentales, la incorporación de sensores para el registro autónomo de otras variables indicadoras de la calidad de agua, así como en el sistema de adquisición de imágenes y el seguimiento y observación de los organismos y sus respuestas.

ABSTRACT | The design and operation tests of a thermal gradient simulation system for studying temperature preferences in marine benthic organisms are reported. The system consists of a glass fiber tank divided into an experimental channel flanked by distal sections where extreme gradient temperatures are controlled by cooling or heating with the support of heat pumps. The system is automated in terms of temperature control and recording and features an image acquisition module with a high-resolution camera and a relay controller that allows the air pump to be turned off and light lamps to be lit just before taking the photographs. The system was challenged to evaluate its efficiency. The results indicated that 1) high aeration along the entire experimental channel allows not only the maintenance of oxygen saturation conditions in the tank, but also a better response of the thermal gradient, 2) that the efficiency of the gradient is greater at smaller depths of the system and acceptable at 15 cm, 3) that from homogeneous conditions the system takes approximately 30 h to stabilize the gradient, 4) that on average the system reaches within the experimental canal a 60% of the programmed gradient in the heat pumps, and 5) that once established the system is successful maintaining the gradient for long periods (weeks) still under experimental conditions with manipulation and water replacement. Opportunities for improving the system are discussed, including increasing the experimental units, incorporation of sensors for the autonomous registration of other water quality indicators, as well as in the image acquisition system, and the monitoring and observation of organisms and their responses.

INTRODUCCIÓN

La termotaxis es una respuesta comportamental de termorregulación, donde los individuos tienden a moverse en el espacio hacia su preferencia térmica. En una primera aproximación, el sentido común apunta a que, dado que muchas funciones fisiológicas dependen de condiciones particulares de temperatura, los individuos “prefieran” el óptimo fisiológico y tiendan a ubicarse en él. Muchos trabajos en ecofisiología parten de este supuesto y frecuentemente se expone a organismos experimentales a gradientes térmicos para describir, a través de la preferencia térmica, la temperatura óptima para una población (Salas *et al.* 2014, Díaz *et al.* 2017, Lah *et al.* 2017).

Existen al menos tres elementos de discusión que cuestionan la idea de que la preferencia térmica y el óptimo fisiológico coinciden y que subrayan, por lo tanto, la importancia del estudio de las respuestas biológicas ante los gradientes térmicos. El primero es que puede existir un desfase entre las tasas de evolución para diferentes rasgos (Gvozdík 2015); no todos los procesos biológicos, como locomoción o alimentación, tienen su nivel óptimo a la misma temperatura (Navas *et al.* 2021, Hui *et al.* 2022). El contraste es aún mayor entre procesos en diferentes partes del ciclo de vida, como formación de gametos, desove, desarrollo larval o crecimiento somático.

El segundo se relaciona con el principio de inequidad de Jensen (Jensen 1906). Martin y Huey (2008) demostraron que el promedio y la varianza de la temperatura interactúan para determinar la aptitud de los organismos en ambientes variables; dado que las curvas de preferencia térmica (la función que describe la relación entre la temperatura y el desempeño) son frecuentemente unimodales y asimétricas. El impacto de la variabilidad térmica en el rendimiento fisiológico dependerá de la temperatura media en relación con la temperatura a la que alcanza su máximo rendimiento. Cuando la temperatura media está por debajo del intervalo térmico óptimo, su variabilidad puede modular el rendimiento fisiológico; por el contrario, cuando la temperatura promedio es igual o superior a la temperatura óptima, las variaciones térmicas siempre afectan al rendimiento. Martin y Huey (2008) propusieron que, ante condiciones de alta variabilidad, los organismos sacrificarían el rendimiento a corto plazo y elegirían condiciones subóptimas frías, para optimizar el desempeño a largo plazo.

El tercer elemento se relaciona con la capacidad de respuesta de los organismos ante un gradiente térmico. Por un lado, se desconoce en muchos organismos ectotermos, y especialmente para ectotermos marinos, la resolución a la que pueden sentir la temperatura y, por otro, los muchos factores que pueden alterar dicha capacidad sensorial. Por ejemplo, existe gran variedad de receptores transitorios potenciales (TRP), que son canales iónicos permeables al calcio, frecuentemente asociados a la detección de temperatura y que están presentes en muchos grupos animales. Estos canales se activan en intervalos de temperatura que pueden variar dependiendo de la especie, interacciones biológicas y condiciones ambientales (García-Ávila e Islas, 2019).

El grupo de trabajo de Ecofisiología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S.C. ha venido explorando, desde hace más de dos décadas, las respuestas de organismos marinos de interés pesquero y acuícola ante retos de temperatura y su variabilidad, principalmente a través de la evaluación del desempeño fisiológico y metabólico, crecimiento y supervivencia, expresión genética, transcriptómica y proteómica, y bioenergética celular. Sin embargo, recientemente se ha iniciado también la exploración de respuestas comportamentales y se tiene la expectativa de estudiar preguntas asociadas a los elementos expuestos en párrafos anteriores, para lo cual se desarrolló el equipo que se describe en el presente reporte.

El trabajo con gradientes térmicos y el diseño de sistemas de simulación en laboratorio existen desde hace décadas. El diseño más frecuentemente utilizado para el trabajo con organismos terrestres, principalmente insectos, arácnidos y lagartijas, suele estar basado en el calentamiento y enfriamiento de una placa de algún material termoconductor (Ritchie *et al.* 2021). Para el trabajo con organismos acuáticos, que implica generar un gradiente tridimensional, dependiendo del tipo de organismos y las preguntas científicas que se abordan puede simularse un gradiente térmico vertical, a lo largo de una columna de agua (Kamykowski 1981) o, mucho más complicado, trabajar con gradientes horizontales. Para esto último, generalmente se utilizan tanques equipados con calentadores y enfriadores que pueden mantener temperaturas específicas en diferentes regiones del baño (Kita *et al.* 1996) o bien ubicar los calentadores y enfriadores por fuera del sistema experimental y bombear hacia el tanque experimental agua de diferentes temperaturas, creando un gradiente a medida que el agua se mezcla. En general, todos estos sistemas enfrentan el reto técnico de mantener un gradiente estable por periodos largos, lo que frecuentemente se aborda a través de un monitoreo de las condiciones dentro del tanque y con el control autónomo, asistido por computadora, de los calentadores y enfriadores.

Algunos montajes son similares al que reportamos en este trabajo y contienen muchos elementos en común. Entre ellos, el reportado por Lewis y Ayers (2014) es particularmente parecido en diseño y dimensiones; sin embargo, estos autores han reportado su uso únicamente para el estudio de respuestas agudas, en experimentos del orden de 1 hora de duración. El objetivo de este trabajo es describir nuestro diseño, probar la factibilidad de utilizarlo para el estudio de respuestas tanto agudas (horas) como crónicas (días a meses), evaluar su estabilidad y detectar las oportunidades de mejora.

Descripción del sistema

El sistema consistió en un tanque de fibra de vidrio de forma rectangular de 302 cm de largo por 52 cm de ancho y 50 cm de altura (Fig. 1). El tanque se encuentra dividido en tres secciones, separadas por placas de aluminio (Fig. 1b). Las secciones distales se utilizan para controlar las temperaturas extremas del gradiente, enfriando o calentando, mientras que la sección central compone el canal efectivo de experimentación. Las placas de aluminio cuentan con orificios de 9 mm de diámetro, que permiten la difusión de oxígeno y temperatura hacia la sección para experimentación. A lo largo del eje longitudinal del fondo del tanque se ubica una manguera con difusor de burbuja fina que, junto con los difusores ubicados en las secciones distales, permite mantener la oxigenación a niveles de saturación. Las placas de aluminio pueden ser ubicadas a diferente distancia de los extremos, según se requiera. Para las pruebas de operación que reportamos en este trabajo fueron ubicadas a 50 cm de distancia del extremo, dejando una sección experimental de 200 cm; sin embargo, se realizaron pruebas adicionales (no incluidas) reduciendo las secciones de control a 25 cm y aumentando en área experimental a 250 cm, con resultados de capacidad de control similares.

Para el calentamiento y enfriamiento en las cámaras distales, se utilizan dos bombas de calor de 1/2 HP, 6000 BTUH, con intercambiadores de titanio resistentes a la corrosión. Las bombas de calor cuentan con un sistema de circulación de agua con intervalo de flujo de 12 a 25 GPM. Los ajustes fijos de temperaturas en los extremos del tanque son realizados mediante un sistema de control autónomo asistido por computadora (Fig. 1c) basado en paquetería de elaboración propia (Simulador Térmico Marino; SITMA), el cual permite rangos de temperatura desde 5°C hasta 35°C.

El sistema permite registrar en tiempo real el gradiente térmico gracias a un arreglo de termopares K de dos conductores tipo TT-K-24. Cada termopar tiene una longitud de 10 metros y fueron encapsulados en uno de sus extremos en una protección de acero inoxidable para poder utilizarlos dentro del agua marina. Los termopares se encuentran conectados a un módulo de temperatura de 16 canales NI9213 y el registro de temperatura utiliza un programa de aplicación de National Instruments® con LabVIEW®, todo dentro de la plataforma de adquisición de datos National Instruments® NI DAQmx (Fig. 1d). La calibración se realiza dentro del mismo programa, sobre la base de dos puntos de calibración a 15 y 35 °C y utilizando como referencia sensores HOBO® Pendant temp/light.

El sistema cuenta con una primera versión de módulo para adquisición de imágenes (Fig. 1e). Sobre el tanque, a una altura de 1,5 m, se ubicó una cámara GoPro® que toma fotografías de todo el tanque a alta resolución y a intervalos personalizables. Para mejorar la calidad de las imágenes, se instaló un controlador de relevadores basado en plataforma Arduino que permite el apagado de las bombas de aireación y el encendido de lámparas de luz justo antes de la toma de las fotografías.

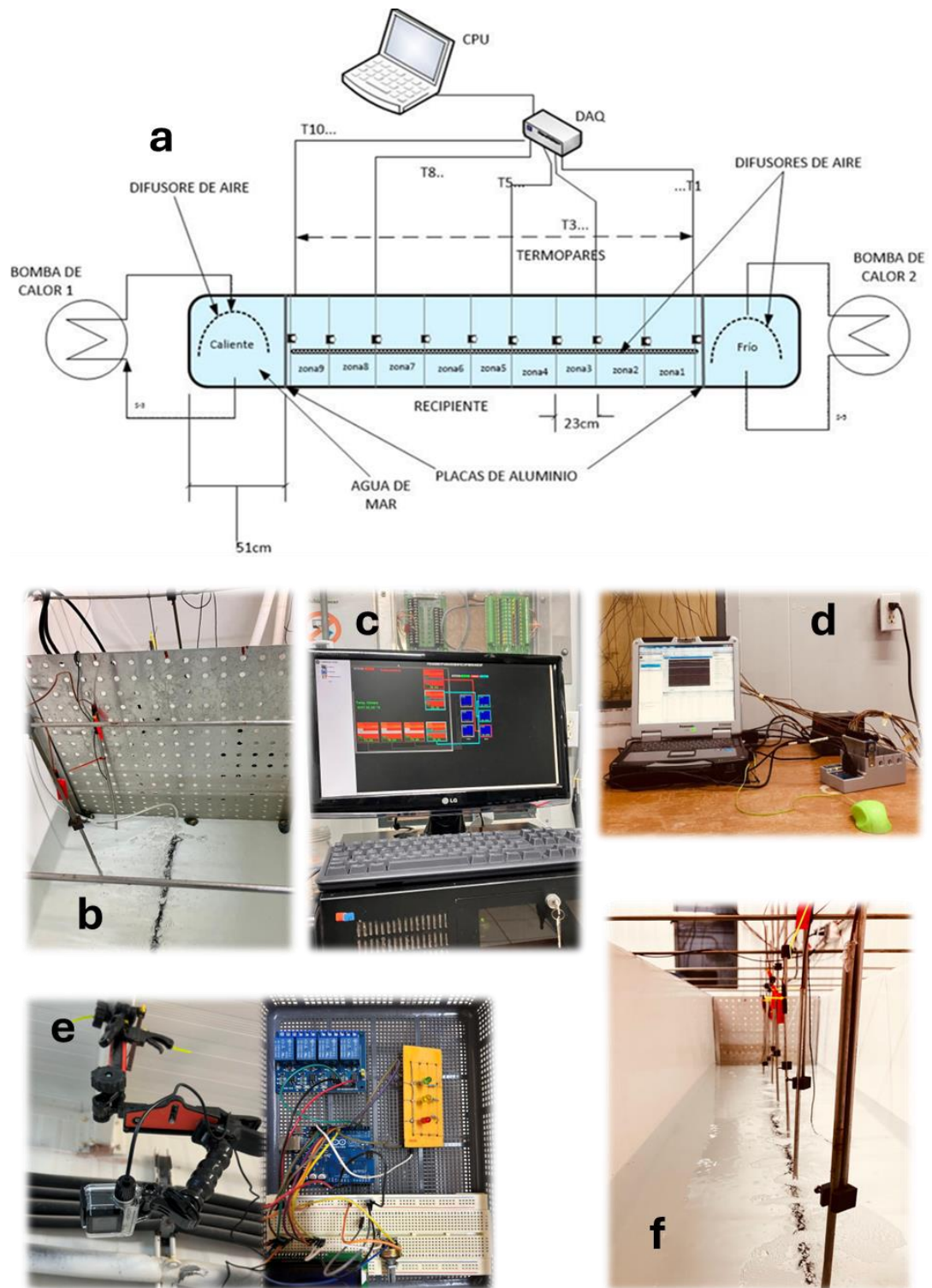


Figura 1. a) Sistema experimental, b) detalle de las placas de aluminio que separan la zona de entrada de agua del canal experimental, c) Simulador Térmico Marino, detalle del ordenador que activa o suprime las bombas de calor, d) detalle del sistema de monitoreo de temperatura a lo largo del tanque, basado en termopares y un módulo de adquisición de datos, e) módulo de adquisición de imágenes que incluye cámara fotográfica panorámica de alta resolución y sistema de control de aireación y luz, f) vista interna del canal de experimentación.

Figure 1. a) Experimental system, b) detail of the aluminum plates that separate the water inlet area from the experimental channel, c) Marine Thermal Simulator, detail of the computer that activates or suppresses the heat pumps, d) detail of the temperature monitoring system throughout the tank, based on thermocouples and a data acquisition module, e) image acquisition module that includes high resolution panoramic camera and aeration and light control system, f) internal view of the experiment channel.

Pruebas de simulación de gradiente

En una primera fase se diseñaron experimentos para evaluar la eficiencia con la que se reproduce un gradiente esperado. En primer término (experimento 1), se evaluó el efecto de la aireación a lo largo de la sección de experimentación, para determinar si es posible mantener el gradiente térmico y condiciones de saturación de oxígeno de forma simultánea. Para este ensayo se realizaron mediciones con un termómetro digital en un arreglo de 158 puntos (9 puntos a lo largo, 5 a lo ancho y 3 profundidades) a tres niveles de aireación, 0, 1 y 3 L m⁻¹. Una vez definida la condición ideal de aireación, se evaluó el efecto de la profundidad de la columna de agua través de cuatro corridas (experimento 2), utilizando profundidades de 10, 15, 20 y 25 cm y un intervalo de temperatura en las bombas de calor de entre 16 y 25°C, con observaciones por 42 h una vez estabilizado el gradiente, y se compararon las medias del gradiente alcanzado a través de un ANOVA de una vía. Tras seleccionar condiciones de aireación y profundidad, se realizó una corrida (experimento 3) para definir el tiempo requerido para estabilizar el gradiente a partir de condiciones de homogeneidad, para lo cual se programaron las bombas de calor a 16 y 25 °C y se registraron las lecturas de los termopares a intervalos de cinco minutos por un total de 48 h. Finalmente, se realizaron corridas a diferentes intervalos de temperatura (experimento 4): tres intervalos de 7°C abarcando de 14 a 21°C, 18 a 25°C y 21 a 28°C, otra de 9°C de 16 a 25°C y una quinta de 13°C, desde 15 hasta 28°C. Todas estas corridas se realizaron por 48 h a partir de que el gradiente se estabilizó, con mediciones cada 5 min.

Pruebas de factibilidad de operación con organismos

Para probar que es posible mantener organismos experimentales de forma rutinaria y por periodos relativamente largos, se mantuvieron en el sistema ocho individuos de abulón azul, *Haliotis fulgens*, por un periodo de dos semanas (experimento 5), en condiciones constantes de gradiente térmico de 18 a 25°C, con alimentación y limpieza cada tercer día. Aproximadamente a las 18:00 h, el fondo del canal fue sifonado para extraer todos los restos de alimento y heces producidas por los organismos y el volumen de agua extraído fue remplazado incorporando agua a 25°C en el extremo cálido del gradiente. Posterior a la limpieza, se administró alimento pelletizado esparciéndolo a lo largo de todo el canal experimental. Durante todo el periodo experimental se comprobó que no existiera mortalidad de individuos, se realizaron observaciones sobre tendencias en la ubicación a lo largo del canal y se verificó la estabilidad de largo plazo del gradiente a través del sistema de monitoreo térmico.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la aireación. A través del experimento se determinó que una aireación elevada, con burbuja fina a lo largo de todo el canal de experimentación, permitió no sólo mantener condiciones de saturación de oxígeno en el tanque, sino además alcanzar un mejor comportamiento del gradiente térmico esperado. La figura 2 muestra la interpolación de las mediciones realizadas a cada una de las tres profundidades y comparando los tres niveles de aireación. Se hizo evidente que, sin el apoyo del burbujeo, se estableció una estratificación vertical intensa, sin evidencia de gradiente a lo largo del canal. En condiciones de burbujeo moderado (paneles centrales), se formó el gradiente en la horizontal, pero aún se percibieron diferencias en la vertical, además de que se notó cierta estructura heterogénea a lo ancho del canal, particularmente en el fondo. En contraste, con el burbujeo a 3 L m⁻¹ se alcanzaron condiciones virtualmente homogéneas en la vertical y a lo ancho del canal, mientras que se formó y mantuvo consistente el gradiente a lo largo del canal.

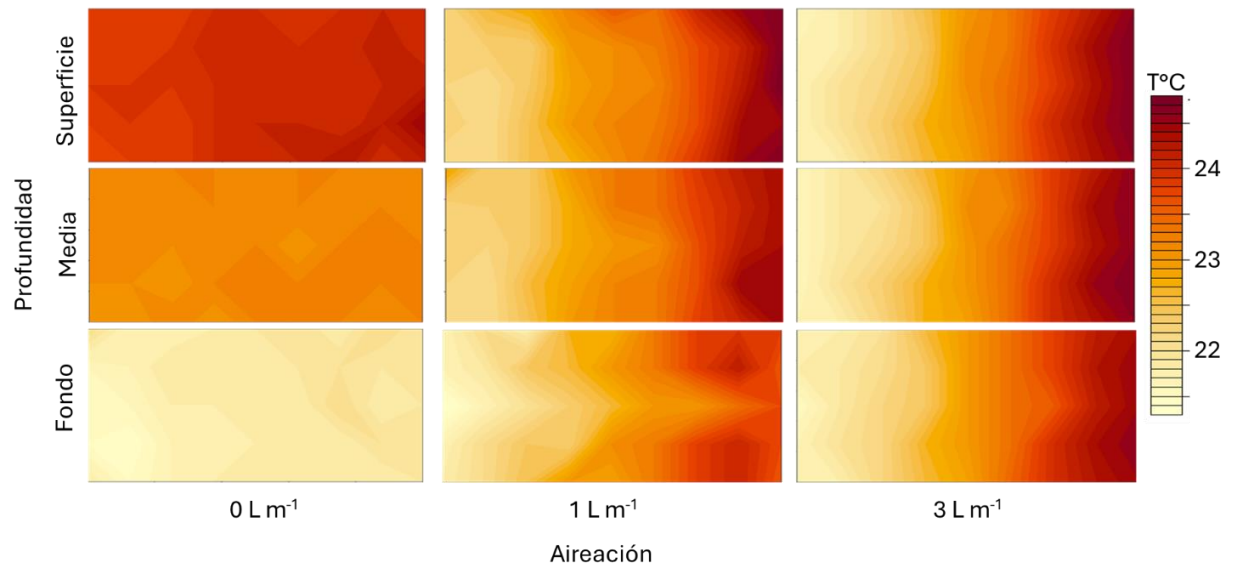


Figura 2. Resultado del experimento 1: gradientes de temperatura registrados a tres profundidades y a tres niveles de aireación.

Figure 2. Result of experiment 1: temperature gradients recorded at three depths and three aeration levels.

Experimento 2. Efecto de la profundidad. La comparación de los gradientes alcanzados utilizando diferentes profundidades de la columna de agua, mostraron que la eficiencia fue mayor a menores profundidades. Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre las medias en al menos dos grupos y un análisis *post hoc* de Tukey indicó que la media de gradiente alcanzado no fue significativamente diferente entre 10 y 15 cm ($p=0,74$), pero si para cualquier otra comparación pareada. Dado que se busca el mejor compromiso entre mayor volumen de agua y eficiencia en el establecimiento del gradiente, para el resto de los experimentos se utilizó la profundidad de 15 cm.

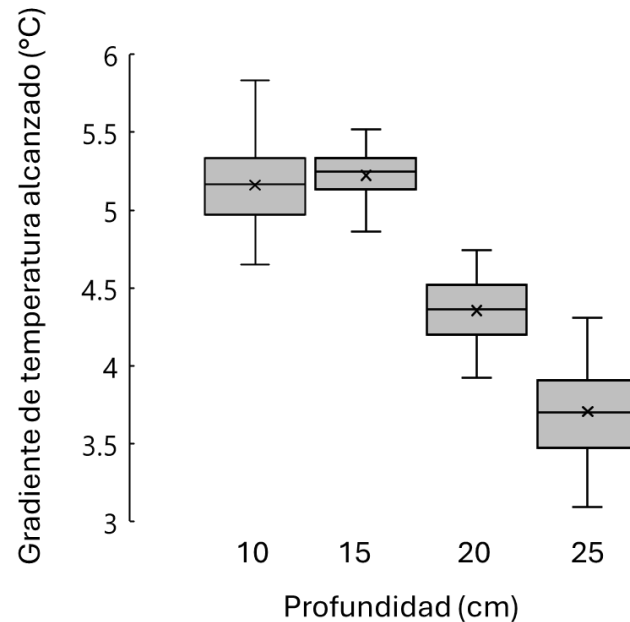


Figura 3. Resultado del experimento 2: gradiente de temperatura alcanzado a diferentes profundidades de la columna de agua.

Figure 3. Result of experiment 2: temperature gradient achieved at different depths of the water column.

Experimento 3. Tiempo para alcanzar el gradiente. Partiendo de condiciones homogéneas a lo largo del canal, el sistema tardó un aproximado de 30 h para que el gradiente se estabilizara en alrededor de $4,5^{\circ}\text{C}$, con un intervalo programado en las bombas de calor de 16 a 25°C (Fig. 4). Cabe señalar que durante el resto de los experimentos se llevó un registro similar y los tiempos registrados para menores intervalos en las bombas de calor fueron también menores, de entre 12 y 25 h, y que, entre experimentos, es decir, a partir de un gradiente ya establecido, fue de unas cuantas horas.

Experimento 4. Efecto de la amplitud del intervalo programado. Las observaciones indican que consistentemente el sistema alcanzó dentro del canal experimental un 60% del gradiente programado en las bombas de calor, independientemente de dónde se ubique el intervalo. La comparación de los tres intervalos de 7°C , con temperaturas mínimas de 14 , 18 y 21°C , alcanzaron gradientes ligeramente por encima de los 4°C , el intervalo entre 16 y 25°C alcanzó un gradiente de $5,4^{\circ}\text{C}$ y el de mayor amplitud, entre 15 y 28°C , uno de $7,2^{\circ}\text{C}$. Por las características del sistema y la serie de pruebas realizadas, se estimó que este valor de 7°C se encuentra cerca del límite de las capacidades de simulación del sistema (ver Figura 5).

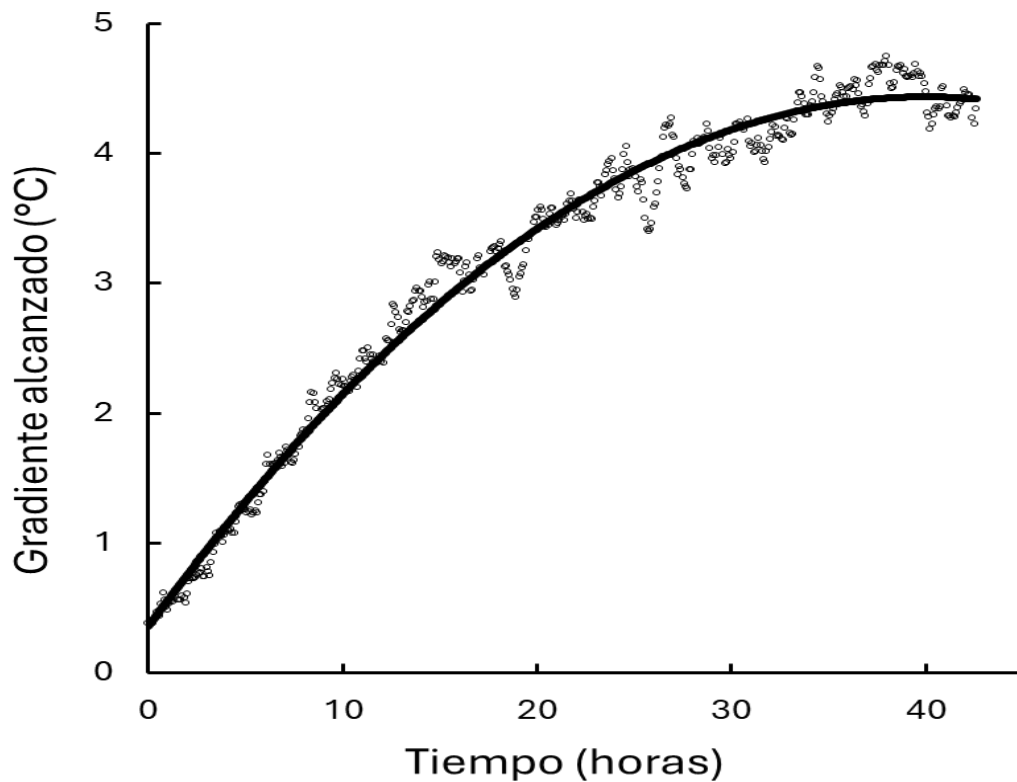


Figura 4. Resultados del experimento 3: tiempo requerido para la estabilización del gradiente térmico a partir de condiciones homogéneas a lo largo del canal experimental.

Figure 4. Results of Experiment 3: time required for the thermal gradient stabilization starting from homogenous conditions along the experimental channel.

Experimento 5. El periodo de prueba con organismos permitió validar la factibilidad del sistema en condiciones de largo plazo. Durante las dos semanas de mantenimiento no se registró mortalidad de los organismos, no se presentó ninguna falla del sistema y las condiciones de gradiente se mantuvieron prácticamente constante a pesar de la manipulación asociada a la limpieza del tanque, la alimentación de los organismos y los recambios de agua. La calidad de agua también se mantuvo en condiciones adecuadas de oxígeno, salinidad y pH.

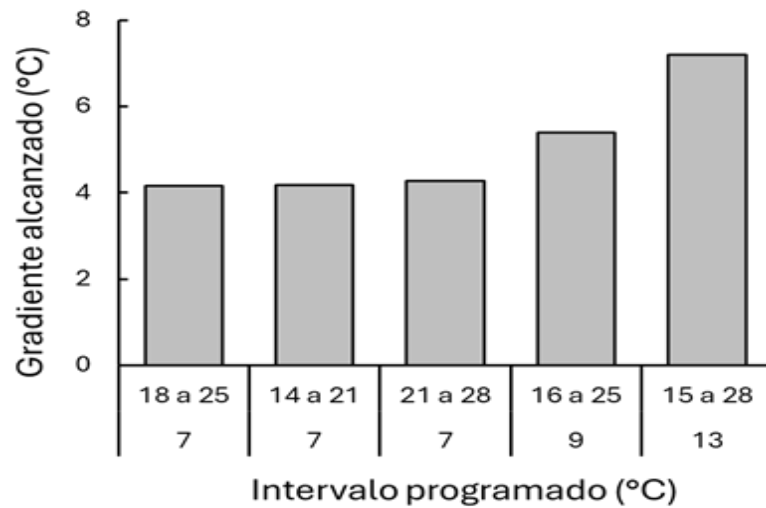


Figura 5. Resultados del experimento 4: amplitud del intervalo alcanzado en función del programado: tres intervalos de 7°C, con temperaturas mínimas de 14, 18 y 21°C, un intervalo de 9 °C entre 16 y 25°C y otro de 13°C entre 15 y 28°C.

Figure 5. Results of the experiment 4: achieved versus programed range amplitudes: three 7°C interval cases, with minimum temperatures of 14, 18 and 21°C, a 9°C interval between 16 and 25°C, and 13°C interval, between 15 and 28°C.

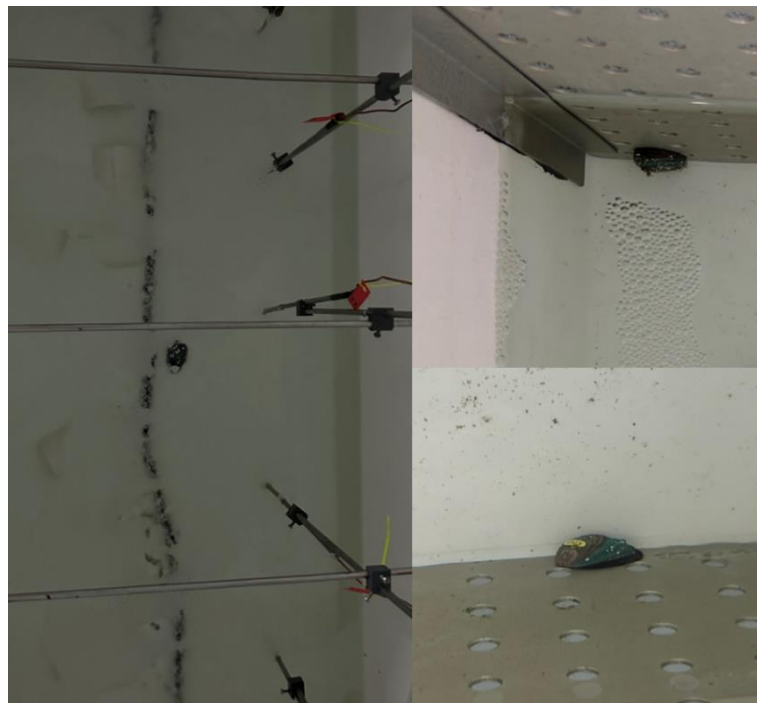


Figura 6. Fotogramas de los organismos en el sistema durante el experimento 5.

Figure 6. Photograms of organisms in the system during experiment 5.

DISCUSIÓN

Como cualquier sistema experimental, el simulador de gradiente que se presenta en este trabajo tiene limitaciones y ventanas de oportunidad para su mejora; sin embargo, se considera que se ha completado una primera fase de desarrollo gracias a que se logró generar gradientes entre 4 y 7°C en un canal de experimentación de más de 2,5 m útiles, de forma estable, a pesar de la manipulación de organismos y recambio de agua, homogéneo en la

vertical y a lo ancho del canal, y aproximadamente lineal en el cambio de temperatura por unidad de distancia a lo largo del mismo. También se considera exitoso que el sistema es autónomo en cuanto al forzamiento para mantener el gradiente, que cuenta con un sistema configurable de adquisición de datos de las características del agua en tiempo real y con una primera versión de sistema, también automático, de registro de imágenes para el análisis de la respuesta de los organismos.

A este nivel de desarrollo, la principal limitante que se identificó es que, dado que únicamente se instaló un tanque, actualmente resulta imposible realizar pruebas con repeticiones simultáneas y la única posibilidad de trabajo es la repetición secuencial. Para subsanar esta limitante y una vez probado su funcionamiento, nuestro grupo de trabajo buscará instalar tanques similares al menos por triplicado. También vemos oportunidades de mejora en el sistema de monitoreo de las condiciones en el tanque, además de la temperatura. Utilizando el mismo sistema de adquisición de datos, se buscará instalar sensores para la observación continua de oxígeno, salinidad, pH y amonio. En tercer lugar, se identificó una amplia ventana de oportunidad de mejora en las observaciones de los organismos y sus respuestas. En su versión actual, el sistema puede generar fotografías a intervalos discretos preestablecidos, que son analizadas posteriormente de forma manual. En trabajos previos, para otro tipo de experimentos, se exploró el uso de sistemas de toma de fotogramas y video, lo que ofrece una mucho mayor resolución temporal, y el procesamiento de imágenes asistido por aprendizaje profundo (*Deep Learning*; DL) y segmentación semántica, lo que permite trabajar en condiciones de poca luz y dar seguimiento autónomo a individuos (Calderón-Gurrola, 2024). Nuestra intención a mediano plazo es incorporar esa experiencia al módulo de registro de imágenes del sistema que aquí se reporta.

Declaración de conflicto de interés

Los autores no tienen conflicto de interés

Declaración de buenas prácticas en el uso de animales

El trabajo se ajustó a las mejores prácticas y pautas internacionales e institucionales en el uso de organismos acuáticos experimentales (Estrategia de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos 2021-2025. OIE, París, 32 pp. Disponible en: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/es-oie-aahs.pdf>).

Agradecimientos

Este es un producto del Proyecto CONAHCYT CF-2019 78911 “Impactos biológicos de la variabilidad y extremos de temperatura en ectotermos marinos bentónicos: aptitud biológica, potencial de adaptación y plasticidad fenotípica”.

REFERENCIAS

- Calderón-Gurrola G.I. (2024). Estudio del desplazamiento del abulón azul (*Haliotis fulgens*) ante condiciones ambientales adversas. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Díaz F., Re A.D., Galindo-Sánchez C.E., Carpizo-Ituarte E., Pérez-Carrasco L., González M., Licea A., Sánchez A., Rosas C. (2017). Preferred Temperature, Critical Thermal Maximum, and Metabolic Response of the Black Sea Urchin *Arbacia stellata* (Blainville, 1825; Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research* 36(1): 219-225. <https://doi.org/10.2983/035.036.0124>.
- García-Ávila M., Islas L.D. (2019) What is new about mild temperature sensing? A review of recent findings. *Temperature* 6(2): 132-141. <http://doi.10.1080/23328940.2019.1607490>
- Gvozdík L. (2015). Mismatch between ectotherm thermal preference and optima for swimming: a test of the evolutionary pace hypothesis. *Evolutionary Biology* 42: 137–145. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9305-z>
- Hui T.Y., Crickenberger S., Lau, J.W.T., Williams G.A. (2022). Why are ‘suboptimal’ temperatures preferred in a tropical intertidal ectotherm? *Journal of Animal Ecology* 91(7): 1400-1415. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13690>

- Jensen J.L.W.V. (1906). Sur les fonctions convexes et les inégalités entre les valeurs moyennes. *Acta Mathematica* 30(1): 175–193. <http://doi:10.1007/BF02418571>.
- Kamykowski D. (1981). Laboratory experiments on the diurnal vertical migration of marine dinoflagellates through temperature gradients. *Marine Biology* 62: 57–64. <https://doi.org/10.1007/BF00396951>
- Kita J., Tsuchida S., Setoguma T. (1996). Temperature preference and tolerance, and oxygen consumption of the marbled rockfish, *Sebastes marmoratus*. *Marine Biology* 125: 467-471.
- Lah R.A., Benkendorff K., Bucher D. (2017). Thermal tolerance and preference of exploited turbinid snails near their range limit in a global warming hotspot. *Journal of Thermal Biology* 64: 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.01.008>.
- Lewis L., Ayers J. (2014). Temperature preference and acclimation in the Jonah Crab, *Cancer borealis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 455: 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.02.013>.
- Martin T.L., Huey R.B. (2008). Why “Suboptimal” Is Optimal: Jensen’s Inequality and Ectotherm Thermal Preferences. *The American Naturalist* 171(3): E102-E118. <https://doi.org/10.1086/527502>
- Navas C.A., Gouveia S.F., Solano-Iguarán J.J., Vidal M.A., Bacigalupe L.D. (2021). Amphibian responses in experimental thermal gradients: Concepts and limits for inference. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 254: 110576. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110576>.
- Ritchie M.W., Dawson J.W., MacMillan H.A. (2021). A simple and dynamic thermal gradient device for measuring thermal performance in small ectotherms. *Current Research in Insect Science* 1: 100005. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2020.100005>.
- Salas A., Díaz F., Re A.D., Galindo-Sánchez C.E., Sánchez-Castrejón E., González M., Licea A., Sánchez-Zamora A., Rosas C. (2014). Preferred Temperature, Thermal Tolerance, and Metabolic Response of *Tegula regina* (Stearns, 1892). *Journal of Shellfish Research* 33(1): 239-246. <https://doi.org/10.2983/035.033.0123>

