



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

EVIDENCIAS DEL EFECTO NEGATIVO  
DE LA DISMINUCIÓN DEL pH SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y CALCIFICACIÓN DE  
*Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGÍSTER EN CIENCIAS DEL MAR

KATHY ZINDZI LIYI CÓRDOVA RODRÍGUEZ

LIMA – PERÚ

2016

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS

Dr. Dimitri Gutiérrez (Presidente)

Dra. Michelle Graco (Vocal)

M.Sc. Juan Arguelles (Secretario)

ASESOR DE LA TESIS

M.Sc Ernesto Fernández Johnston

Investigador del Instituto del Mar del Perú (IMARPE)

CO - ASESORES DE LA TESIS

M.Sc Arturo Aguirre

Investigador del Instituto del Mar del Perú (IMARPE)

y

Dr. Jonathan Flye-Sainte-Marie

LEMAR (UBO/CNRS/IRD), Université de Bretagne Occidentale

Brest, Francia

## DEDICATORIA

Dedicado a todos aquellos que pensaron que no iban a poder y finalmente pudieron.

A los que les dijeron que no iba ser posible y lo hicieron posible.

Esta tesis es prueba de ello.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concytec), a la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), al Laboratorio Mixto Internacional LMI-Discoh del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), a la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, siglas en inglés), por la beca y el apoyo económico para la realización de esta tesis.

A mis asesores Ernesto, Arturo y Jonathan por todo el tiempo brindado, el apoyo y consejos y mucho más que aprendí de ellos.

A Michelle Graco, quién participo activamente para la realización del proyecto y tesis, su apoyo fue fundamental para llevarla a cabo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Geología Marina del Instituto del Mar de Perú (Federico, Juanita, Ivan, Lizbeth, Maria del Carmen, Rodrigo y Geri), por todo el apoyo, consejos y ambiente acogedor para mí.

A mis maestros del programa de Ciencias del Mar, por sus consejos, apoyo, confianza depositada y buenas enseñanzas.

A mis compañeros de la maestría Ciencias del Mar por todo lo vivido juntos en las aulas y fuera de ellas, su apoyo moral, consejos, opiniones y buena compañía compartidas, en especial a Lander y Wilson por todos los debates, retroalimentación positiva y ayuda invaluable.

A Ivo y Junior, quienes ayudaron en el mantenimiento del sistema y muestreos realizados.

A los integrantes del área de Acuicultura (Gheraldine, Alexander, Sr. Carlitos, Mari, Candy y Jhon) por el apoyo brindado, las facilidades para los análisis y sus enseñanzas.

A el Ing. Jesús Ledesma y el Ing. Morón por brindar facilidades y su ayuda para la utilización de los equipos del Laboratorio de Hidroquímica en el Imarpe, y a la Sra. Ruth por su apoyo con los trámites y papeleos.

A José del Laboratorio de fitoplancton por su apoyo con los datos solicitados.

A Daniel Grados por sus valiosos aportes en la parte estadística.

A Nelson Lagos, Laura Ramajo y otros colaboradores chilenos por brindar información y consejos precisos.

A Robert Marquina y Luis Quipuscoa por colaborar con el uso de equipos y con las tomas fotográficas.

A mi familia (mi papá Raúl, mi mamá Angélica, mis hermanos Martha y Anthony) sin su ayuda y compañía no hubiera hecho realidad este trabajo.

## RESUMEN

La disolución de CO<sub>2</sub> antropogénico modifica el pH del agua de mar conduciendo así a la acidificación del océano que puede afectar organismos calcificantes como la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*). Sin embargo a lo largo de la costa peruana se encuentran condiciones naturales de bajo pH, en el hábitat de esta especie, producidas por el afloramiento costero. En este contexto este estudio evaluó experimentalmente el efecto del pH sobre el crecimiento, calcificación y disolución en juveniles de concha de abanico (talla promedio: 14 mm de altura). Los experimentos se realizaron durante aproximadamente un mes bajo dos condiciones de pH: el control, con agua de mar no manipulada y condiciones de pH similares a las encontradas *in situ* (pH<sub>T</sub> promedio = 7.8, rango = 7.4 - 7.9, el cual es bajo en comparación con otros ecosistemas) y el tratamiento, al cual se inyectó CO<sub>2</sub> puro para obtener condiciones menores de pH (pH<sub>T</sub> promedio = 7.4, rango = 7.1 - 7.6). Bajo las condiciones de pH del agua no manipulada del experimento, las conchas de abanico mostraron tasas de crecimiento (0.3 mm.día<sup>-1</sup>) como las que ocurren en su hábitat natural. La talla, el peso de las valvas y las tasas de crecimiento y las tasas de calcificación fueron significativamente menores en el tratamiento ( $p < 0.05$ ). El peso de las partes blandas no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento. Las tasas de disolución, que se calcularon a partir de valvas vacías, fueron significativamente mayores en el tratamiento ( $p < 0.05$ ). Los resultados obtenidos indican que las condiciones de bajo pH afectan el crecimiento de las partes duras de la concha abanico, lo cual puede hacerla más susceptible a la depredación

pudiendo también afectar el cultivo. Sin embargo, es necesario hacer más estudios durante la ontogenia del espécimen e incorporar otros estresores como el oxígeno además de evaluar otros procesos fisiológicos en esta especie a fin de poder comprender y predecir las respuestas frente a los cambios ambientales.

Palabras clave: *Argopecten purpuratus*, pH, crecimiento, calcificación, disolución.

## ABSTRACT

Dissolution of anthropogenic CO<sub>2</sub> modifies seawater pH thus leading to ocean acidification that might affect calcifying organisms such as scallops (*Argopecten purpuratus*). However, along the Peruvian coast natural conditions of low pH in the habitat of this species are encountered due to the nearby coastal upwelling. In this context, an experiment was performed in order to test the effects of low pH on growth, calcification and dissolution in juvenile scallops (average size: 14 mm high). During about a month, scallops were exposed to two different conditions: control with unmanipulated seawater presenting pH conditions similar to those found in situ (pH<sub>T</sub> mean = 7.8, range = 7.4-7.9, which is low in comparison to other ecosystems) and the treatment, in which seawater was injected pure CO<sub>2</sub> thus reducing pH (pH<sub>T</sub> mean = 7.4, range = 7.1-7.6). Under the control conditions, scallops exhibited a growth similar to those observed in the field (0.3 mm.d<sup>-1</sup>). Shell height and weight at the end of the experiment, growth and calcification rates were significantly lower in the low pH condition ( $p < 0.05$ ). The weight of the soft tissues showed no significant difference between treatments. Dissolution rates, calculated from empty shells, were significantly higher in the treatment ( $p < 0.05$ ). The results indicate that the low pH conditions affect the growth of the hard parts of the Peruvian scallop that might induce an increased susceptibility to predation that may affect the aquaculture of this species. However, further study is necessary during ontogeny and

incorporate other stressors such as oxygen depletion to better understand and predict responses of this species to environmental changes.

**Keywords:** *Argopecten purpuratus*, pH, growth, calcification, dissolution.

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
2.1.	Planteamiento del problema.....	3
2.2.	Marco teórico.....	5
2.2.1	<b>Formación de la concha en bivalvos:</b> .....	5
2.2.2.	<b>Tasas de Calcificación en bivalvos:</b> .....	8
2.2.3.	<b>La concha de abanico:</b> .....	10
2.2.4.	<b>Tasas de crecimiento de <i>A. purpuratus</i>:</b> .....	11
2.2.5.	<b>Efectos de la acidificación en moluscos</b> .....	12
2.2.6.	<b>Elección de los niveles de CO<sub>2</sub> para los experimentos:</b> .....	14
2.3.	Justificación del estudio .....	16
2.4.	Objetivos .....	18
2.4.1.	General:.....	18
2.4.2.	Específicos: .....	18
2.5.	Hipótesis .....	19
3.	METODOLOGÍA .....	20
3.1.	Material Biológico:.....	20
3.2.	Diseño experimental.....	20
3.2.1.	Unidad experimental: .....	20
3.2.2.	Condiciones experimentales.....	22
3.3.	Operacionalización de variables: .....	25
3.3.1.	Variables abióticas: .....	25
3.3.2.	Variables Biológicas: .....	26
3.4.	Técnicas y Procedimientos: .....	28
3.4.1.	Procedimiento para el transporte de las conchas de abanico .....	28
3.4.2.	Procedimiento para el etiquetado y marcado con Calceína.....	28
3.4.3.	Obtención de variables abióticas: .....	29
3.4.3.1.	Medición directa de variables: .....	29

3.4.4.	Obtención de variables biológicas: .....	32
3.4.4.1.	Mediciones directas de las variables biológicas:.....	32
3.4.4.2.	Procedimientos para obtener variables biológicas: .....	33
3.4.4.3.	Obtención de variables biológicas calculadas:.....	33
3.5.	Consideraciones éticas: .....	36
3.6.	Análisis estadístico: .....	36
4.	RESULTADOS.....	37
4.1.	Condiciones experimentales: .....	37
4.1.1.	Variables físico-químicas:.....	37
4.1.2.	Variables del sistema de carbonatos .....	40
4.1.3.	Fitoplancton .....	43
4.2.	Crecimiento.....	44
4.2.1.	Crecimiento en talla .....	45
4.1.1.	Crecimiento en peso seco libre de cenizas .....	45
4.1.2.	Cantidad de agua del tejido blando .....	45
4.1.3.	Crecimiento en peso de la valva .....	47
4.1.4.	Diferencias entre grupos: .....	47
4.2.	Tasas .....	49
4.2.1.	Tasa de crecimiento .....	49
4.2.2.	Tasas de calcificación neta.....	51
4.2.3.	Tasa de disolución:.....	53
5.	DISCUSIÓN .....	59
5.1.	Variables ambientales y de la química de los carbonatos: .....	59
5.2.	El crecimiento .....	65
5.3.	Calcificación y disolución.....	68
5.4.	Mortalidad y desarrollo gonadal .....	72
5.5.	Respuesta de la concha de abanico a bajo pH e implicancias futuras .....	74
6.	CONCLUSIONES .....	77
7.	RECOMENDACIONES.....	79

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 80

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Presiones de CO <sub>2</sub> recomendadas para experimentos en acidificación del océano (Tomado de Riebesell et al. 2011). .....	16
<b>Tabla 2</b> Resumen de variables bióticas. ....	25
<b>Tabla 3</b> Resumen de las variables biológicas.....	27
<b>Tabla 4</b> Variables del sistema de carbonatos durante el experimento. Se muestra el promedio y la desviación estándar.....	43
<b>Tabla 5</b> Altura valvar, Peso Seco Libre de Cenizas, Contenido de agua del tejido blando, Peso de la valva y relación Peso valva por Altura al cubo correspondientes a los ejemplares de <i>A. purpuratus</i> del G1 para las tres evaluaciones: en el inicio (Día 0) a la mitad (Día 14) y al final del experimento (Día28). Se muestran los promedios y sus respectivos intervalos de confianza. <i>U</i> es el estadístico de la prueba de <i>U</i> de Man Whitney y <i>t</i> de la prueba <i>t</i> de student.....	46
<b>Tabla 6</b> Altura y peso de la valva de <i>A. purpuratus</i> para los tres grupos. G1, G2 y G3. Se muestran los promedios para el control y el tratamiento y si existen diferencias estadísticas entre ambos. <i>U</i> es el estadístico de la prueba de <i>U</i> de Man Whitney y <i>t</i> de la prueba <i>t</i> de student. ....	48
<b>Tabla 7</b> Tasas de crecimiento (mm.día <sup>-1</sup> ) de <i>A. purpuratus</i> de los diferentes grupos (G1, G2 y G3) para cada intervalo de tiempo del experimento. Se muestran los promedios y si existen diferencias significativas. <i>U</i> es el estadístico de la prueba de <i>U</i> de Man Whitney.....	50
<b>Tabla 8</b> Tasas de calcificación neta (mgCaCO <sub>3</sub> .g <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup> ) de <i>A. purpuratus</i> . Tasas calculadas en conchas de los grupos 1 y 2 (G1 y G2), se muestran los promedios para el tratamiento y el control y además el <i>p</i> valor producto de la comparación entre ambos. ....	52

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1:</b> Fórmula para hallar el pH en escala total.....	31
<b>Ecuación 2</b> Regresión para hallar el pHT a partir de las lecturas de pH en el Control. ....	31
<b>Ecuación 3</b> Regresión para hallar el pHT a partir de las lecturas de pH en el Tratamiento.....	31
<b>Ecuación 4</b> Ecuación para obtener el peso seco de la valva (Psv) a partir del peso boyante (Pb) del Tratamiento.....	34
<b>Ecuación 5</b> Ecuación para obtener el peso seco de la valva (Psv) a partir del peso boyante (Pb) del Control.....	34
<b>Ecuación 6:</b> Ecuación para obtener el peso del carbonato de calcio de la valva (pCaCO <sub>3</sub> ) a partir del peso seco de la valva (psv) del Control.....	34
<b>Ecuación 7</b> Ecuación para obtener el peso del carbonato de calcio de la valva (pCaCO <sub>3</sub> ) a partir del peso seco de la valva (psv) del Tratamiento.....	35
<b>Ecuación 8</b> Ecuación para obtener la Tasa de calcificación neta (TCN), donde PfCaCo <sub>3</sub> : Peso final del carbonato de calcio, PiCaCO <sub>3</sub> : Peso inicial del carbonato de calcio y Psvi: Peso seco de la valva inicial. ....	35
<b>Ecuación 9</b> Ecuación para obtener la Tasa de crecimiento, donde Af: Altura final y Ai: Altura inicial. ....	35
<b>Ecuación 10</b> Ecuación para obtener la tasa de disolución (TD) donde Psvf: Peso seco de la valva final y Psvi: Peso seco de la valva inicial.....	36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Proceso de calcificación de la concha de un molusco (adaptado de Marin y Luquet 2004). La calcificación del crecimiento de la concha tiene lugar en el borde distal de la concha, en un compartimento – el espacio extrapaleal conteniendo el fluido extrapaleal- encerrado por epitelio calcificante, el periostraco y la concha en sí misma. (Tomado de Esteban 2006) ..... 6
- Figura 2** Diagrama mostrando las relaciones de CO<sub>2</sub> al carbonato de calcio y la matriz orgánica de la concha. No todas las rutas mostradas han sido firmemente establecidas (Tomado de Wilbur 1964). ..... 8
- Figura 3** Ciclo de vida de la concha de abanico. (Tomado de Aguirre 2009)..... 11
- Figura 4** A la izquierda: vista de planta de la unidad experimental (tanque). A la derecha: Esquema de la unidad experimental. Se observa la división para el G1, G2 y G3. El compartimiento del tanque para el G1 es de mayor tamaño por el número de individuos que contiene, y que consiste en la mitad del tanque. El espacio para el G2 está a la derecha inferior de la foto. El espacio para el G3 lado izquierdo inferior de la foto que corresponde a una cuarta parte del tanque. El G4, valvas vacías están en unas cajitas de plástico pequeñas. Cada compartimiento del tanque está dividido con una malla para evitar que se junten individuos de distinto grupo. .... 22
- Figura 5** Esquema general del experimento mostrando con flechas el flujo de los fluidos (CO<sub>2</sub> puro, agua de mar, mezcla de fitoplancton) que ingresan o salen de los tanques. .... 24
- Figura 6** Arreglo para determinar el peso boyante. La balanza está sobre una superficie, debajo de la balanza existe un elemento propio de la balanza, que permite sujetar un

cestillo que cuelga y está sumergido en agua de mar. Dentro del cestillo se ponen las conchas de abanico para ser pesadas.....	32
<b>Figura 7</b> Evolución temporal de a) la temperatura (°C) y b) la Saturación de Oxígeno (%) durante el experimento para el Control y el Tratamiento.....	37
<b>Figura 8</b> Evolución temporal de las variables del sistema de carbonatos durante el experimento: (a) pH en escala total, (b) alcalinidad total, (c) presión parcial de CO <sub>2</sub> y (d) estado de saturación de la Calcita, la línea en el valor de 1 muestra el límite de saturación de la Calcita, valores menores a 1 corresponden a un estado de insaturación de la Calcita.....	40
<b>Figura 9</b> Evolución temporal de: (a) la altura valvar, (b) el peso seco libre de cenizas, (c) el contenido de agua del tejido blando y (d) el peso de la valva correspondiente a los individuos de <i>A. purpuratus</i> del G1 durante el experimento. Las barras indican Intervalo de confianza al 95%.....	44
<b>Figura 10</b> Tasa de crecimiento de <i>A. purpuratus</i> correspondiente al G3.....	49
<b>Figura 11</b> Tasa de calcificación neta de <i>A. purpuratus</i> . Tasas calculadas en individuos del grupo 1 (G1).....	52
<b>Figura 12</b> Tasa de disolución de la valva de <i>A. purpuratus</i> . Tasa calculada a partir de valvas vacías (G4) colocadas en el experimento.....	54
<b>Figura 13</b> Corrosión y desgaste superficial en <i>A. purpuratus</i> . Nótese en las imágenes estereoscópicas de la derecha (B) el mayor desgaste, corrosión y disolución de la superficie de las valva crestas (en círculo) de las conchas sometidas al tratamiento con menor pH en comparación con las conchas del control hacia la izquierda (A). .....	55

**Figura 14** Fotografía de la valva superior de *A. purpuratus*. Las columnas corresponden a los 4 grupos (G1, G2, G3 y G4) y las filas corresponden al control (C) y tratamiento (T). La barra color blanco mide 1cm. .... 56

**Figura 15** Evolución temporal de la mortalidad total y por grupos (G1, G2 y G3) de *A. purpuratus* durante el experimento. .... 57

## 1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente un tercio del carbono antropogénico es absorbido por los océanos (Sabine et al. 2004). La absorción del CO<sub>2</sub> atmosférico tiene como resultado una disminución del pH del océano, la cual es llamada acidificación del océano (Caldeira & Wickett 2003). Los organismos marinos calcáreos están siendo estresados en mayor medida, entre otros efectos, debido a que las tasas de calcificación neta son afectadas por la disminución de la saturación de carbonato de calcio, la reducción de la disponibilidad de iones de carbonatos (Fabry et al. 2008; Hall-Spencer et al. 2008) y el incremento de la disolución (Rodolfo-Metalpa et al. 2011).

Las elevadas presiones parciales de CO<sub>2</sub>, que conducen a la disminución del pH el océano, son producidas por: CO<sub>2</sub> atmosférico, respiración, eutrofización, afloramiento, deposición atmosférica de nitrógeno y azufre proveniente de la combustión y la agricultura, derretimiento de glaciares, alteración de ciclos hidrobiológicos y bioquímicos, y precipitación y tormentas (Breitburg et al. 2015). El sistema de afloramiento del mar peruano es una zona de desgasificación o liberación de CO<sub>2</sub> hacia la atmósfera y presenta valores bajos de pH entre 7.6 y 8 (León et al, 2011) debido al alto contenido de CO<sub>2</sub> de las aguas advectadas (Friederich et al. 2008). Además considerando que el pH para el año 2100 podría disminuir en 0.3 a 0.4 unidades de pH (IPCC 2013), las condiciones del mar en términos del stress por disminución del pH se incrementarán.

La “concha de abanico”( *Argopecten purpuratus*) que se distribuye entre Perú y Chile desde Paita, Perú (5°) a Tongoy, Chile (30°S) (Wolff & Mendo 2000) es una especie de importancia ecológica y económica para el Perú, donde se le encuentra en bahías someras. Su extracción y cultivo sustenta toda una cadena productiva y de valor de la cual dependen poblaciones costeras de pescadores artesanales y la industria que lo procesa. No se conoce la vulnerabilidad de esta especie frente a un pH bajo como estresor. Por este motivo este trabajo experimental evaluó los efectos de la alta presión de CO<sub>2</sub> y bajo pH sobre el crecimiento y las tasas de calcificación de la concha de abanico juvenil, cuyo estadio de vida temprano es propicio para poder tener las mayores tasas de crecimiento.

## 2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1. Planteamiento del problema

Con el objetivo de conocer los efectos que altas presiones de CO<sub>2</sub> y bajos pH en el agua de mar causan en los bivalvos, se han realizado a la fecha numerosos estudios en distintas especies, encontrándose variadas respuestas como efectos negativos, positivos o neutros (Ries et al. 2009; Gazeau et al. 2013; Parker et al. 2013) en términos de sobrevivencia, calcificación y crecimiento, crecimiento somático, tasas de respiración, excreción y aclaramiento, regulación ácido-base, comportamiento y respuesta inmune. Estudios en pectínidos han mostrado esta variedad de respuestas y específicamente en *A. purpuratus* en Chile, Ramajo et al. (2015) indicó una respuesta positiva en calcificación y crecimiento.

El estudio del crecimiento de esta especie en su hábitat natural y en cultivo ha sido bien estudiado, pero no considerando al pH como estresor. A diferencia de la tasa de crecimiento, el conocimiento de la tasa de calcificación neta es reducido para esta especie. Sin embargo, es posible calcular este parámetro utilizando técnicas destructivas (para obtener el peso de la valva) y conservativas (técnica del peso boyante para inferir el peso de la valva a partir de individuos vivos). Se desconoce aún varios aspectos de la calcificación de la concha de abanico, su variación a lo largo de su desarrollo ontogénico y en las distintas poblaciones a lo largo de Sudamérica y las fuentes de carbono que usa para calcificar.

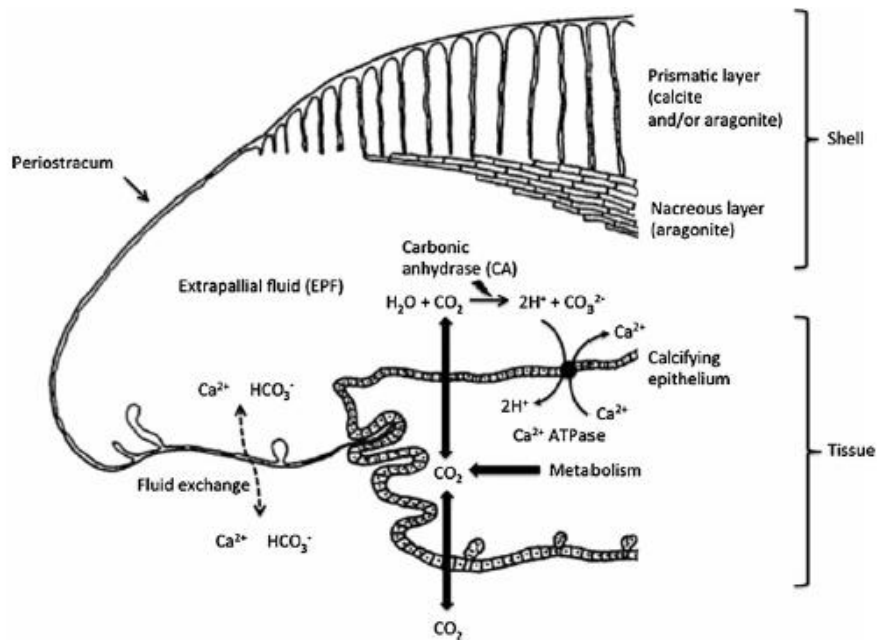
Para poder hacer correctas interpretaciones de los experimentos hay que evaluar la química del agua de mar donde se desarrolla la especie objetivo (McElhany and Busch 2013). En el Perú aún es limitado el conocimiento de las variables del sistema de carbonatos en el hábitat de la concha de abanico; tampoco se han realizado experimentos de acidificación en relación a esta especie.

Bajo las características del agua naturalmente acidificada donde vive la concha de abanico, y el vacío de conocimiento que se tiene respecto a la calcificación y el crecimiento, esta investigación plantea la siguiente pregunta: ¿Cómo responde la concha de abanico a condiciones de mayor acidez en términos de calcificación y crecimiento?

## 2.2. Marco teórico

### **2.2.1 Formación de la concha en bivalvos:**

El esqueleto calcáreo es el resultado del proceso de mineralización, biológicamente controlado y genéticamente programado (Wheeler 1992). La calcificación, un tipo de biomineralización, envuelve un control biológico extracelular de cristalización de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  a través de la interacción de constituyentes orgánicos e inorgánicos encontrados dentro del fluido extrapaleal localizado entre el manto y la concha (Weiner and Dove 2003) (Ver Figura 1). El periostraco orgánico es secretado por el epitelio del manto en la base del periostraco, entre la capa externa y media del manto y puede servir como un sitio de deposición para el  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  (Kennedy et al. 1969). Este proceso muestra que todos los constituyentes formadores de la concha deben estar presentes dentro del fluido extrapaleal para su polimerización y precipitación.



**Figura 1** Proceso de calcificación de la concha de un molusco (adaptado de Marin y Luquet 2004). La calcificación del crecimiento de la concha tiene lugar en el borde distal de la concha, en un compartimento – el espacio extrapaleal conteniendo el fluido extrapaleal- encerrado por epitelio calcificante, el periostraco y la concha en sí misma. (Tomado de Esteban 2006)

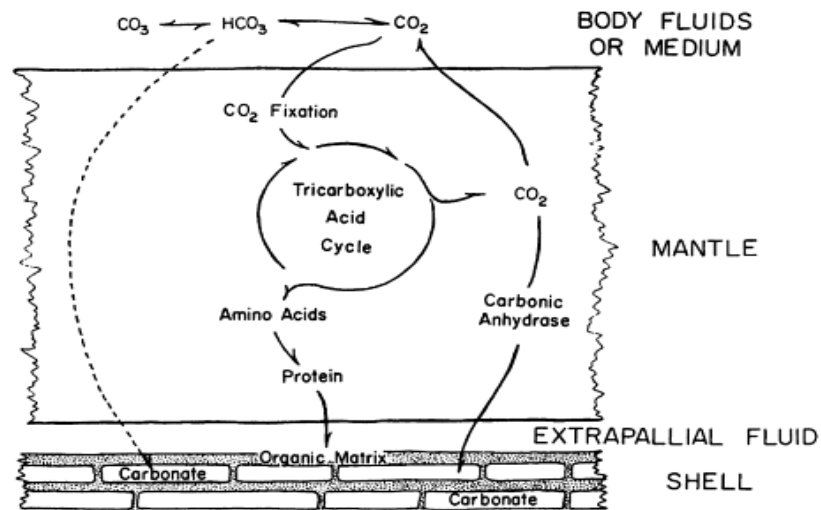
La deposición de la concha se inicia con la formación del periostraco en el margen del manto. El periostraco actúa como una capa protectora. Los cristales de carbonato de calcio son inducidos a formarse dentro de los espacios de la matriz con el núcleo de espacios compuestos de una capa de b-quitina encerrada entre dos capas de proteína rica en glicina y alanina (Falini et al. 1996). Inicialmente las esférulas de CaCO<sub>3</sub>(s) desde dentro del armazón de quitina son del tipo polimórfico (calcita/aragonita) controlado por la composición de proteínas dentro del periostraco

(Falini et al. 1996). La microestructura y el crecimiento de los cristales son mantenidos por el fluido extrapaleal durante el proceso de crecimiento de la concha.

Los factores que gobiernan la biomineralización incluyen: el ambiente y aquí particularmente la temperatura del agua, las diferentes especies de carbono, salinidad y pH; la disponibilidad de alimento y el grado de competencia y la densidad poblacional (Hahn et al. 2012).

La fuente de carbono para construir la concha de carbonato de calcio puede provenir de dos reservorios, uno de ellos es el DIC (Carbono Inorgánico Disuelto) del agua mar y el otro, es el CO<sub>2</sub> metabólico producto de la respiración. Al respecto Lorrain et al. (2004), usando isotopos de <sup>13</sup>C pudo calcular que el CO<sub>2</sub> producto de la respiración contribuye con el 10% del carbono depositado en las conchas de *Pecten maximus*.

La tasa de formación de la concha podría estar gobernada por: 1) suministro de calcio desde el manto por la sangre o el medio interno. 2) la tasa de conversión de CO<sub>2</sub> a bicarbonato y carbonato (ver Figura 2 ). 3) la tasa de síntesis de componentes de la matriz orgánica 4) tasa de secreción de calcio y componentes de la matriz por el manto, y 5) suficiente pH alcalino del fluido extrapaleal. La tasa de incremento del área de la concha es función del incremento del área del manto, mientras que la tasa de grosor y peso de la valva es función de la tasa de secreción del CaCO<sub>3</sub> y la matriz orgánica (Wilbur 1964).



**Figura 2** Diagrama mostrando las relaciones de  $\text{CO}_2$  al carbonato de calcio y la matriz orgánica de la concha. No todas las rutas mostradas han sido firmemente establecidas (Tomado de Wilbur 1964).

### 2.2.2. Tasas de Calcificación en bivalvos:

Las tasas de formación de la concha en bivalvos están gobernadas por la disponibilidad de los constituyentes (calcio, bicarbonato, proteínas y pH alcalino en el fluido extrapaleal), las reacciones metabólicas asociadas y el crecimiento del cristal (Wilbur 1964). Además también existe una influencia del medio externo sobre el crecimiento como la temperatura, oxígeno, salinidad, disponibilidad de alimento, densidad de los organismos (Lorrain et al. 2004; Hahn et al. 2012) entre otros.

Otros elementos relacionados a la ontogenia de la especie también influyen en la calcificación como la formación de gónadas, por su alta demanda de energía. Según Palmer (1992), la energía utilizada para calcificar de ciertas especies es más baja que

para otros costos metabólicos. Sin embargo, la disolución de la concha, producida por un bajo pH del medio, puede ejercer un costo energético o físico e interferir en la función de homeostasis (Pörtner 2008). Frente a condiciones ácidas el gasto de energía para producir material calcificado se incrementa y esto puede hacer que el organismo crezca menos (Findlay et al. 2009).

La calcificación neta es la diferencia de dos procesos: la calcificación bruta y la disolución. Es posible medir la calcificación neta de los bivalvos, a través de un método destructivo, a partir del peso de las valvas vacías después de sacrificar al individuo. También a partir de un método conservativo, usando la técnica del peso boyante (Palmer 1982).

La literatura muestra que las tasas de calcificación de bivalvos han sido expresadas de distintas unidades. Un gran grupo de autores ha expresado las tasas de calcificación neta en gramos, microgramos o miligramos de  $\text{CaCO}_3$  dividido entre gramos del peso inicial y el intervalo de tiempo en días (Gazeau et al. 2007; Rodolfo-Metalpa et al. 2010, 2011; Waldbusser et al. 2011; Ramajo et al. 2015). Por otro lado hay quienes sólo han expresado la tasa de calcificación en peso de  $\text{CaCO}_3$  dividido entre el tiempo (Fabry et al. 2008; Duarte et al. 2014).

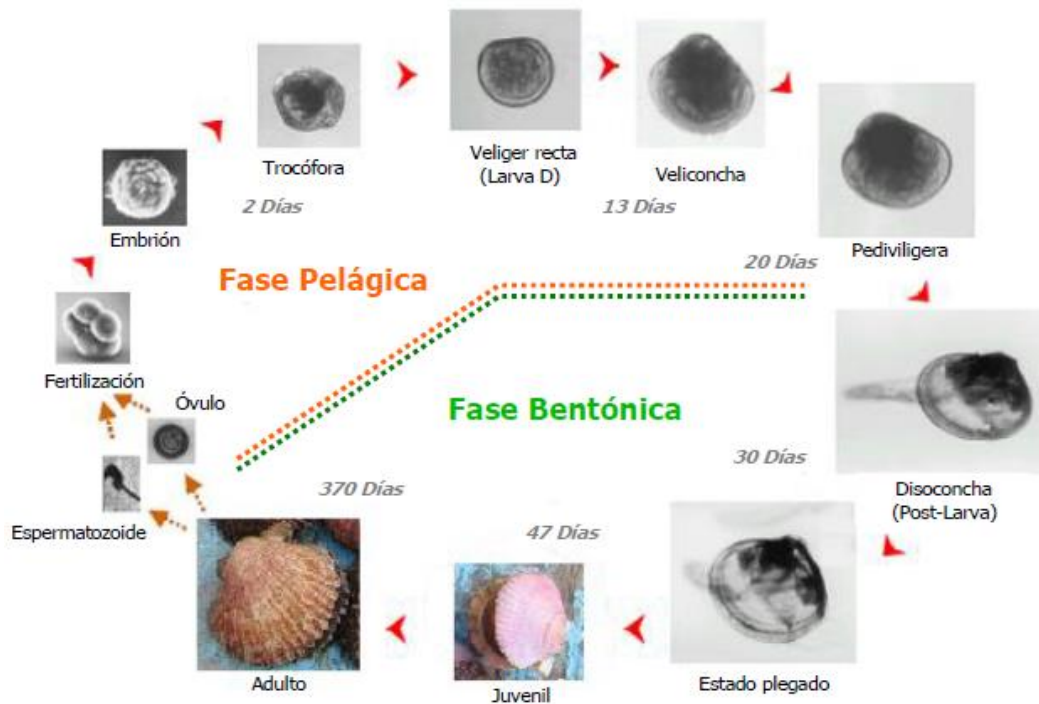
Los pectínidos estudiados a la fecha han mostrado efectos negativos frente al incremento de la presiones de  $\text{CO}_2$  o la disminución del pH del agua de mar (Parker et al. 2013) y en términos de calcificación en *Arpopecten irradians* la respuesta fue negativa (Ries et al. 2009). Sin embargo, ha sido reportada una respuesta positiva en *A. purpuratus* frente a la disminución del pH en el agua de mar (Ramajo et al. 2015).

### 2.2.3. La concha de abanico:

El *A. purpuratus* es la única especie de pectínido de importancia comercial en el sistema de afloramiento del Pacífico Sur Este. Este pertenece al género *Argopecten*, que evolucionó en la región subtropical del Caribe/Atlántico, desde donde dio origen a la radiación de especies dentro del Pacífico y el Atlántico (Waller 1969). De las 10 especies recientes del género *Argopecten*, solo dos persisten en el Pacífico: *Argopecten circularis* en México y Ecuador y *A. purpuratus* en Perú y Chile. El cual es encontrado en bahías someras desde Paita Perú (5°S) a Tongoy, Chile (30°S).

El ciclo de vida de la concha de abanico presenta dos fases importantes: una larval pelágica que tiene una duración aproximada de 30 días desde la fecundación (dependiente de la temperatura) y una bentónica que empieza cuando la postlarva cae al fondo y busca un substrato para su fijación mediante filamentos llamados biso (**Figura 3**). A pesar de poseer fibras de biso para su fijación a un substrato durante parte de su ciclo de vida (juvenil) tiene capacidad, aunque limitada, de locomoción (Navarro 2002).

*A. purpuratus* es una especie con una maduración sexual muy temprana (Mendo et al. 1987).



**Figura 3** Ciclo de vida de la concha de abanico. (Tomado de Aguirre 2009)

#### 2.2.4. Tasas de crecimiento de *A. purpuratus*:

La tasa de crecimiento de *A. purpuratus* ha sido estudiada en el Perú por diversos autores y en distintas condiciones ya sea en su ambiente natural o en zonas de cultivo o en experimentos controlados. Wolff (1987) reportó tasas de crecimiento de 0.4 y 0.5 mm/día, en Bahía Independencia (14°S) durante el fenómeno del Niño 1983. Cisneros et al. (2008) reportó tasas de crecimiento entre 0.2 y 0.3 mm/día en un experimento en cultivo suspendido en Pucusana (12°S) durante comparaciones entre cultivos suspendido y de fondo, Alcazar & Mendo (2008) reportaron 0.33mm/día

para el cultivo suspendido y 0.21 mm/día para el cultivo de fondo en un experimento realizado en Casma (9°S). Aguirre et al. (2015) reportó para cultivo en la Bahía de Paracas (13°S) una tasa de crecimiento entre 0.25 y 0.39 mm/día.

En Chile, en la Bahía La Rinconada (23°S), Avendaño & Cantillán (2008) durante El Niño reportaron tasas de crecimiento de 0.175 mm/día, de 0.143 mm/día durante un año normal y de 0.082 mm/día durante un verano frío (La Niña). En otro estudio en La Rinconada Avendaño et al. (2008) en estadios post larvales se reportaron tasas de crecimiento de 0.086 mm/día en el fondo (16m de profundidad) y de 0.146 mm/día a un metro de la superficie.

Al sur de Chile (41°S) en una zona de cultivo López et al. (2000) realizó un estudio de crecimiento en concha de abanico y a partir de los datos se realizó cálculos de las tasas de crecimiento obteniéndose entre 0.27 y 0.5 mm/día. González et al. (1999), comparó dos lugares para cultivar *A. purpuratus*, encontrando tasas de crecimiento de 5.21 mm/mes en Metri Bay y 3.47 mm/mes en Quihua Channel.

#### **2.2.5. Efectos de la acidificación en moluscos**

Los efectos de la acidificación del océano (disminución del pH en el agua de mar) en los organismos marinos como los moluscos han sido variados. Doney et al. (2009), recopiló información de las respuestas fisiológicas de distintos grupos principales de biota marina, mostrando que la calcificación tiene respuestas negativas frente al incremento de CO<sub>2</sub> en la mayoría de las especies estudiadas de cocolitofóridos,

foraminíferos planctónicos, moluscos, equinodermos, corales tropicales y algas rojas coralinas. Pocas especies de estos grupos mostraron respuestas positivas, neutras u óptimas; la fotosíntesis que se evaluó en cocolitofóridos, procariotas y macro algas no fueron afectados negativamente por el incremento del CO<sub>2</sub>; la fijación de nitrógeno por una especie de cianobacteria mostró una respuesta positiva y la reproducción de algunas especies de moluscos y equinodermos mostraron respuestas negativa frente al incremento de CO<sub>2</sub>.

En adición a estas respuestas mixtas con relación a la calcificación, Ries et al. (2009) hizo un experimento en 18 especies de calcificadores dentro de un amplio rango de grupos taxonómicos (crustáceos, cnidarios, equinoidea, rodofitas, clorofitas, gasterópodos, bivalvos y anélidos) de los cuales 11 especies mostraron reducidas tasa de calcificación y disolución en altas presiones de CO<sub>2</sub>, y 7 especies exhibieron incremento de la calcificación bajo presiones parciales de CO<sub>2</sub> intermedias y altas. Todas estas respuestas variadas podrían reflejar las diferencias entre organismos y su habilidad en la regulación del pH en las zonas de calcificación, en la cubierta orgánica de sus conchas, en la solubilidad de su concha.

Los moluscos presentan respuestas especie-específicas respecto a un incremento de CO<sub>2</sub> en el agua de mar según la recopilación que hizo Parker et al. (2013), donde mostró que más del 60% de las especies que han sido objeto de estudios en acidificación muestran respuestas negativas frente al incremento de presión de CO<sub>2</sub> y al bajo pH. En una revisión hecha por Gazeau et al. (2013), respecto a los estudios realizados en estadios larvales de los moluscos, un gran porcentaje de estos muestran respuestas negativas, un menor porcentaje muestran respuestas neutras frente a la

acidificación del océano en relación a las siguientes variables: la fertilización, el éxito larval temprano, la sobrevivencia, la talla, la tasa de desarrollo, la normalidad de la concha y el asentamiento larval. Respecto a los adultos y los juveniles de moluscos, presentaron respuestas mixtas (positivas, negativas y neutras) bajo altas presiones parciales de CO<sub>2</sub> cuando se evaluó las siguientes características: sobrevivencia, calcificación / crecimiento de concha, tasas de respiración y tasas de aclaramiento. Cuando se evaluó el comportamiento y la respuesta inmune en los adultos y juveniles, estos mostraron respuestas negativas frente a un incremento de CO<sub>2</sub> y disminución de pH; el crecimiento somático se mostró respuesta neutra; las tasas de excreción se mostraron respuestas neutras y positivas; y la regulación ácido-base mostró respuestas negativas y neutras.

En relación a los pectínidos el 100% de los estudios recopilados en la revisión de Parker et al. (2013) mostraron efectos negativos frente a la acidificación.

#### **2.2.6. Elección de los niveles de CO<sub>2</sub> para los experimentos:**

En diversos experimentos de acidificación que han sido mencionados en una revisión que realizó Parker et al. (2013), los experimentos tuvieron distinta duración desde 2 horas hasta 120 días. En cuanto la concentración de CO<sub>2</sub> usada en estos experimentos, se utilizaron desde 187 µatm de pCO<sub>2</sub> equivalente a un pH de 8.32 (Cummings et al. 2011) hasta 33000 µatm de pCO<sub>2</sub> equivalente a un pH de 6.35 (Hammer et al. 2011), utilizando entre 2 y 6 tratamientos. El valor de pCO<sub>2</sub> control, es considerado como la concentración actual de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y el pH del agua de mar, la cual fue

variable a través de los experimentos desde un pH de 7.8 y 663  $\mu\text{atm}$  de  $\text{pCO}_2$  (Bibby et al. 2008) hasta un pH de 8.32 y 33000  $\mu\text{atm}$  de  $\text{pCO}_2$  (Cummings et al. 2011), con esto se puede notar que las condiciones actuales del agua de mar son variables en términos de pH y  $\text{pCO}_2$ .

Varios autores han basado la elección de sus tratamientos en las predicciones de Caldeira & Wickett (2003) y en el trabajo de Kurihara (2008). Por otro lado, Duarte et al. (2014) menciona que las concentraciones de  $\text{CO}_2$  fueron seleccionadas tomando en cuenta la tasa de cambio proyectado por modelos del IPCC para los años 2070-2110 (basado en la tasa de cambio de la predicción de pH para el escenario más extremo (escenario RPC8.5) de  $\text{CO}_2$  atmosférico).

Broadaway (2012) que hizo un experimento con *A. irradians*, eligió el valor de pH control (en la escala NBS, la cual está basada solo en la concentración de protones libres, sin considerar las variaciones que genera la salinidad del agua de mar en el pH) en 7.8, basándose en las condiciones de campo donde vive la especie en Nantucket Harbor. Las  $\text{pCO}_2$  en  $\mu\text{atm}$  que usó fueron de  $513\pm 202$  (control),  $1045\pm 105$  (tratamiento 1),  $1880\pm 223$  (tratamiento 2) y  $3440\pm 544$  (tratamiento 3). Las concentraciones de  $\text{pCO}_2$  son similares a las usadas por Ries et al. (2009), que también son representativos de los valores que se ha predicho para el milenio entrante por Feely et al. (2004)

Según la guía de buenas prácticas para investigaciones en acidificación del océano y reporte de data de Riebesell et al. (2011); se recomienda el uso de ciertos niveles de  $\text{pCO}_2$  dependiendo del número de tratamientos que se va a trabajar (ver Tabla 1).

**Tabla 1** Presiones de CO<sub>2</sub> recomendadas para experimentos en acidificación del océano (Tomado de Riebesell et al. 2011).

<b>Número de tratamientos</b>	<b>Niveles recomendados de pCO<sub>2</sub></b>
<b>2</b>	Presente (~385), 750
<b>3</b>	280, presente, 750
<b>4</b>	280, presente, 550, 750
<b>6</b>	280, presente, 550, 650, 750, 1000
<b>8</b>	180, 280, presente, 450, 550, 650, 750, 1000
<b>&gt;8</b>	Agregar valores (ej. 350, otros) para incrementar resolución

Esta tabla fue traducida del inglés

### 2.3. Justificación del estudio

En base a las tendencias hechas por el IPCC (2013) para el Pacífico Oriental el pH va a disminuir entre 0.2 y 0.3 para el 2100. Sin embargo, no se han hecho predicciones de condiciones futuras para zonas más costeras como bahías y además la falta de disponibilidad de datos de los seguimientos realizados en relación al sistema de carbonatos.

Podemos mencionar que el presente trabajo de investigación otorgará un aporte al conocimiento de las respuestas de la concha de abanico frente a condiciones de pH actual y más bajo en zonas de bahías como Paracas y otros lugares.

El conocimiento del efecto que tendrá el bajo pH (alta  $p\text{CO}_2$ ) sobre la calcificación y el crecimiento será importante para poder hacer las primeras aproximaciones de cuán vulnerable es esta especie frente al cambio climático y la acidificación del océano.

El conocimiento de las respuestas y los efectos que generarían altas  $p\text{CO}_2$  sobre el crecimiento y la calcificación de la concha de abanico, una especie adaptada a las condiciones ácidas de su hábitat será de ayuda en temas de adaptación al cambio climático.

El conocimiento de la vulnerabilidad de las especies de importancia económica frente a la acidificación del mar es importante puesto que hay toda una cadena social respaldada por la concha de abanico que también podría verse afectada. Por lo tanto, la población beneficiaria son todos los involucrados en el cultivo, procesamiento, transporte y todos los eslabones de la cadena productiva del cultivo y extracción de concha de abanico y las poblaciones que se benefician indirectamente de esta actividad económica.

## 2.4. Objetivos

### 2.4.1. General:

Evaluar los efectos que un bajo pH, una elevada pCO<sub>2</sub> y el cambio en la química de carbonatos en el agua de mar tienen sobre la calcificación y el crecimiento de la concha de abanico.

### 2.4.2. Específicos:

- Determinar el efecto de un bajo pH del agua de mar sobre las tasas de calcificación de *A. purpuratus*.
- Determinar el efecto de un bajo pH del agua de mar sobre las tasas de disolución de *A. purpuratus*.
- Determinar el efecto de un bajo pH del agua de mar sobre el crecimiento de *A. purpuratus*.
- Estimar la mortalidad de juveniles de *A. purpuratus* en el experimento.

## 2.5. Hipótesis

Algunas especies de cocolitofóridos presentan fuerte calcificación en aguas con bajo pH (Beaufort et al. 2011). Asumiendo que es posible la adaptación de las especies a su hábitat natural con bajo pH. En el caso de la concha de abanico, en estudios de campo se ha visto que existe un mayor peso de las valvas en el cultivo de fondo que en el suspendido (Alcazar & Mendo 2008), pero que el crecimiento de las conchas de abanico es mayor en el cultivo suspendido que el de fondo (Aguirre 2008; Alcazar & Mendo 2008) siendo una probable consecuencia de la diferencia del pH en la columna de agua y el agua de fondo. En base a estos antecedentes, planteamos la siguiente hipótesis:

El bajo pH (~7.4) del agua de mar tiene un efecto positivo sobre la calcificación y un efecto negativo sobre el crecimiento de *A. purpuratus*, dado a que esta condición produce mayor disolución y la concha de abanico la contrarresta incrementando la calcificación.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Material Biológico:

Un millar de juveniles de *A. purpuratus* (de ~ 1 mm de longitud de la valva) que fueron entregados por el hatchery del Centro Acuícola La Arena, Casma (9°S) el cual pertenece al Fondo de Desarrollo Pesquero (FONDEPES), y fueron transportados hasta el Laboratorio de Ecofisiología Acuática del Instituto del Mar de Perú (IMARPE) en el Callao (12°S) donde se realizó el experimento.

Los especímenes fueron aclimatados durante 15 días, en un tanque de 200 litros con agua de mar filtrada con filtros cartucho (5-10 µm), a una temperatura de 17 °C, pH de 7.8, con aireación constante, alimentadas con una mezcla de 50% de *Isocrisis galbana* y 50% de *Chaetoceros calcitrans*, suministrada *ad libitum* alrededor de 17000 cel.mL<sup>-1</sup>, con un recambio de agua del 100% a diario y sifonado de heces a diario.

#### 3.2. Diseño experimental.

##### 3.2.1. Unidad experimental:

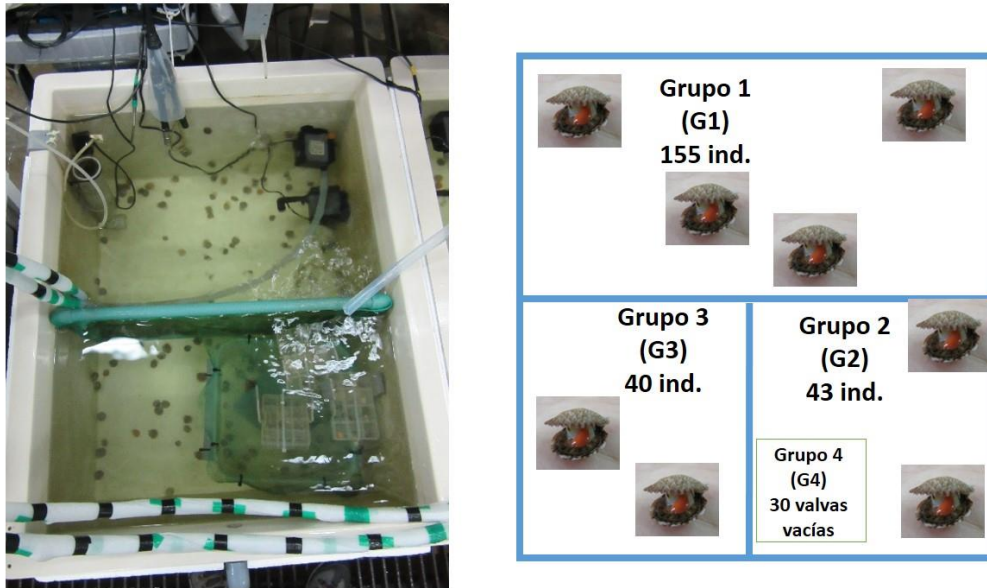
La unidad experimental fue un tanque de 200 litros (ver Figura 4), uno para el tratamiento y otro para el control. Cada tanque contenía 238 individuos de concha de abanico y 30 valvas vacías de la misma talla. Se agrupó los especímenes en cada tanque de la siguiente forma:

El G1 (155 individuos) fue seleccionado para hacer la evaluación del crecimiento. Se colectó 30 individuos por evaluación (Días 0, 14 y 28), cada evaluación incluía el sacrificio de los ejemplares para procedimientos subsecuentes, como obtención de peso seco libre de cenizas (PSLC).

El G2 (43 individuos) fue seleccionado para obtener tasas de calcificación neta. Fueron etiquetados al inicio para poder aplicar la técnica de peso boyante durante las tres evaluaciones (Días 0, 14 y 28) y sacrificados al final del experimento.

El G3 (40 individuos) fue seleccionado para obtener las tasas de crecimiento. Fueron etiquetados y marcados con calceína al inicio del experimento y sacrificados al final del experimento. Fueron evaluados al inicio y al final del experimento.

El G4 (40 valvas vacías) fue seleccionado para obtener las tasas de disolución. Fueron sacrificados previamente al inicio del experimento para obtener las conchas vacías y se los colocó en cajitas marcadas. Fueron evaluados al inicio y al final del experimento.



**Figura 4** A la izquierda: vista de planta de la unidad experimental (tanque). A la derecha: Esquema de la unidad experimental. Se observa la división para el G1, G2 y G3. El compartimiento del tanque para el G1 es de mayor tamaño por el número de individuos que contiene, y que consiste en la mitad del tanque. El espacio para el G2 está a la derecha inferior de la foto. El espacio para el G3 lado izquierdo inferior de la foto que corresponde a una cuarta parte del tanque. El G4, valvas vacías están en unas cajitas de plástico pequeñas. Cada compartimento del tanque está dividido con una malla para evitar que se junten individuos de distinto grupo.

### 3.2.2. Condiciones experimentales

Previo a colocar los individuos en cada tanque, nos aseguramos que se encontraron bajo las mismas condiciones. Se utilizó agua de mar bombeada del muelle del IMARPE y filtrada con filtro cartucho (5 a 10  $\mu\text{m}$ ), con esta agua que era reservada

en un tanque y aireada constantemente se suministró de agua a los tanques de experimentación de forma continua.

El agua no manipulada del tanque control mostró un  $\text{pH}_T$  de 7.8. Al tanque del tratamiento se burbujeó constantemente gas  $\text{CO}_2$  puro a través de una manguera que llegaba a un reactor de  $\text{CO}_2$ , el cual estaba sumergido en el tanque y que mezclaba el agua con el gas con gran eficiencia, de esta forma se obtuvo un  $\text{pH}_T$  de 7.4. El pH objetivo para el tratamiento fue 7.4, el cual fue elegido en base a la proyección de Caldeira and Wickett (2003) que estima para el 2100 una reducción del pH superficial de -0.4 unidades en promedio del océano, y en la proyección del IPCC (2013) que estima una reducción del pH de 0.3 a 0.4 unidades en el Pacífico para el 2100 bajo el escenario RPC 8.5. En ambos tanques se instaló bombas de agua para movilizar el agua dentro del tanque y mantenerla saturada de oxígeno. La frecuencia de medición de la saturación de oxígeno y el pH para el tratamiento fue de 5 minutos y para el control cada hora.

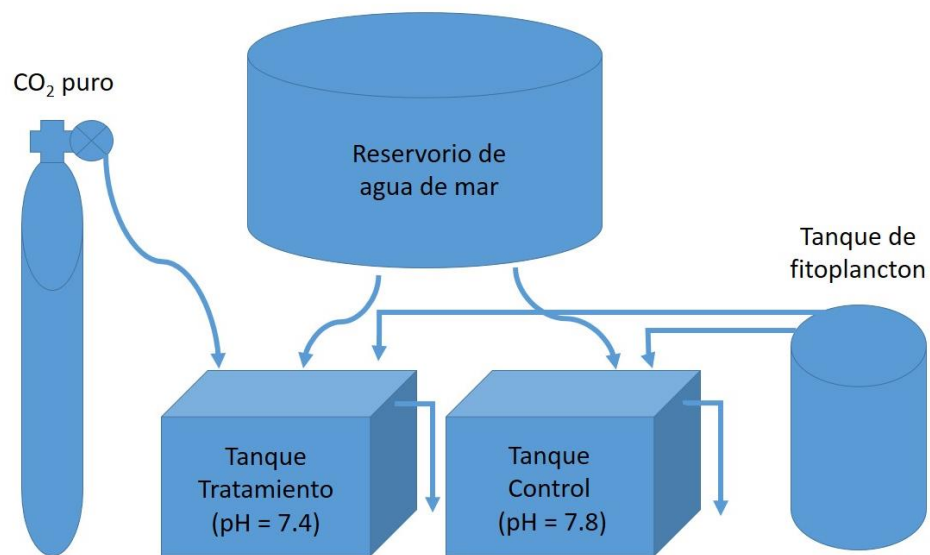
La salinidad se midió a diario en el muelle del IMARPE, lugar desde donde se bombeaba el agua hacia el experimento. La temperatura del agua se mantuvo a  $16^\circ\text{C}$  utilizando controladores de temperatura y un enfriador, calibrado para una variación de  $0.1^\circ\text{C}$ . Además se colocó un sensor de temperatura HOBO en cada tanque para registrar la temperatura cada media hora.

Usando una bomba peristáltica se mantuvo constante el ingreso de alimento (mezcla de 70% de *I. galbana* y 30% de *C. calcitrans*) dentro de cada tanque, en una

concentración de  $67000 \text{ cel.mL}^{-1}$ . La concentración de fitoplancton en cada tanque fue medido dos veces al día.

El recambio del agua de los tanques fue del 100% a diario en un sistema abierto (ver **Figura 5**). Se sifonaba diariamente las heces reduciendo el nivel del agua del tanque en 10% el cual se rellenaba en las siguientes 2.5 horas dado que el flujo de entrada de agua fue constante. El fotoperiodo fue de 12 horas día y 12 horas noche. Se extrajeron los individuos muertos a diario en el momento de la limpieza.

La duración del experimento fue de 28 días, habiéndose iniciado el 27 de octubre del 2015 y finalizado el 24 de noviembre del 2015.



**Figura 5** Esquema general del experimento mostrando con flechas el flujo de los fluidos ( $\text{CO}_2$  puro, agua de mar, mezcla de fitoplancton) que ingresan o salen de los tanques.

### 3.3. Operacionalización de variables:

#### 3.3.1. Variables abióticas:

La Tabla 2 muestra las variables abióticas que se obtuvieron a través de medición directa y las variables que fueron calculadas a partir de las anteriores. Las variables calculadas fueron: pH en escala total ( $\text{pH}_T$ ), presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), estado de saturación de la calcita ( $\Omega_{\text{Calc}}$ ) y estado de saturación de la aragonita ( $\Omega_{\text{Arag}}$ ). Ver la sección 3.4 donde se explica cómo se hicieron los cálculos.

**Tabla 2** Resumen de variables bióticas.

<b>Variables abióticas</b>		<b>Unidad de medida</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>Medición directa</b>	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$	media hora
	Saturación de Oxígeno	%	5 minutos (tratamiento) y horario (control)
	pH	mV	5 minutos (tratamiento) y horario (control)
	Salinidad		diario
	Fitoplancton	$\text{cel.mL}^{-1}$	mañana y tarde
	Alcalinidad total	$\mu\text{mol kgSW}^{-1}$	diario
	<b>Calculada</b>	$\text{pH}_T$	
$\text{pCO}_2$		$\mu\text{atm}$	diario
$\Omega_{\text{Calc}}$			diario
$\Omega_{\text{Arag}}$			diario

### 3.3.2. Variables Biológicas:

Las variables bióticas también fueron de dos tipos, unas de medición directa (pesos y tallas) y las que se obtuvieron a través de un cálculo con las anteriores (tasas). La Tabla 3 resume todas las variables bióticas. No todas las variables son calculadas para los mismos grupos, por ello se colocó una columna indicando en que grupo se midió la variable y con qué frecuencia. Por ejemplo al G2, se le midió la altura de la valva y el peso boyante en los 3 días de evaluación (días 0, 14 y 28 del experimento), y se midió el peso seco de la valva el día 28; luego se hizo un cálculo a partir del peso boyante para obtener los pesos secos de las valvas para los día 0 y 14. Todos los cálculos se explican en la siguiente sección 3.4.

**Tabla 3** Resumen de las variables biológicas.

<b>VARIABLES BIOLÓGICAS</b>		<b>UNIDAD</b>	<b>FRECUENCIA E INTERVALO DE TIEMPO</b>	<b>GRUPO</b>
<b>Medición directa</b>	Altura de la valva	mm	Días 0, 14 y 28 (G1 y G2), días 0 y 28 (G3)	G1, G2 y G3
	Peso húmedo tejido blando	g	Días 0, 14 y 28	G1
	Peso seco de la valva	g	Días 0, 14 y 28 (G1), días 0 y 28 (G4), día 28 (G2)	G1, G2 y G4
	Peso seco del tejido blando	g	Días 0, 14 y 28	G1
	Peso de las cenizas del tejido blando	g	Días 0, 14 y 28	G1
	Peso boyante (peso bajo el agua)	g	Días 0, 14 y 28	G2
	<b>Calculada</b>	PSLC	g	Días 0, 14 y 28
Contenido de agua		g	Días 0, 14 y 28	G1
Peso valva. altura <sup>-3</sup>		g.mm <sup>-3</sup>	Días 0, 14 y 28	G1
Tasa de crecimiento		mm.día <sup>-1</sup>	Intervalo de 28 días	G3
Tasa de calcificación neta		mgCaCO <sub>3</sub> .g <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup>	Intervalos de 14 días y 28 días	G2
Tasa de disolución		mg de valva.g <sup>-1</sup> .día <sup>-1</sup>	Intervalo de 28 días	G4
Mortalidad		%	Día 28	G1, G2 y G3

### 3.4. Técnicas y Procedimientos:

#### 3.4.1. Procedimiento para el transporte de las conchas de abanico

Los especímenes fueron transportados en coolers, usando esponjas humedecidas con agua de mar y gel pack para disminuir la temperatura durante el viaje que duró aproximadamente 7 horas.

#### 3.4.2. Procedimiento para el etiquetado y marcado con Calceína

Los especímenes del G2 fueron etiquetados con marcas numeradas, para lo cual fueron sacados del agua y secados con papel toalla suavemente luego fueron puestos en una superficie para pegarles las marcas numeradas con goma de secado rápido (Tris<sup>®</sup>), luego se esperó a que seque por 5 a 10 minutos y finalmente fueron devueltos al agua de los tanques. Las etiquetas numeradas que se colocaron sobre los especímenes fue para poder estimar las tasas de calcificación y hacer el seguimiento del crecimiento de forma individual.

Los especímenes del G3 también fueron etiquetados, con el mismo procedimiento del párrafo precedente, y luego colocados en una solución de Calceína preparada con agua de mar mezclada con 1g de Calceína en un volumen de 10 litros de agua de mar, dentro de un contenedor. La solución de Calceína fue aireada y se mantuvo a

temperatura ambiente de 20 °C. Los especímenes de concha de abanico fueron mantenidos durante 3 horas en estas condiciones para se incorpore la Calceína en el organismo. Concluido este tiempo se procedió a traspasar a los especímenes a otro tanque con agua de mar a 20 °C y aireación constante, se hizo 4 cambios de agua de mar durante 24 horas previo al inicio del experimento.

#### 3.4.3. Obtención de variables abióticas:

##### 3.4.3.1. Medición directa de variables:

Para obtener los valores de saturación de oxígeno y pH fue utilizado un multiparámetro marca WTW multi 3430 Set G, con un electrodo para oxígeno FDO® 925-3, 0-20mg/L±0.5% del valor y para el pH un electrodo Sentix® 940-3, 0.000-14.000±0.004, 0-80°C. Se calibró diariamente el electrodo de pH usando los buffer WTW Technical buffer 4.01, 7.00 y 10.01, además se calibró con el buffer de TRIS en agua de mar sintética, para expresar posteriormente las lecturas en escala total (pH<sub>T</sub>). Se ha recomendado el uso del pH<sub>T</sub>, por la Guía de buenas prácticas para experimentos en acidificación (Riebesell et al. 2011), dado que esta escala considera en la medición todos los protones libres del agua de mar incluyendo los que se encuentran asociados al HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>. La calibración del electrodo de oxígeno fue cada semana usando la autocalibración que da el equipo. Las mediciones fueron realizadas *in situ*, es decir en cada tanque y a la temperatura de 16°C. Las unidades de registro del pH fueron en milivoltios (mV), para la posterior transformación a escala total.

La alcalinidad total fue medida con el alcalinómetro Apollo SciTech's AC-A2 Alkalinity Titrator. Para las mediciones se colectó muestras de agua en botellas de 100 ml.

La temperatura fue registrada con un logger TidbiT® v2Temp (OnSet® HOBO Data Loggers), el cual fue sumergido a 10 cm del fondo en cada tanque.

La salinidad fue medida con un salinómetro marca Portasal Wildine 8410<sup>a</sup> que utiliza un método de inducción.

El conteo de fitoplancton fue realizado usando la guía de Aguilar et al. (2011) y metodología de Bastidas (2014). Las muestras colectadas en viales de 20 ml a las cuales se les adicionó una gota de Lugol concentrado, se esperó un minutos y se procedió a tomar una alícuota y sin diluir para ponerlo en una cámara de Neubauer, y se hizo el conteo y los cálculos de concentración de células por mL usando los promedios de cada cuadrante luego multiplicado por 10000.

#### 3.4.3.2. Cálculo de variables abióticas:

El  $pH_T$  fue calculado según el Dickson SOP 6a (Versión 3.0), usando la Ecuación 1 donde:  $pH(x)$  es el pH de la muestra en escala total;  $pH(s)$  es el pH del TRIS;  $E_s$ , es la fuerza electromotriz (f.e.m.) del TRIS (mV);  $E_x$ , es la f.e.m. de la muestra;  $RT \ln 10 / F$ , que constituyen los valores de la ecuación ideal de Nernst, el cual es: 0.05916 mV por unidad de pH.

**Ecuación 1:** Fórmula para hallar el pH en escala total.

$$pH(x) = pH(s) + \frac{Es - Ex}{RT \ln 10 / F}$$

Luego se realizó una regresión entre valores de pH registrados por el multiparámetro y los valores del  $pH_T$  calculado, la Ecuación 2 muestra esta regresión para el control con un  $R^2 = 0.9545$  y la Ecuación 3 para el tratamiento con un  $R^2 = 0.9301$ , ambas regresiones significativas.

**Ecuación 2** Regresión para hallar el pHT a partir de las lecturas de pH en el Control.

$$pHT = 1.24659 + 0.84952 * pH$$

**Ecuación 3** Regresión para hallar el pHT a partir de las lecturas de pH en el Tratamiento.

$$pHT = 1.57207 + 0.80023 * pH$$

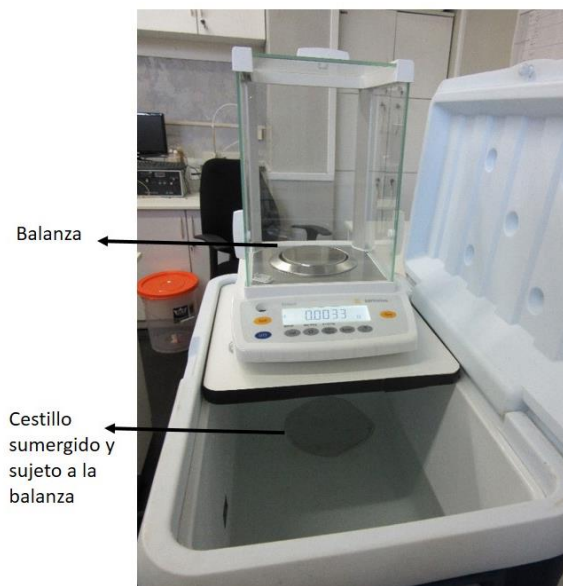
Las variables del sistema de carbonatos restantes ( $pCO_2$ ,  $\Omega_{Calc}$  y  $\Omega_{Arag}$ ) fueron calculadas usando el programa CO2SYS v2.1, usando las constantes  $K_1$ ,  $K_2$  de Millero (2010).

#### 3.4.4. Obtención de variables biológicas:

##### 3.4.4.1. Mediciones directas de las variables biológicas:

Los ejemplares de concha de abanico fueron pesados usando balanza analítica Sartorius® con exactitud 0.0001g y medidos con un vernier con 0.01mm de precisión.

La técnica del peso boyante (Palmer 1982), sirve para obtener el peso boyante o peso bajo el agua. Se aplicó esta técnica para estimar el peso de las valvas sin sacrificar a los individuos, y con estos poder calcular las tasas de calcificación neta. Se pesó a cada individuo de concha de abanico bajo el agua de mar (Ver **Figura 6**) usando una balanza analítica Sartorius® con exactitud 0.0001g, a la cual está sujeto un cestillo, este último está sumergido en agua de mar.



**Figura 6** Arreglo para determinar el peso boyante. La balanza está sobre una superficie, debajo de la balanza existe un elemento propio de la balanza, que permite

sujetar un cestillo que cuelga y está sumergido en agua de mar. Dentro del cestillo se ponen las conchas de abanico para ser pesadas.

#### 3.4.4.2. Procedimientos para obtener variables biológicas:

Para obtener los pesos secos se utilizó una estufa eléctrica, donde se puso a 60°C muestras de valvas de concha de abanico y tejido blando hasta alcanzar peso constante, posteriormente se colocan en un desecador y se toma el peso.

Para calcinar se usó una mufla a 500°C por tres horas, luego las muestras fueron puestas en desecador por media hora y fueron pesadas finalmente.

Para sacrificar a las conchas de abanico se usó una pinza con la cual se separó el musculo abductor de una de las valvas y se despegó las partes blandas de las valvas.

#### 3.4.4.3. Obtención de variables biológicas calculadas:

**Peso Seco Libre de Cenizas (PSLC)** del tejido blando, se obtuvo a partir del peso seco del tejido blando al cual se le restó el peso de las cenizas (obtenidas después de la calcinación).

**La cantidad de agua de los tejidos blandos** se obtuvo por la diferencia del peso húmedo y el peso seco de los tejidos blandos.

**Contenido de Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)**, se obtuvo calcinando las valvas de concha de abanico, viene a ser el peso de las cenizas después de la calcinación de las valvas.

### **Tasa de Calcificación neta:**

Para el G2, se reconstruyó el peso seco de las valvas de los días 0 y 14, a partir del peso boyante, utilizando la regresión entre peso seco de la valva y peso boyante, ambos tomados en la evaluación del día 28 (final del experimento). Para el tratamiento la relación se muestra en la Ecuación 4 la cual tiene un  $R^2 = 0.9993$  y es significativo, y para el control la relación se muestra en la Ecuación 3.5 con un  $R^2 = 0.9989$  y con el intercepto no significativo.

**Ecuación 4** Ecuación para obtener el peso seco de la valva (Psv) a partir del peso boyante (Pb) del Tratamiento.

$$Psv = 0.007903 + 1.530466 * Pb$$

**Ecuación 5** Ecuación para obtener el peso seco de la valva (Psv) a partir del peso boyante (Pb) del Control.

$$Psv = 0.002767 + 1.563644 * Pb$$

Luego de esto se hizo una regresión entre el peso seco de la valva y el peso de carbonato de calcio que contienen las conchas, obtenidos después de calcinar las valvas del G1, la Ecuación 6 es la que representa al control y tiene un  $R^2$  de 1 y la Ecuación 7 corresponde a la relación para el tratamiento y tiene un  $R^2$  de 1, ambas regresiones son significativas.

**Ecuación 6:** Ecuación para obtener el peso del carbonato de calcio de la valva ( $pCaCO_3$ ) a partir del peso seco de la valva (psv) del Control.

$$pCaCO_3 = -0.0008572 + 0.9836515 * psv$$

**Ecuación 7** Ecuación para obtener el peso del carbonato de calcio de la valva (pCaCO<sub>3</sub>) a partir del peso seco de la valva (psv) del Tratamiento

$$pCaCO_3 = -0.0008941 + 0.9838948 * psv$$

Con estos pesos de CaCO<sub>3</sub> reconstruidos, se calculó la tasa de calcificación neta según la Ecuación 8 la cual es normalizada dividiendo entre el peso seco inicial de la valva y luego multiplicada por 1000 para transformar de gramos a miligramos y finalmente obtener las unidades en mgCaCO<sub>3</sub>.g<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>

**Ecuación 8** Ecuación para obtener la Tasa de calcificación neta (TCN), donde PfCaCO<sub>3</sub>: Peso final del carbonato de calcio, PiCaCO<sub>3</sub>: Peso inicial del carbonato de calcio y Psvi: Peso seco de la valva inicial.

$$TCN = (((PfCaCO_3 - PiCaCO_3))/Psvi)/tiempo * 1000$$

**Tasa de crecimiento:** fue calculada según Ecuación 9

**Ecuación 9** Ecuación para obtener la Tasa de crecimiento, donde Af: Altura final y Ai: Altura inicial.

$$TC = (Af - Ai)/tiempo$$

**Tasa de Disolución:** fue calculada con la Ecuación 10 normalizada al peso seco inicial y multiplicada por 1000 para convertir los gramos a miligramos, obteniendo la siguiente unidad: mg de valva.g<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>

**Ecuación 10** Ecuación para obtener la tasa de disolución (TD) donde Psvf: Peso seco de la valva final y Psvi: Peso seco de la valva inicial.

$$TD = \left( \frac{\frac{(Psvf - Psvi)}{Psvi}}{tiempo} \right) * 1000$$

### 3.5. Consideraciones éticas:

Como se realizó un trabajo con individuos vivos, el proyecto de tesis previo a la ejecución pasó por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual aprobó los procedimientos que se realizaron sobre los ejemplares de concha de abanico.

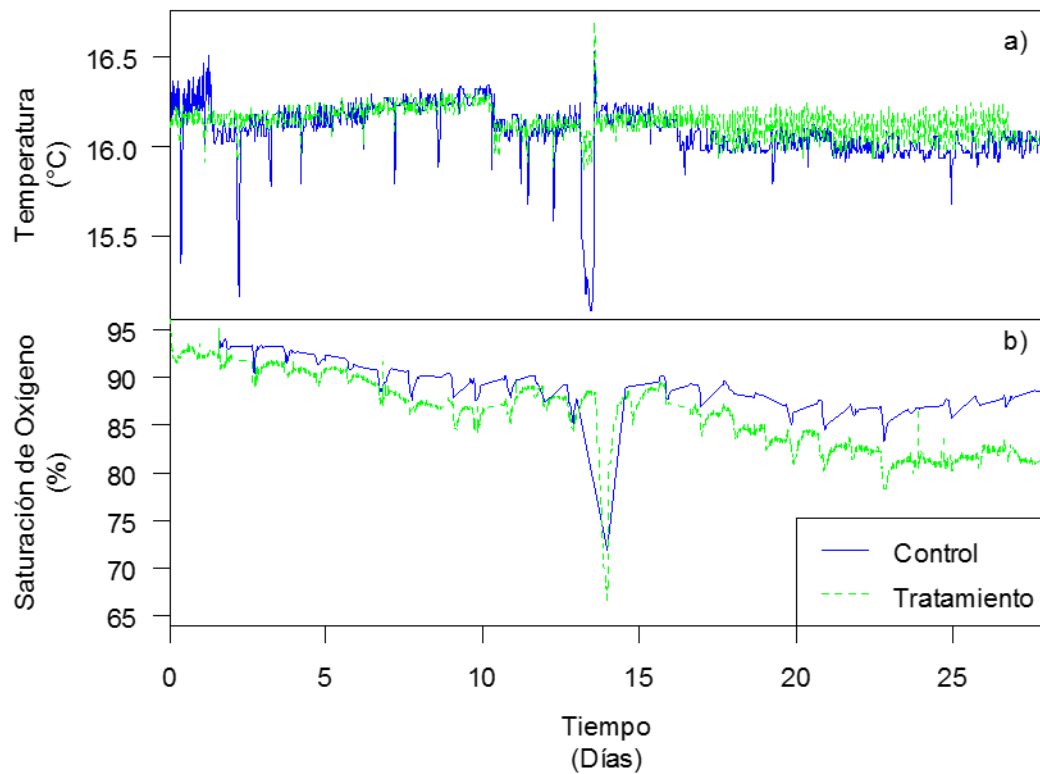
### 3.6. Análisis estadístico:

Se hizo análisis de normalidad con la prueba Anderson Darling. Para verificar la homocedasticidad se usó la prueba F de Fisher, si la normalidad no era verificada no se realizó ninguna transformación. Para establecer si existieron diferencias entre las medias del tratamiento y el control se aplicó la prueba t de Student al 95%, en el caso de las muestras que no presentaron normalidad se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Para obtener los intervalos de confianza se aplicó prueba t de Student, y el caso de no ser paramétrico se aplicó el Método Bootstrap (Everitt & Skron dal 2010).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Condiciones experimentales:

#### 4.1.1. Variables físico-químicas:



**Figura 7** Evolución temporal de a) la temperatura (°C) y b) la Saturación de Oxígeno (%) durante el experimento para el Control y el Tratamiento.

Durante el experimento la temperatura tuvo en el control un promedio 16.09 °C (DE = 0.16) y un rango de 15.08 a 16.53 y para el tratamiento un promedio de 16.14 °C (DE = 0.08) y un rango de 15.87 a 16.7. Ambas medias fueron estadísticamente diferentes (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). Los picos de aumento o disminución de temperatura en ambas condiciones durante el experimento fueron producidos en el proceso de sifonado de heces. Durante el sifonado al extraer el agua del tanque quedaba expuesto el sensor de temperatura de manera que comenzaba a inyectar agua fría, por este motivo se observan estos pulsos de temperatura menor. Esto sucedió frecuentemente en la primera quincena del experimento, la última mitad del experimento las condiciones de temperatura tuvieron menos pulsos de disminución. **(Figura 7a).**

Se registró un evento de origen técnico en el día 14 del experimento, el cual tuvo repercusión en todas las variables que se midieron; se detectó una disminución de pH y oxígeno disuelto. Para reestablecer a condiciones normales del experimento se tuvo que quitar agua y rellenar ambos tanques (tratamiento y control) con agua nueva a mayor temperatura, saturada de oxígeno y pH normal (7.8). Este proceso de disminución del nivel del agua y luego un aumento en cada tanque se observó en el registro de temperatura como una disminución de temperatura hasta 15.08 (control) y 15.87 (tratamiento) y luego un aumento de temperatura hasta 16.4 (control) y 16.7 (tratamiento) **(Figura 7a).**

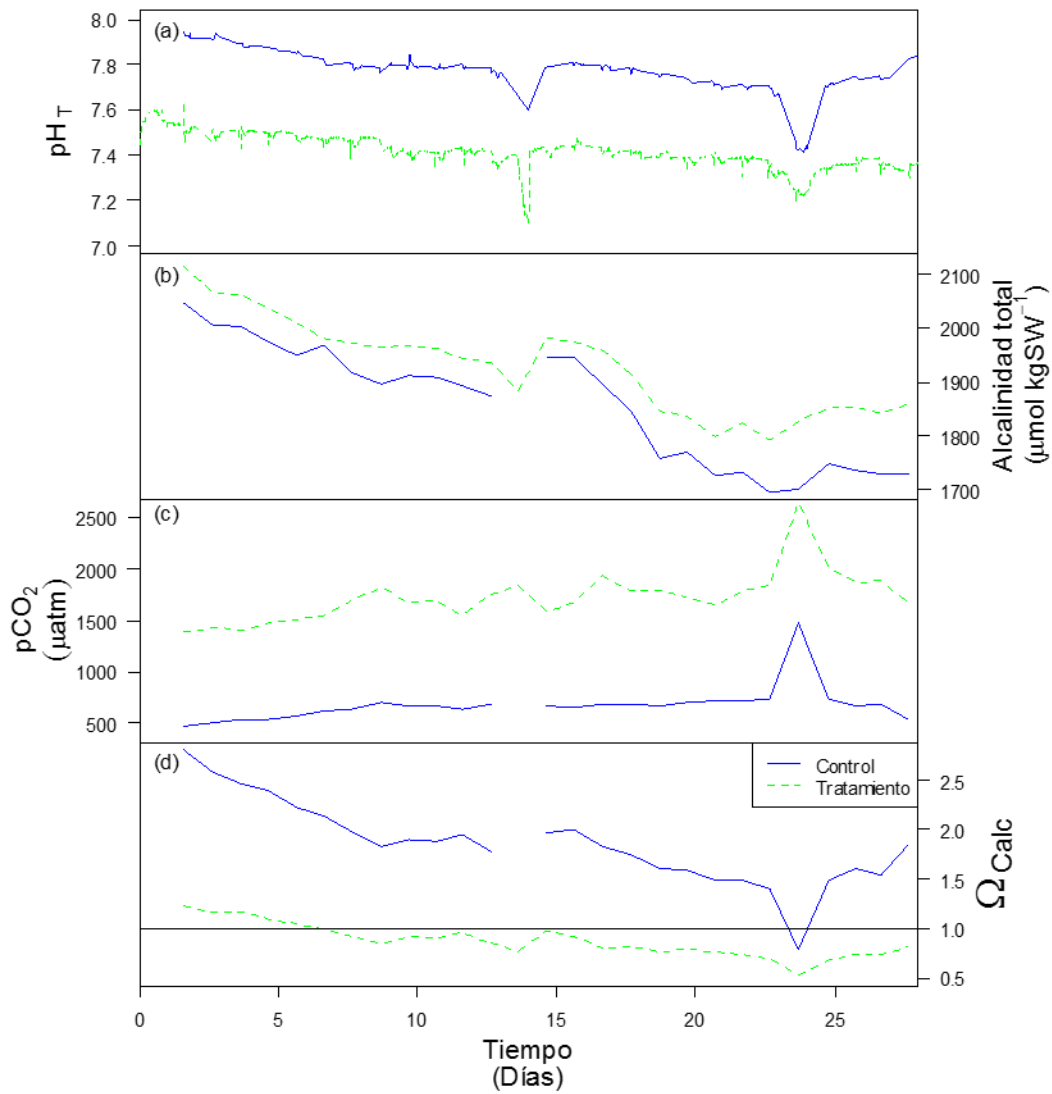
En promedio ambas temperaturas tienen una muy ligera tendencia a disminuir para el tratamiento y el control. Sin embargo se observaron dos periodos con ligeras

tendencias parciales al aumento en ambas condiciones: entre 0 y 10 días y entre 10 y 18 días. En cambio, entre 18 y 28 días se observó una tendencia a la disminución de temperatura en ambos tanques (ver **Figura 7**).

La saturación de oxígeno a la cual estuvieron expuestos los especímenes de concha de abanico para el control tuvo un rango de 70 a 95% con una media de 89% (DE = 2.6) y para el tratamiento, un rango de 66% a 89% y una media de 86% (DE = 4.0). Se determinó que hubo diferencias significativas (test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) entre las medias, siendo el control mayor que el tratamiento. Se observa una fluctuación diaria y una tendencia a disminuir en ambas condiciones. En el tratamiento se observó una pendiente negativa mayor que en el control. La tendencia a disminuir en ambas condiciones en los primeros 14 días fue similar y en los últimos 14 días se agudizó el tratamiento (Ver **Figura 7**).

La salinidad del agua que alimentó los tanques fue la misma en ambas condiciones. En promedio fue 35.07 (DE = 0.04) y con un rango de 35.02 a 35.15 durante los 28 días del experimento.

#### 4.1.2. Variables del sistema de carbonatos



**Figura 8** Evolución temporal de las variables del sistema de carbonatos durante el experimento: (a) pH en escala total, (b) alcalinidad total, (c) presión parcial de CO<sub>2</sub> y (d) estado de saturación de la Calcita, la línea en el valor de 1 muestra el límite de saturación de la Calcita, valores menores a 1 corresponden a un estado de insaturación de la Calcita.

Los promedios de pH total ( $\text{pH}_T$ ), la alcalinidad total, la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), el estado de saturación de la Calcita ( $\Omega_{\text{Calc}}$ ) y Aragonita ( $\Omega_{\text{Arag}}$ ) y sus respectivas desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4.

El  $\text{pH}_T$  tuvo un promedio de 7.779 y un rango de 7.410 a 7.944 para el control y un promedio de 7.415 y un rango 7.098 a 7.635 para el tratamiento. La evolución en tiempo del  $\text{pH}_T$ , tuvo una tendencia a disminuir y además dos eventos negativos (Ver **Figura 8a**). El primer evento de disminución ocurrió a los 14 días debido al problema técnico ya mencionado anteriormente, donde en el control el pH se redujo a 7.6 y en el tratamiento disminuyó hasta 7.1. El segundo evento ocurrió a los 24 días provocado por las condiciones químicas del agua; en el control el pH disminuye hasta 7.4 y en el tratamiento hasta 7.2. Se marcó diferencias significativas en el pH entre ambas condiciones (test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), siendo el pH del control mayor que en del tratamiento.

La alcalinidad total en el control tuvo un promedio de  $1858 \mu\text{mol kgSW}^{-1}$  y un rango de 1694 a  $2045 \mu\text{mol kgSW}^{-1}$  y en el tratamiento un promedio de  $1928 \mu\text{mol kgSW}^{-1}$  y un rango de 1792 a  $2116 \mu\text{mol kgSW}^{-1}$ . Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento y el control (test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), siendo la alcalinidad total del tratamiento mayor que en el control (Ver **Figura 8b**) y además mostró una tendencia a disminuir en el tiempo.

La presión parcial de  $\text{CO}_2$  en el control tuvo en promedio  $679 \mu\text{atm}$  y un rango de 474 a  $1472 \mu\text{atm}$  y para el tratamiento, un promedio de  $1729 \mu\text{atm}$  y un rango de

1390 a 2645  $\mu\text{atm}$ . Se marcó diferencias significativas (test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), siendo el tratamiento el que mostró mayores valores de presión parcial que el control. El tratamiento evidenció una tendencia al incremento significativa a lo largo del experimento, mientras que en el control no se detectó una tendencia. En la **Figura 8(c)** se observa un pico de mayor presión en el día 24 para ambas condiciones, alcanzando valores de 2645  $\mu\text{atm}$  para el tratamiento y 1472  $\mu\text{atm}$  para el control

El estado de saturación de la Calcita ( $\Omega_{\text{Calc}}$ ) para el control tuvo un promedio de 1.86 y un rango de 0.78 a 2.82, y para el tratamiento un promedio de 0.88 y un rango de 0.52 a 1.24. La evolución en el tiempo de esta variable muestra a una tendencia a disminuir en ambas condiciones. Se estableció diferencias significativas (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ), donde en el control los valores de saturación de la Calcita son mayores que para el tratamiento (Ver **Figura 8d**). En la Figura 8 se ha graficado una línea en el valor de 1 para el  $\Omega_{\text{Calc}}$ , este es el valor sobre el cual la Calcita está saturada y bajo este umbral existe subsaturación de Calcita. A partir del día 6 hasta el final del experimento el tratamiento muestra una subsaturación de la Calcita hasta el final del experimento. En el control un pico de subsaturación de la Calcita se dio en el día 24 del experimento.

El estado de saturación de la Aragonita ( $\Omega_{\text{Arag}}$ ) en el control tuvo un promedio de 1.2 y un rango de 0.5 a 1.8. Para el tratamiento tuvo un promedio de 0.56 y un rango de 0.33 a 0.8. La evolución en el tiempo muestra una tendencia a disminuir. Se estableció diferencias significativas (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ) entre las dos

condiciones, siendo el estado de saturación de la Aragonita en el control mayor que en el tratamiento.

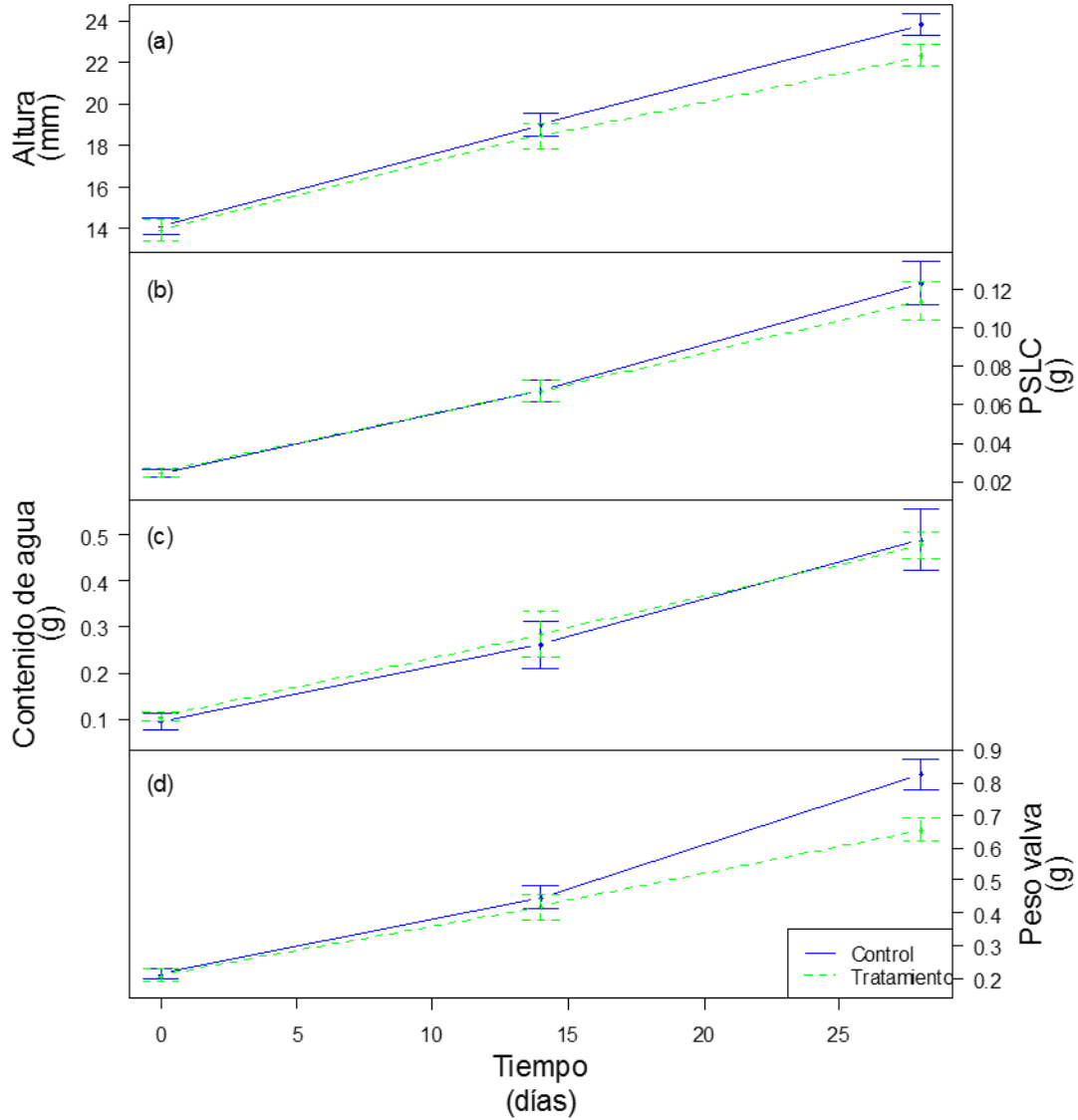
**Tabla 4** Variables del sistema de carbonatos durante el experimento. Se muestra el promedio y la desviación estándar.

Nivel de pH	T(°C)	pH	AT( $\mu\text{mol kgSW}^{-1}$ )	pCO <sub>2</sub> ( $\mu\text{atm}$ )	$\Omega_{\text{Calc}}$	$\Omega_{\text{Arag}}$
<b>Tratamiento</b>	16.14 (0.08)	7.415 (0.07)	1928 (88.6)	1729 (245.6)	0.88 (0.17)	0.56 (0.11)
<b>Control</b>	16.09 (0.16)	7.779 (0.1)	1858 (110.6)	678.5 (177.6)	1.86 (0.42)	1.20 (0.27)

#### 4.1.3. Fitoplancton

El conteo de células de *I. galbana* y *C. calcitrans* disponibles en los tanques de experimentación fueron en promedio para el control 5414 (DE = 3637) cel.mL<sup>-1</sup> y un rango de 500 a 20000 cel.mL<sup>-1</sup> y para el tratamiento un promedio de 5795 (DE = 4841) cel.mL<sup>-1</sup> y un rango de 800 a 30300 cel.mL<sup>-1</sup>. No hubo diferencias significativas entre ambas condiciones.

## 4.2. Crecimiento



**Figura 9** Evolución temporal de: (a) la altura valvar, (b) el peso seco libre de cenizas, (c) el contenido de agua del tejido blando y (d) el peso de la valva correspondiente a los individuos de *A. purpuratus* del G1 durante el experimento. Las barras indican Intervalo de confianza al 95%.

#### 4.2.1. Crecimiento en talla

Al inicio y en el día 14 del experimento no se encontró diferencias significativas en el crecimiento en longitud de la valva. En el final del experimento la talla promedio en el control fue de 23.8 mm y en el tratamiento 22.3 mm, los que fueron significativamente diferentes (prueba *t* de Student,  $p < 0.05$ ) (Ver **Figura 9a**).

Los valores promedio de las tallas y sus intervalos de confianza pueden ser visualizados en la Tabla 5.

#### 4.1.1. Crecimiento en peso seco libre de cenizas

Durante el experimento no se encontró diferencias significativas en el crecimiento del Peso Seco Libre de Cenizas en ninguna de los muestreos realizados (Ver **Figura 9b**). Sin embargo, al final del experimento se puede ver una ligera diferencia entre el control y el tratamiento, observándose que el tratamiento tiene una ligera tendencia a la disminución. El promedio al final del experimento para el control fue de 0.12 g y para el tratamiento 0.11, el resto de valores promedio para cada evaluación pueden ser visualizados en la Tabla 5.

#### 4.1.2. Cantidad de agua del tejido blando

Durante el experimento no se encontró diferencias significativas en la cantidad de agua de los tejidos blandos. En la **Figura 9(b)** se puede observar una ligera tendencia a incrementar hacia el final del experimento, el promedio de la cantidad de agua de los tejidos blandos en el control fue 0.49 g y en el tratamiento fue de 0.48 g (Ver Tabla 5).

**Tabla 5** Altura valvar, Peso Seco Libre de Cenizas, Contenido de agua del tejido blando, Peso de la valva y relación Peso valva por Altura al cubo correspondientes a los ejemplares de *A. purpuratus* del G1 para las tres evaluaciones: en el inicio (Día 0) a la mitad (Día 14) y al final del experimento (Día28). Se muestran los promedios y sus respectivos intervalos de confianza. *U* es el estadístico de la prueba de *U* de Man Witney y *t* de la prueba *t* de student.

<b>Variable</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Control</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Estadístico</b>	<b>p valor</b>
<b>Altura (mm)</b>	Día 0	14.09 (0.40)	13.92 (0.53)	$t = -0.52019$	0.6051
	Día 14	18.99 (0.56)	18.48 (0.61)	$U = 450$	0.61
	Día 28	23.81 (0.53)	22.30 (0.53)	$t = -4161$	< 0.01
<b>PSLC (g)</b>	Día 0	0.0243 (0.0020)	0.0247 (0.0020)	$U = 424.5$	0.712
	Día 14	0.0671 (0.0056)	0.067 (0.0055)	$t = -0.032$	0.975
	Día 28	0.1233 (0.0112)	0.1137 (0.0100)	$t = -1.302$	0.198
<b>Contenido de agua (g)</b>	Día 0	0.0928 (0.0179)	0.1033 (0.0101)	$U = 504.5$	0.425
	Día 14	0.2630 (0.0511)	0.2847 (0.05037)	$t = 1.237$	0.2211
	Día 28	0.4902 (0.0653)	0.4792 (0.027)	$U = 1803$	0.6797
<b>Peso valva (g)</b>	Día 0	0.215 (0.016)	0.209 (0.022)	$t = -0.454$	0.6514
	Día 14	0.449 (0.037)	0.42 (0.04)	$t = -1.078$	0.2857
	Día 28	0.824 (0.05)	0.655 (0.037)	$t = -4.416$	<0.01
<b>Peso valva. Altura<sup>-3</sup> (g.mm<sup>-3</sup>)</b>	Día 0	$7.62 \cdot 10^{-5}$ ( $2.6 \cdot 10^{-6}$ )	$7.62 \cdot 10^{-5}$ ( $3.08 \cdot 10^{-6}$ )	$t = 0.035$	0.972
	Día 14	$6.49 \cdot 10^{-5}$ ( $1.72 \cdot 10^{-6}$ )	$6.54 \cdot 10^{-5}$ ( $1.87 \cdot 10^{-6}$ )	$t = 0.391$	0.698
	Día 28	$6.0 \cdot 10^{-5}$	$5.84 \cdot 10^{-5}$	$t = 2.194$	0.030

---

$$(9.9*10^{-7}) \quad (1.12*10^{-6})$$

---

#### 4.1.3. Crecimiento en peso de la valva

Esta variable no mostró diferencias significativas en el inicio ni en la evaluación del día 14. Al final del experimento se estableció diferencias significativas (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ) entre el control y el tratamiento, siendo mayor el peso seco de las valvas del control que las del tratamiento (ver **Figura 9d**). Al final del experimento el peso de la valva en promedio para el control fue de 0.82 g y para el tratamiento fue de 0.66 g.

Se estableció una proporción entre el peso de la valva ( $pv$ ) y la altura de la valva ( $a$ ) elevada al cubo ( $pv.a^{-3}$ ), una proporción menor indica que las valvas son menos pesadas que otras del mismo tamaño. Se estableció diferencias significativas entre ambas condiciones (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ) siendo las valvas del tratamiento menos densas que las del control. Los promedios se muestran en la Tabla 5.

#### 4.1.4. Diferencias entre grupos:

Se hizo el cálculo del crecimiento en altura valvar y en peso de la valva, para el Grupo 2 (G2) y el Grupo 3 (G3), además del Grupo 1 (G1) que se acaba de mostrar, con el objetivo de mostrar si los demás grupos mostraron diferencias entre el control y el tratamiento en el final del experimento (Día 28).

G2 no mostró diferencias significativas en ningún momento del experimento en relación a la altura de la valva. G3 mostró diferencias significativas (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ) en el inicio del experimento, y al final del experimento no. (Ver Tabla 6.)

En relación al peso de la valva, G2 no mostró diferencias significativas a lo largo del experimento. Hay que considerar que el peso de la valva para el Día 0 y Día 14 fue calculado a partir del peso boyante para este grupo

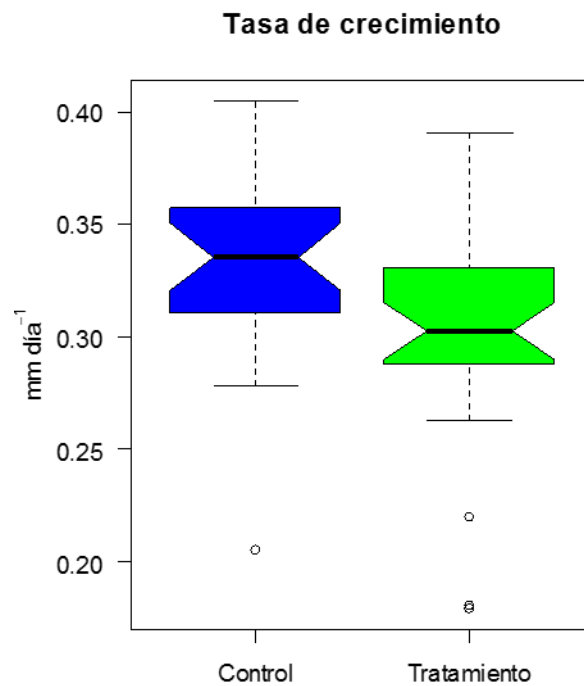
**Tabla 6** Altura y peso de la valva de *A. purpuratus* para los tres grupos. G1, G2 y G3. Se muestran los promedios para el control y el tratamiento y si existen diferencias estadísticas entre ambos.  $U$  es el estadístico de la prueba de  $U$  de Man Witney y  $t$  de la prueba  $t$  de student.

<b>Variable</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Control</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Estadístico</b>	<b><math>p</math> valor</b>
<b>Altura (mm)</b>	Día 0	G1	14.09	13.92	$t = -0.52$	0.6051
		G2	14.17	14.15	$t = -0.109$	0.914
		G3	13.63	14.43	$t = 2.928$	<0.01
	Día 14	G1	18.99	18.48	$U = 450$	0.61
		G2	18.61	18.25	$t = -1.071$	0.288
	Día 28	G1	23.81	22.3	$t = -4.161$	< 0.01
		G2	22.26	22.18	$t = -0.150$	0.881
		G3	23.17	22.78	$U = 324$	0.65
	<b>Peso valva (g)</b>	Día 0	G1	0.215	0.209	$t = -0.454$
G2			0.223	0.2198	$t = 0.343$	0.732
Día 14		G1	0.449	0.42	$t = -1.078$	0.2857
		G2	0.445	0.405	$t = 1.979$	0.052
Día 28		G1	0.824	0.655	$t = -4.416$	<0.01
		G2	0.703	0.658	$t = -1.221$	0.227

## 4.2. Tasas

### 4.2.1. Tasa de crecimiento

Las tasas de crecimiento fueron halladas a partir del grupo marcado con Calceína (G3). En el control el promedio de las tasas de crecimiento fue de  $0.33 \text{ mm.día}^{-1}$  y para el tratamiento fue de  $0.30 \text{ mm.día}^{-1}$ . Hubo diferencias significativas (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) entre las medias del control y del tratamiento (Ver **Figura 10**).



**Figura 10** Tasa de crecimiento de *A. purpuratus* correspondiente al G3.

Además se calculó las tasas de crecimiento con los grupos G1 y G2. La Tabla 7 muestra los promedios de las tasas de crecimiento halladas.

G2 mostró diferencias significativas (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) solo en los primeros catorce días del experimento, siendo mayores las tasas de crecimiento del control que las del tratamiento. En el intervalo de tiempo desde 14 a 28 días y entre 0 y 28 días no se encontró diferencias significativas (Ver **Tabla 7**).

Las tasas de crecimiento para G1 fueron halladas a partir de los promedios de tallas para cada evaluación del crecimiento, por lo tanto sólo se obtuvo un valor por intervalo de tiempo sin posibilidad de establecer diferencias significativas.

Finalmente, G1 y G3 mostraron tasas de crecimiento similares en el intervalo de tiempo de 28 días.

**Tabla 7** Tasas de crecimiento ( $\text{mm.día}^{-1}$ ) de *A. purpuratus* de los diferentes grupos (G1, G2 y G3) para cada intervalo de tiempo del experimento. Se muestran los promedios y si existen diferencias significativas.  $U$  es el estadístico de la prueba de  $U$  de Man Whitney.

<b>Grupo</b>	<b>Intervalo de tiempo</b>	<b>Control</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Estadístico</b>	<b><math>p</math> valor</b>
<b>G3</b>	Día 0 a día 28	0.331	0.303	$U = 464$	0.043
<b>G2</b>	Día 0 a día 14	0.3097	0.2801	$U = 880$	0.004
	Día 15 a día 28	0.261	0.264	$U = 400$	0.374
	Día 0 a día 28	0.285	0.278	$U = 474$	0.869
<b>G1</b>	Día 0 a día 14	0.3499	0.326	-	-
	Día 15 a día 28	0.344	0.273	-	-
	Día 0 a día 28	0.347	0.299	-	-

#### 4.2.2. Tasas de calcificación neta

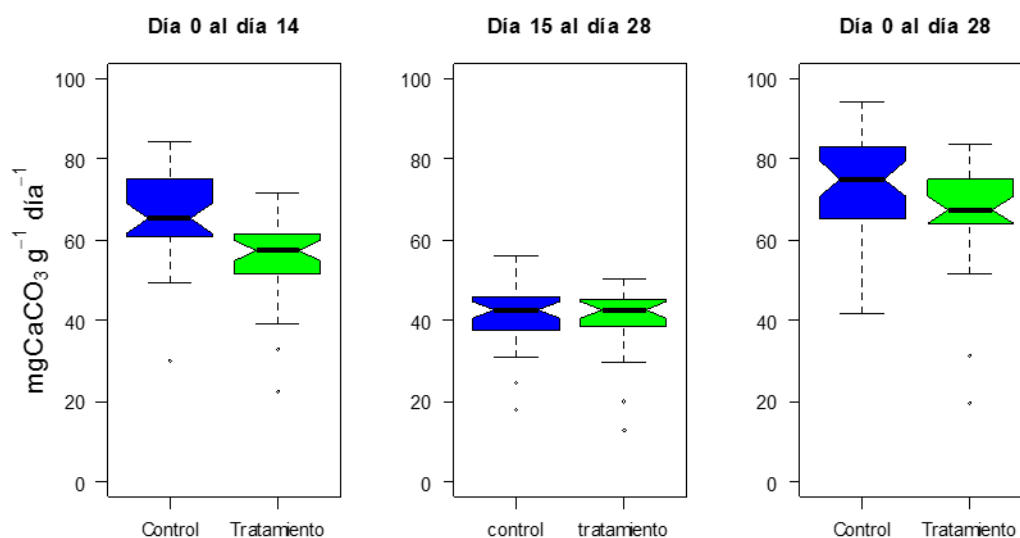
Durante el periodo inicial del experimento (14 primeros días o primera catorcena) se observó una diferencia significativa (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) entre las tasas de calcificación neta promedio, resultando esta tasa mayor en el control ( $66.55 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) que en el tratamiento ( $56.01 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) Las tasas fueron calculadas en conchas del grupo 1 (

**Figura 11**, Tabla 8).

Sin embargo, durante el periodo final del experimento (14 últimos días o segunda catorcena) no se observó una diferencia significativa entre las tasas de calcificación neta promedio del control ( $41.16 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) y del tratamiento ( $40.18 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ )

No obstante, durante la totalidad de la duración del experimento (28 días), se observó una diferencia significativa (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) entre las tasas de calcificación neta promedio, siendo ésta tasa mayor en el control ( $73.51 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) que en el tratamiento ( $66.24 \text{ mgCaO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ).

Por otro lado, en el control se observó una mayor tasa de calcificación neta promedio en el grupo 1 que en el grupo 2. Los individuos del control tuvieron menor tasa de calcificación en el G2 que el G1. (Ver Tabla 8).



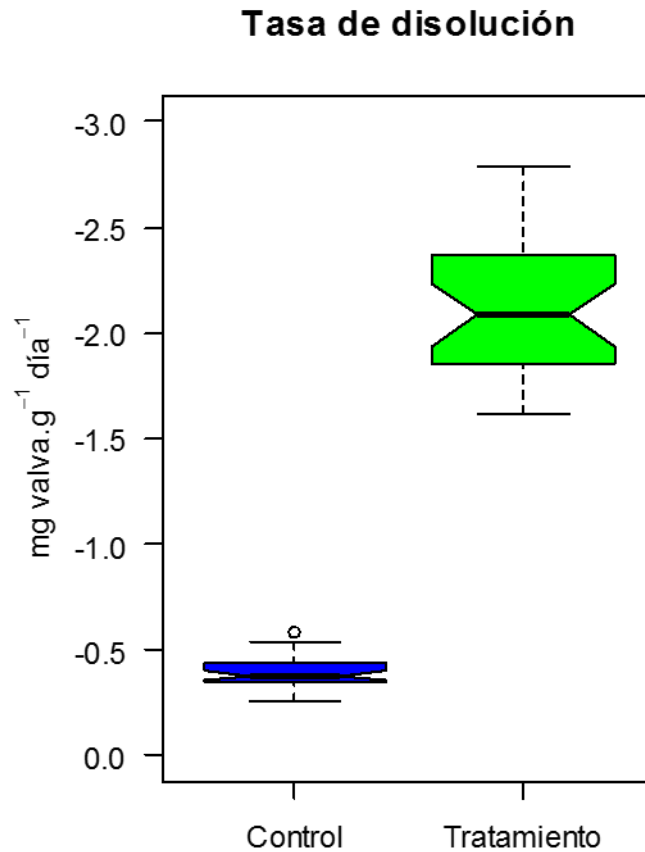
**Figura 11** Tasa de calcificación neta de *A. purpuratus*. Tasas calculadas en individuos del grupo 1 (G1).

**Tabla 8** Tasas de calcificación neta ( $\text{mgCaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) de *A. purpuratus*. Tasas calculadas en conchas de los grupos 1 y 2 (G1 y G2), se muestran los promedios para el tratamiento y el control y además el  $p$  valor producto de la comparación entre ambos

Grupo	Intervalo de tiempo	Control	Tratamiento	Estadístico	$p$ valor
<b>G2</b>	Día 0 a día 14	66.55	56.01	$U = 986$	$<0.01$
	Día 15 a día 28	41.16	40.18	$U = 475$	0.8643
	Día 0 a día 28	73.51	66.24	$U = 603$	0.04395
<b>G1</b>	Día 0 a día 14	77.99	72.46	-	-
	Día 15 a día 28	59.67	39.94	-	-
	Día 0 a día 28	101.4	76.46	-	-

#### 4.2.3. Tasa de disolución:

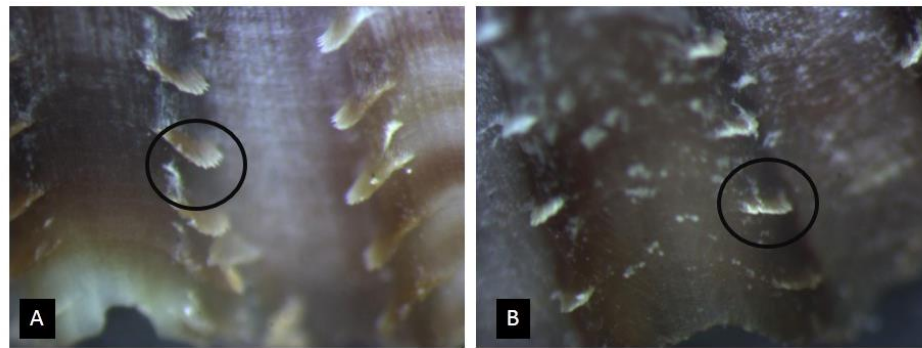
Se observó una diferencia significativa (prueba de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) entre las tasas de disolución promedio, resultando esta tasa mayor en el tratamiento (-2.12 mg de valva.g<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, IC = 0.042) que en el control (-0.39 mg de valva.g<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>, IC = 0.12).



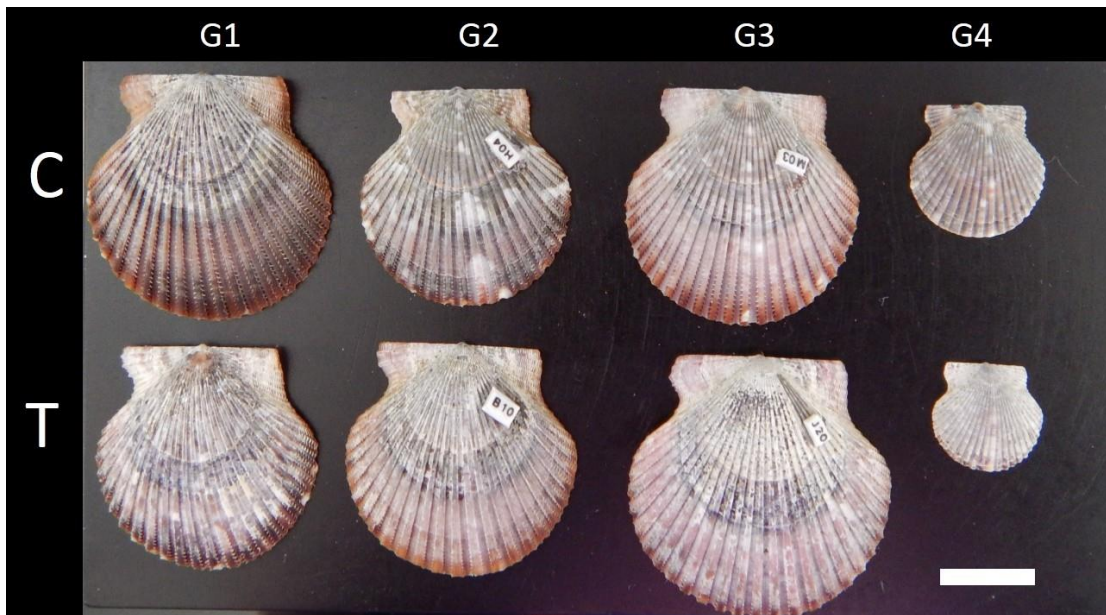
**Figura 12** Tasa de disolución de la valva de *A. purpuratus*. Tasa calculada a partir de valvas vacías (G4) colocadas en el experimento.

Además del registro de disolución en peso se pudo hacer una observación visual a través del estereoscopio de la textura superficial de las valvas. La **Figura 13** muestra que las ornamentaciones minúsculas de la valva que corresponde a líneas superficiales de crecimiento están desgastadas o corroídas en el tratamiento. Además también se observó una coloración blanquecina (como de corrosión) en la superficie de las valvas que estuvieron en el tratamiento a diferencia de las que estaban en el

control. El 86% de las valvas del G1 del control mostraron las ornamentaciones de las crestras, sin signos de corrosión y el 14% restante no mostraron cresta o mostraron la mitad de esta. El 71% de las valvas del G1 correspondientes al tratamiento mostraron ausencia de cresta o menos de la mitad de la cresta y el 29% restante mostraron la mitad de la cresta y signos de corrosión sobre la valva. Estas observaciones fueron realizadas en un punto en común de todas las valvas superiores de los individuos el cual fue la 6ta cresta (contando desde el borde inferior de la valva) correspondiente a la costilla del medio de la valva.



**Figura 13** Corrosión y desgaste superficial en *A. purpuratus*. Nótese en las imágenes estereoscópicas de la derecha (B) el mayor desgaste, corrosión y disolución de la superficie de las valva crestas (en círculo) de las conchas sometidas al tratamiento con menor pH en comparación con las conchas del control hacia la izquierda (A).

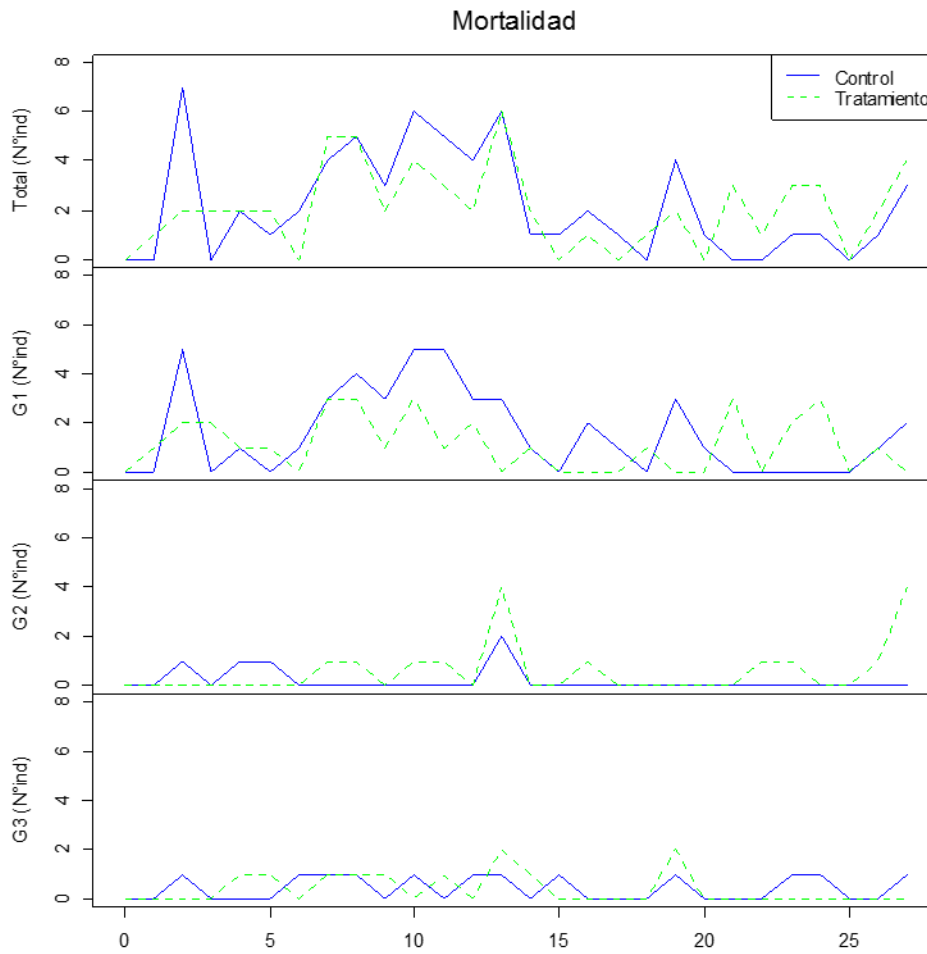


**Figura 14** Fotografía de la valva superior de *A. purpuratus*. Las columnas corresponden a los 4 grupos (G1, G2, G3 y G4) y las filas corresponden al control (C) y tratamiento (T). La barra color blanco mide 1cm.

#### 4.3. Mortalidad y desarrollo gonadal

La mortalidad total durante el experimento para ambas condiciones de fue 26% para el control y de 24 % para el tratamiento. Para el G1 la mortalidad fue de 28% para el control y 20% para el tratamiento. Para el G2 la mortalidad fue de 12% para el control y 37% para el tratamiento. Para el G3 la mortalidad fue de 30% para el control y 28% para el tratamiento.

La **Figura 15** se puede observar que la mayor contribución a mortalidad lo tuvo el G1 y en la primera catorcena. Para los G2 y G3 la primera catorcena también hubo mayores mortalidades.



**Figura 15** Evolución temporal de la mortalidad total y por grupos (G1, G2 y G3) de *A. purpuratus* durante el experimento.

Al final del experimento se observó que todos los organismos evaluados presentaban gónadas diferenciadas. Menos del 8% presentó un color naranja en sus gónadas en el tratamiento y el control para una talla entre 22 y 23.8 mm, con lo cual esta podría ser la talla de primera madurez sexual de esta especie.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Variables ambientales y de la química de los carbonatos:

#### Temperatura

La temperatura elegida para el experimento se basó en la temperatura promedio donde habitan las conchas de abanico en la Bahía de Paracas (13°S) (Aguirre-Velarde et al. 2016). A pesar de que existen diferencias estadísticas entre la temperatura del control y el tratamiento de 0.05°C, podemos decir que esta variación menor a 0.5 °C, no tuvo mayor efecto sobre el crecimiento o las tasas metabólicas, en base a la evidencia del efecto de la temperatura sobre esta especie en otros experimentos. Al respecto Navarro et al. (2000) mencionan que la energía que utiliza *A. purpuratus* para crecer no se vio afectada por la temperatura sino más bien por el tipo de dieta. Por otro lado González et al. (2002) encontró que en un amplio rango de temperatura (10 a 18°C) la energía necesaria para el crecimiento de *A. purpuratus* no cambia el balance de energía de esta especie. Wolff (1987); Yamashiro & Mendo (1988) y Tarazona et al. (2007) mencionan el efecto positivo del aumento de la temperatura sobre el crecimiento de la concha de abanico, bajo condiciones producidas por el ENSO; sin embargo estos eventos elevan la temperatura del agua más de 3 °C y está acompañado de cambios en las variables biológicas y oceanográficas que favorecen el crecimiento de esta especie.

## Oxígeno

La saturación de oxígeno durante la presente investigación fue diferente en ambas condiciones experimentales, sin embargo, esta diferencia no habría afectado el crecimiento de la concha de abanico debido a que en ambas condiciones los niveles de oxígeno fueron elevados, siendo mayores al 65% para el tratamiento y mayores al 70% para el control, estando ambos en niveles normóxicos. El punto crítico de oxígeno para esta especie a 16°C es 24.4%, lo que indica una buena capacidad regulatoria para la absorción de O<sub>2</sub> en un amplio rango, debido a la adaptación a su ambiente natural el cual está sometido a frecuente hipoxia según Aguirre-Velarde et al. (2016).

Un incremento de bacterias sobre las paredes de los tanques, evidente después de la quincena, podría estar explicando el mayor descenso de oxígeno en este intervalo de tiempo debido al incremento de la respiración por parte de estos organismos. Es posible que los menores niveles de saturación de oxígeno que presentó el tratamiento hayan sido parcialmente debido a la pCO<sub>2</sub> que se estaba agregando a este tanque y que posiblemente desplazó el oxígeno. No se descarta el incremento de la respiración por parte de la concha de abanico en el tratamiento.

## El pH en el experimento

Para la elección del pH utilizado en el tratamiento de agua manipulada del presente estudio, nos basamos en la proyección de Caldeira a & Wickett (2003) que estima

para el 2100 una reducción del pH superficial de -0.4 unidades en promedio del océano estimado en 8.07 por (Gattuso & Lavigne 2009), y en la proyección del IPCC (2013) que estima una reducción del pH de 0.3 a 0.4 unidades en el Pacífico para el 2100 bajo el escenario RPC8.5.

El pH del control fue el mismo que presenta el agua del muelle del Imarpe (7.8 unidades de pH) y asumiendo las proyecciones anteriormente mencionadas, el valor usado para el tratamiento fue de 7.4. Al igual que el presente estudio, varios autores han realizado experimentos de acidificación usando tratamientos de pH de 7.4 el cual es considerado a nivel global como el valor de pH promedio que alcanzará el océano en el 2300 (Michaelidis et al. 2005; Liu & He 2012; Matozzo et al. 2012).

Sin embargo, el pH registrado en el fondo de las bahías donde habita y se cultiva la concha de abanico en el Perú, por ejemplo las bahías de Paracas (13°S), Sechura (5°S) y Samanco (9°S), han mostrado valores de pH incluso menores a 7.4 en diversos estudios puntuales (Jacinto et al. 1997; Cabello et al. 2002; Kanagusuku 2009; Cisneros 2012). No es posible decir si este pH 7.4 es una condición persistente o eventual en el fondo de las bahías anteriormente mencionadas, dado que no existe un monitoreo de alta resolución de esta variable.

Aunque las proyecciones de pH son ampliamente usadas en los experimentos, hay algunas limitaciones importantes para este enfoque, debido a que se requiere de conocimiento previo acerca de la química de los carbonatos en el hábitat de los organismos, el cual es incipiente en el caso de Perú. De hecho, el conocimiento actual de los flujos de CO<sub>2</sub> en zonas costeras de otros lugares es considerado insuficiente

para predecir la respuesta de la acidificación del mar en los sistemas de carbonato costeros (Kleypas et al. 2006), y para el Perú en relación a flujos de CO<sub>2</sub> se reduce a un solo estudio hecho por Friederich et al. (2008). Es difícil, por lo tanto, evaluar si la reducción de pH adoptado en este estudio está dentro de un rango realista esperado que suceda en el 2100, para las bahías donde vive la concha de abanico en el Perú.

Un mayor conocimiento de todas las variables de la química de los carbonatos así como de sus relaciones brindaría una mejor visión de las proyecciones ambientales y de las respuestas biológicas.

#### Química de los carbonatos:

Pocas mediciones de la alcalinidad total en el Mar peruano han sido realizadas. En la Bahía de Sechura se encontró valores entre 1800 y 2300  $\mu\text{mol kgSW}^{-1}$  (Cisneros 2012), los valores medidos durante el experimento se encuentran en ese rango. Pero nuestros hallazgos están por debajo de la alcalinidad total promedio en el océano 2325  $\mu\text{mol kgSW}^{-1}$  propuesta por Gattuso & Lavigne (2009). La tendencia a disminuir encontrada a lo largo del experimento podría deberse a que la calcificación reduce la alcalinidad total (Riebesell et al. 2011) y la remineralización de materia orgánica también reduce la alcalinidad total (Waldbusser et al. 2011). Ambos procesos estuvieron presentes en los tanques del experimento, la calcificación por parte de las conchas de abanico y la remineralización de materia orgánica por parte de las bacterias que colonizaron los tanques.

El sistema de afloramiento peruano es una fuente de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, el 75% de los flujos de CO<sub>2</sub> son hacia la atmósfera y alcanzan hasta 1130  $\mu\text{atm}$  de pCO<sub>2</sub> dentro de los 100km de la costa a 12°S (Friederich et al. 2008). Las pCO<sub>2</sub> de nuestro control (678  $\mu\text{atm}$ ) está dentro de ese rango y son mucho más altas que la pCO<sub>2</sub> promedio para el océano de 384  $\mu\text{atm}$  propuesta por Gattuso & Lavigne (2009). Por otro lado cabe mencionar que la pCO<sub>2</sub> del control de la mayoría de los experimentos varían desde 220  $\mu\text{atm}$  (Talmage & Gobler 2011) a 450  $\mu\text{atm}$  (Ramajo et al. 2015), que por lo general corresponden a un rango de pH de 8.2 a 8.09. Casos especiales de experimentos en lugares de alta presión de CO<sub>2</sub> muestran en sus controles 800 y 963  $\mu\text{atm}$  con pH de 8.13 y 7.88 respectivamente (Range et al. 2011, 2012), estos son valores mucho mayores de lo que tenemos en nuestro control. La presión parcial de CO<sub>2</sub> utilizada para nuestro tratamiento (1729  $\mu\text{atm}$ ) fue mayor que el rango natural de presión parcial de CO<sub>2</sub> para el Perú. Los niveles de pCO<sub>2</sub> similares a la de nuestro tratamiento fueron aplicados por Range et al. (2011), con 1698  $\mu\text{atm}$  para un pH de 7.84; quienes experimentaron con la especie *M. galloprovincialis* que corresponde a un ambiente de laguna costera. Muchos experimentos han usado presiones parciales de CO<sub>2</sub> menores en sus tratamientos respecto al nuestro (Watson et al. 2009, 2012; Parker et al. 2011; Talmage and Gobler 2011; Schalkhausser et al. 2013; Duarte et al. 2014; Ramajo et al. 2015), pero algunos han experimentado con mayores presiones, hasta de 4345  $\mu\text{atm}$  para un pH de 7.46 (Range et al. 2011)

El estado de saturación de la calcita ( $\Omega_{\text{Calc}}$ ) promedio para el océano es 4.5 (Gattuso & Lavigne 2009), mientras que el valor que tenemos para nuestro control ( $\text{pH}_T =$

7.78), el cual representa condiciones actuales del mar de la Bahía del Callao (12°S), es de 1.86. Cabe indicar que este valor es uno de los primeros que han sido reportados para el mar peruano. Nuestros datos son similares a los obtenidos por Thomsen & Melzner (2010) con  $\Omega_{\text{Calc}} = 1.86$  en el control de su experimento a  $\text{pH}_{\text{NBS}}$  de 8.03. La saturación de calcita de nuestro tratamiento (0.88) es menor a 1, lo que indica subsaturación de la calcita. Diversos autores han estimado la saturación de la calcita con niveles mayores a 1 en los tratamientos de sus respectivos experimentos (Parker et al. 2011; Talmage and Gobler 2011; Duarte et al. 2014; Ramajo et al. 2015). Calcita supersaturada en el ambiente natural con presiones de  $\text{CO}_2$  de  $\sim 2000 \mu\text{atm}$  fueron encontradas en el fiordo de Kiel por Thomsen et al. (2013), de forma similar experimentos realizados por Range et al. (2011, 2012) obtuvieron supersaturación de calcita en altas presiones de  $\text{CO}_2$  ( $> 4000 \mu\text{atm}$ ), probablemente debido los altos valores de alcalinidad total ( $> 3000 \mu\text{mol kgSW}^{-1}$ ) que evitaron la subsaturación.

El estado de saturación de la aragonita determinado en el control de nuestro experimento ( $\Omega_{\text{Arag}} = 1.2$ ) es menor que para el promedio en el océano actual ( $\Omega_{\text{Arag}} = 2.9$ ) y menor también de lo propuesto para el 2100 ( $\Omega_{\text{Arag}} = 1.8$ ) por Gattuso & Lavigne (2009) según el escenario de emisión A2 SRES (SRES son escenarios de emisión que consideran fuerzas demográficas, económicas y tecnológicas además de las emisiones de gases de efecto invernadero). Supersaturación de aragonita tanto en el control como en el tratamiento también fueron encontrados por Parker et al. (2011) y Range et al. (2011, 2012). Valores similares a los determinados en nuestro

tratamiento ( $\Omega_{\text{Arag}} = 0.56$ ) fueron reportados por McClintock et al. (2009) de  $\Omega_{\text{Arag}} = 0.47$  para un pH de 7.4 y por Thomsen & Melzner (2010) de  $\Omega_{\text{Arag}} = 0.61$  para un pH de 7.6.

### Alimentación:

Una dieta de mezcla de *I. galbana* y *C. calcitrans* fue usada debido a que es mejor una mezcla de algas que una dieta de alga sola (Basch 1996). Las concentraciones de fitoplancton encontradas en los tanques de ambas condiciones están dentro del rango de concentraciones de fitoplancton en la Bahía de Paracas (zona de cultivo de la concha de abanico), las cuales llegan a  $10\,000\text{ cell.mL}^{-1}$  y picos de concentración de diatomeas en  $2500\text{ cell.mL}^{-1}$  encontradas por López (2008).

### 5.2. El crecimiento

Durante el experimento G2 no mostró diferencias significativas en sus tasas de crecimiento entre el control y el tratamiento. Además el crecimiento en talla fue menor respecto a los otros grupos (G1 y G3). La causa más probable que explicaría esta diferencia es la manipulación y estrés de estar fuera del agua para hacer la evaluación quincenal. El G2 del tratamiento fue retirado del tanque para hacer la evaluación quincenal de peso boyante, en el cual estuvo fuera del agua por aproximadamente 15 minutos; luego estuvo durante 4 horas a una temperatura de 20

°C en un contenedor de agua, fue manipulado para tomar las tallas y fue secado para tomar el peso y al ser retornado al tanque, este último se encontraba con una reducción de oxígeno y pH producto de la falla técnica anteriormente mencionada en los resultados. El G2 del control también estuvo expuesto al manipuleo para tomar medidas y realizar el peso boyante, sin embargo estuvo menos tiempo en condiciones de bajo pH y oxígeno. A esta reducción de pH y oxígeno también estuvieron expuestos los individuos del G1 y G3 mas no a la manipulación y desecación y cambio de temperatura. Estas condiciones probablemente produjeron un estrés sobre los individuos del G2 que alteró su crecimiento y que se hizo visible a través de una marca de estrés en las conchas. Esta evidencia es reforzada por el hecho de que las valvas de los individuos de los grupos G1 y G3 no presentan esta marca. Extraerlas del agua aunque sea por poco tiempo puede causar marcas de estrés en las valvas y reducción del crecimiento (Aguirre et al. 2015). El estrés mencionado pudo haber resultado en una disminución del crecimiento principalmente en las conchas del control y de este modo equiparar su crecimiento con el crecimiento ya disminuido del tratamiento por efecto del menor pH. Esto se puede ver en las tasas de crecimiento que para la segunda catorcena las tasas de crecimiento del control se vieron reducidas e igualadas al tratamiento.

Menores crecimientos en talla y peso en el tratamiento que el control, pero con un crecimiento de tejido blandos similares en ambas condiciones han sido reportados por otros autores. Melzner et al. (2011) en *Mytilus edulis* encontró resultados similares a los nuestros, al encontrar un efecto de la concentración del alimento sobre el

crecimiento somático mas no un efecto de la  $p\text{CO}_2$ . También obtuvo resultados similares Range et al. (2012) en *Mytilus galloprovincialis*, explica esta respuesta de los organismos al incremento de  $\text{CO}_2$ , a través del direccionamiento de los recursos energéticos a la conservación del tejido somático en detrimento de la integridad de la concha. Thomsen & Melzner (2010) explican similares resultados en *M. edulis*, al cual también hicieron mediciones de respiración y excreción, explicando que hubo mayores pérdidas de energía por respiración y excreción de amonio. La disminución de las tasas de crecimiento pueden estar relacionadas al incremento de la degradación proteica y perdida de nitrógeno desde la matriz orgánica de la concha (Thomsen & Melzner 2010).

Tasas de crecimiento en altura valvar que se reportaron en Samanco ( $9^\circ\text{S}$ ) para cultivo suspendido y en Pucusana ( $12^\circ\text{S}$ ) para semillas procedente de Lagunillas (Alcazar & Mendo 2008; Cisneros et al. 2008), fueron similares a las encontradas para el control de nuestro experimento ( $0.33 \text{ mm.día}^{-1}$ ). Incluso tasas de crecimiento mucho menores que las halladas en nuestro tratamiento ( $0.30 \text{ mm.día}^{-1}$ ) fueron encontradas por los autores mencionados bajo distintas condiciones, con semillas de procedencia distinta al lugar de cultivo (semillas de Samanco  $0.24 \text{ mm.día}^{-1}$ ) o en cultivo de fondo ( $0.23 \text{ mm.día}^{-1}$ ) respectivamente (Alcazar & Mendo 2008; Cisneros et al. 2008). En la bahía La Rinconada (Chile,  $23^\circ\text{S}$ ) se han reportado tasas de crecimiento para concha de abanico entre  $0.082 \text{ mm.día}^{-1}$  ( $14.7^\circ\text{C}$ , verano frio La Niña) y  $0.143 \text{ mm.día}^{-1}$  ( $15^\circ\text{C}$ , año normal) por Avendaño & Cantillánez (2008), las

cuales son menores a las tasas de crecimiento más bajas encontradas en el tratamiento de nuestro experimento.

Además encontramos que las tasas de crecimiento que reportamos son casi 10 veces más de las que encontró Ramajo et al, 2015 en *A. purpuratus*. Las tasas de crecimiento disminuyen con el tiempo debido al crecimiento asintótico de las especies de moluscos por lo tanto las comparaciones anteriormente citadas corresponden a tallas similares a las usadas en nuestro experimento.

### 5.3. Calcificación y disolución.

Las tasas de calcificación neta que se obtuvieron en G2, a pesar del estrés por manipuleo, tuvieron diferencias estadísticas considerando el intervalo de tiempo de 28 días. Además se hizo cálculos en la primera catorcena y la catorcena final, habiendo diferencias estadísticas en la primera y en la segunda no. Esto refuerza la evidencia de que el estrés por manipuleo hizo esta disminución de la calcificación y el crecimiento después de la evaluación a los 14 días del experimento. Aunque si consideramos que el G2 del tratamiento y el G2 del control estuvieron bajo las mismas condiciones de estrés, si se habría obtenido diferencias para el intervalo de los últimos 14 días, sin embargo no fue así, debido a que el G2 del control estuvo expuesto a mayor estrés después del manipuleo pues el tanque donde fue colocado estuvo a menor pH y oxígeno de su condición normal, producto de la falla técnica

anteriormente mencionada. Todo esto nos muestra que la concha de abanico es muy sensible a la desecación y manipuleo, lo que se pudo observar como una marca de estrés en la concha que significa una disminución en el crecimiento.

Existen datos escasos de tasas de calcificación para esta especie. Un reciente estudio hecho por Ramajo et al. (2015) muestra tasas de calcificación en el orden de 3 y 20  $\mu\text{gCaCO}_3\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  en comparación a lo encontrado por nosotros entre 40 y 74  $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ , es decir 3 órdenes de magnitud mayor.

Es un poco difícil comparar las tasas de calcificación entre diversos experimentos debido a que las unidades en las cuales están expresadas son diferentes, algunos lo expresan en peso de  $\text{CaCO}_3$  por unidad de peso fresco:  $\mu\text{molCaCO}_3\cdot\text{g}\cdot\text{FW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Gazeau et al. 2007), % de peso boyante: wt% por 60d (Ries et al. 2009), peso de  $\text{CaCO}_3$  por gramos de peso vivo entero:  $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{g}\cdot\text{LW}^{-1}$  (Waldbusser et al. 2010, 2011), peso de  $\text{CaCO}_3$  por gramo de peso inicial:  $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (Rodolfo-Metalpa et al. 2011; Ramajo et al. 2015) y mg por mussel. $\text{d}^{-1}$  (Duarte et al. 2014). Se han reportado distintas respuesta de la calcificación neta frente a bajos niveles de pH: respuestas positivas, negativas, neutras, umbral positivas y umbral negativas (Ries et al. 2009; Gazeau et al. 2013; Parker et al. 2013). Las especies han mostrado variaciones interespecíficas e incluso intraespecíficas frente al estrés de la hipercapnia. Nuestro experimento ha mostrado una respuesta negativa frente a la disminución del pH.

Los límites de la calcificación en muchos organismos no coinciden con los límites de saturación química y podrían ocurrir en valores mayores o menores (Doney et al.

2009). Nuestro experimento muestra que en valores de subsaturación de Calcita ( $\Omega_{\text{Calc}} < 1$ ) aún estaban ocurriendo calcificación en las conchas de abanico. Esto debido a que la deposición de  $\text{CaCO}_3$  y la termodinámica de los fluidos calcificantes es ampliamente regulado por los procesos fisiológicos internos (Fan et al. 2007; Pörtner 2008). Es posible que ocurra crecimiento en aguas subsaturadas de  $\text{CaCO}_3$ .

La tasa de disolución calculada en el control de nuestro experimento fue 0.04% por día, fue comparable a lo encontrado por Waldbusser et al. (2011) en *Crassostrea virginica* en el control (pH = 7.9) de su experimento con 0.05% de pérdida de peso de la valva por día, y las tasas de disolución encontrada para nuestro tratamiento de 0.21% por día fue mayor que lo que reporta este autor para sus tres tratamientos de pH bajo.

Las tasas de disolución podrían incrementarse o disminuir dependiendo de la composición mineralógica de la concha. La calcita es 35% menos soluble que la aragonita (Morse et al. 1980; Mucci 1983). En adición una calcita con Mg en la concha es más soluble que la aragonita (Andersson et al. 2008). A pesar de estas características de la composición mineralógica de la concha, también es necesario considerar el tamaño y morfología del cristal, diferencias en la química de la concha y diferencias en el tipo o estructura del material alrededor de la matriz orgánica de las conchas como potencial factor de control en la pérdida de peso de la concha, independientemente de si las conchas son de aragonita o calcita (Harper 2000). Esto es apoyado por una experimento que realizó McClintock et al. (2009), donde

encuentra mayor pérdida de peso en la concha de un braquiópodo de concha calcítica (*Liothyrella uva*) que en un bivalvo de concha aragónica (*Laternula elliptica*).

La mineralogía de la concha de *A. purpuratus*, podría ser de compuesta de aragonita y calcita (Esteban 2006), sin embargo hace falta mayor investigación al respecto en esta especie.

Termodinámicamente podría haber ocurrido disolución de aragonita o calcita en valores de saturación menores a 1 ( $\Omega_{\text{Calc}}$ ,  $\Omega_{\text{Arag}} < 1$ ) (Gazeau et al. 2007). Nuestros resultados muestran que hubo disolución en el tratamiento, el cual tenía valores de saturación menores a 1, pero también ocurrió disolución en el control siendo los valores de saturación mayores a 1.

#### 5.4. Mortalidad y desarrollo gonadal

Varios autores indican que la mortalidad podría ser causada por altas presiones de CO<sub>2</sub> (Berge et al. 2006; Dickinson et al. 2012), causadas por altas presiones de CO<sub>2</sub> que afectaron el tejido blando que subsecuentemente causó la muerte (Beniash et al. 2010), también existió mortalidad causada por disolución (Green et al. 2009). Sin embargo en nuestro experimento no hemos establecido una relación de causalidad de la mortalidad con el menor pH del tratamiento, muy similar a otros estudios donde no ha encontrado relación a este factor (Ries et al. 2009; Range et al. 2012). Incluso algunos autores han reportado el incremento de sobrevivencia en alta pCO<sub>2</sub>, producto de una probable reabsorción de gónadas (Range et al. 2011)

Broadaway (2012) indica que podría existir una mortalidad indirecta por la ruptura de ligamento que une las valvas debido a la disolución de la aragonita presente en esta estructura (Kikuchi & Tamiya 1987). Observó que la sobrevivencia de *A. irradians* no era mayor a 2 días cuando se observaba esta condición de valvas separadas. En nuestro experimento también pudimos observar esta separación de valvas, en el tratamiento y en el control, por lo tanto podría ser que esto se haya debido a un efecto mecánico del transporte o manipulación al inicio del experimento. Por lo que probablemente también se habrían observado mayores mortalidades en los primeros 14 días del experimento. En este experimento no hemos podido diferenciar las causas de la mortalidad, si fueron producto de la separación de valvas por ruptura del ligamento o de otras causas.

El porcentaje de mortalidad que obtuvimos fue de 26% para el control y 24% para el tratamiento sin haber diferencias entre ambas condiciones. Estos valores muestran una mortalidad relativamente alta, que ha sido diferente respecto a otro experimento en esta misma especie hecha por Ramajo et al. (2015) quienes no reportaron mortalidad. Experimentos en el campo han mostrado mortalidades mayores para esta misma especie (Alcazar and Mendo 2008; Avendaño et al. 2008). Otros experimentos en acidificación con otras especies han encontrado porcentajes de mortalidad similares y mayores sin tener una relación de causalidad por el bajo pH o alta pCO<sub>2</sub> (Ries et al. 2009).

El desarrollo gonadal:

La talla de primera madurez gonadal que observamos en esta especie difiere de lo observado por (Cañas et al. 1984) y más bien casi coincide con lo indicado por Carmen Yamashiro en un trabajo de Tarazona et al. (2007) que la talla de primera madurez es a los 25 mm. Nosotros reportamos la primera madurez en una talla de alrededor de 22 a 24 mm.

### 5.5. Respuesta de la concha de abanico a bajo pH e implicancias futuras

A partir del experimento se observó que la concha de abanico fue afectada principalmente en sus partes duras, probablemente esté utilizando algún tipo de compensación fisiológica para mantener el crecimiento de sus partes blandas en desmedro de la calcificación y el crecimiento de partes duras. Aunque el costo energético de la calcificación podría ser muy bajo respecto a otras funciones metabólicas (Palmer 1992), esto podría darse en situaciones del estrés causado por la disminución del pH en el agua de mar como indica Findlay et al. (2009). La disolución de la concha producida por un bajo pH puede ejercer un costo energético o físico e interferir en la función de homeostasis (Pörtner 2008). Nosotros no hemos medido en este experimento otras funciones metabólicas. Si hubiera mayor gasto energético por aumento de respiración y excreción de amonio se podría explicar mejor algún tipo de compensación fisiológica que pueda haber estado sucediendo en el metabolismo de esta especie.

Nuestros resultados de menor crecimiento de la valva y sin alteración del crecimiento somático coinciden con Thomsen & Melzner (2010); Melzner et al. (2011); Talmage & Gobler (2011) & Range et al. (2012) en *M. edulis*, *C. virginica* y *M. galloprovincialis*. Un pectínido del mismo género como *A. irradians* no ha mostrado efectos del bajo pH en el crecimiento de la concha y el tejido blando (Talmage & Gobler 2011). Para *A. irradians*, Ries et al. (2009) reportó una disminución de la calcificación, que coincide con la disminución en las tasas de calcificación

encontradas en nuestro experimento. Otros pectínidos como *Chlamys nobilis* y *P. maximus* han mostrado efectos negativos sobre sus tasas fisiológicas y su comportamiento (Liu & He 2012; Schalkhausser et al. 2013)

La hipótesis que planteamos en relación al crecimiento, fue parcialmente validada, debido a que sí hubo menor crecimiento en las partes duras pero no hubo variación en el crecimiento de las partes blandas. Y respecto a las tasas de calcificación rechazamos la hipótesis planteada dado que, las tasas de calcificación neta se redujeron en el tratamiento con pH bajo, esto último fue contrario a respuestas de los cocolitofóridos en aguas con pH bajo que mostraban mayor calcificación (Beaufort et al. 2011).

A partir de las tasas de crecimiento observadas en el campo en Perú y en Chile a través de la literatura, se puede especular que variaciones latitudinales y variables ambientales (temperatura, química de carbonatos, la procedencia de las larvas, la alimentación) estén jugando un papel importante en relación al crecimiento y calcificación. Existe la probabilidad de que exista una variedad de respuestas intraespecíficas de la concha de abanico frente a la acidificación del océano. Diferentes respuestas intraespecíficas se han encontrado en *M. edulis* por Gazeau et al. (2007) y Thomsen et al. (2010), probablemente debido a adaptaciones fisiológicas a hábitats con distintas condiciones en relación a la química de los carbonatos. Es posible que una aclimatación a altas  $p\text{CO}_2$  a largo plazo incremente la habilidad a calcificar en algunas especies como *Mytilus spp.* según Michaelidis et al. (2005) & Ries et al. (2009).

El incremento de disolución externa y la reducida calcificación podría favorecer el asentamiento de parásitos sobre la concha y dado que esta sería más débil tendría efectos perjudiciales para las poblaciones de *A. purpuratus* en su hábitat natural o en cultivo, como también la haría más vulnerable al ataque de sus depredadores (cangrejos y caracoles). La fragilidad de las valvas también tendría efectos negativos en el procesamiento de las conchas en la industria, dado que pérdidas económicas por rompimiento de valvas de hasta un 15% han sido reportados por Alcazar & Mendo (2008). En adición, es posible la invasión del espacio extracelular por microorganismos a través de fracturas en la concha que sería perjudicial para la especie en si como para el cultivo de la misma. Experimentos de largo plazo (> 6 meses) son necesarios para probar esta hipótesis (Thomsen et al. 2010).

Condiciones naturales de pH bajo en las costas peruanas y sus bahías producto de procesos como remineralización de la materia orgánica y del afloramiento pueden ser importantes como “análogos naturales” para entender cómo los ecosistemas pueden ser influenciados por futura acidificación oceánica; además estos hábitats también presentan niveles bajos de oxígeno y alta variabilidad en el tiempo (Aguirre-Velarde et al. 2016), estando así dos estresores actuando sobre los organismos.

Es necesario mayores estudios sobre la fragilidad de las valvas y medición de otras funciones metabólicas (respiración y excreción), el desarrollo de experimentos de acidificación en otras etapas de vida de la especie y evaluación de la interacción de otras variables junto al pH como la disminución de oxígeno.

## 6. CONCLUSIONES

- La disminución del pH tuvo un efecto negativo en la calcificación neta de *Argopecten purpuratus*, tal como lo demuestra la reducción de 9,9 % de la calcificación neta de *A. purpuratus* bajo la condición experimental de un pH de 7.4 en comparación con las condición experimental de un pH de 7.8. Por tanto queda rechazada la hipótesis sobre el efecto positivo en la calcificación de *A. purpuratus* por la disminución del pH.
- La disminución del pH tuvo un efecto negativo en la tasa de crecimiento de *Argopecten purpuratus* tal como lo demuestra la reducción de 8.5% de la tasa de crecimiento en talla de *A. purpuratus* bajo la condición experimental de un pH de 7.4 en comparación con la condición experimental de un pH de 7.8. Lo cual fue también consecuente con una reducción en la talla y peso de las valvas. Por tanto, en relación al crecimiento de la parte dura (la estructura calcárea) de *A. purpuratus* queda aceptada la hipótesis sobre el efecto negativo en el crecimiento de *A. purpuratus* por la disminución del pH.
- No se encontró un efecto negativo sobre el crecimiento del tejido somático (parte blanda) de *Argopecten purpuratus* bajo la condición experimental de un pH de 7.4 en comparación con la condición experimental de un pH de 7.8. Por tanto, en relación al crecimiento de la parte blanda de *A. purpuratus* queda

rechazada la hipótesis sobre el efecto negativo en el crecimiento por la disminución del pH.

- La disminución del pH tuvo un efecto positivo en la tasa de disolución de la valva de *Argopecten purpuratus*, tal como lo demuestra el aumento de 443.6% de la tasa de disolución de la valva de *A. purpuratus* bajo la condición experimental de un pH de 7.4 en comparación con las condición experimental de un pH de 7.8.
- La mortalidad de *Argopecten purpuratus* bajo las condiciones experimentales de pH de 7.4 y 7.8 alcanzó valores de 26% y 24% respectivamente, lo cual indica que la disminución del pH no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad.

## 7. RECOMENDACIONES

En nuevos experimentos se recomienda aplicar las siguientes medidas:

- Tener un grupo de repuesto para hacer el peso boyante que pueda suplir a los que salen del tanque, debido a que el hecho de sacarlos del tanque hace un detenimiento en el crecimiento y esto puede alterar los resultados. O de lo contrario hacer un módulo de pesado para ser puesto en los mismos tanques de experimentación y así no tener que sacarlos del agua.
- La limpieza regular de las paredes de los tanques podría ser importante para evitar la proliferación de las bacterias.
- Cuando se haga un conteo de mortalidad procurar diferenciar la mortalidad por ruptura del ligamento que une las valvas de las que no.
- Utilizar otro nivel de pH mayor e intermedio.
- Hacer mediciones de las variables del sistema de carbonatos en el tanque que suministra el agua para el experimento

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar C, Chang I, Tenorio L, Ynga G, Oscanoa A, Flores L. Compendio metodológico para la extracción de lípidos totales a partir de biomasa microalgal. 2011. p. 1–20.
- Aguirre A. Influencia de la calidad nutricional del seston sobre el crecimiento, condición reproductiva y composición química de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*, Lamarck 1819). Tesis, Fac. Pesq. - Univ. Nac. Agrar. La Molina. 2008.
- Aguirre A, Flye-Sainte-Marie J, Mendo J, Jean F. Sclerochronological records and daily microgrowth of the Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*, Lamarck, 1819) related to environmental conditions in Paracas Bay, Pisco, Perú. J Sea Res. 2015;99:1–8.
- Aguirre-Velarde A, Jean F, Thouzeau G, Flye-Sainte-Marie J. Effects of progressive hypoxia on oxygen uptake in juveniles of the Peruvian scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture. Elsevier B.V.; 2016;451:385–9.
- Alcazar JA, Mendo J. Crecimiento y supervivencia de juveniles de *Argopecten purpuratus* en sistemas de fondo y suspendido en la zona de Casma, Perú. Ecol Apl. 2008;7:71–80.
- Andersson AJ, Mackenzie FT, Bates NR. Life on the margin: Implications of ocean acidification on Mg-calcite, high latitude and cold-water marine calcifiers. Mar Ecol Prog Ser. 2008;373(February 2016):265–73.

- Avendaño M, Cantillánez M. Aspectos biológicos y poblacionales de *Argopecten purpuratus* en la reserva marina La Rinconada : contribución para su manejo. Cultiv y manejo moluscos bivalvos en Am Lat. 2008;249–66.
- Avendaño M, Cantillánez M, Thouzeau G. Effects of water depth on survival and growth of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) spat in northern Chile. Aquac Int. 2008;16(5):377–91.
- Basch L V. Effects of algal and larval densities on development and survival of asteroid larvae. Mar Biol. 1996;126:693–701.
- Bastidas O. Cell Counting with Neubauer Chamber. 2014.
- Beaufort L, Probert I, de Garidel-Thoron T, Bendif EM, Ruiz-Pino D, Metzl N, et al. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. Nature. 2011;476(7358):80–3.
- Beniash E, Ivanina A, Lieb NS, Kurochkin I, Sokolova IM. Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. Mar Ecol Prog Ser. 2010;419(February 2016):95–108.
- Berge JA, Bjerkeng B, Pettersen O, Schaanning MT, Øxnevad S. Effects of increased sea water concentrations of CO<sub>2</sub> on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. Chemosphere. 2006;62(4):681–7.
- Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J, Pipe R. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat Biol. 2008;2(1):67–74.

- Breitburg DL, Salisbury J, Bernhard JM, Cai W, Dupont S, Doney SC, et al. And on Top of All That... Coping with Ocean Acidification in the Midst of Many Stressors. *Oceanography*. 2015;28(2):48–61.
- Broadaway BJ. The relation among essential habitat, ocean acidification, and calcification on the Nantucket bay scallop (*Argopecten irradians*). University of Massachusetts Boston; 2012.
- Cabello R, Tam J, Jacinto ME. Procesos naturales y antropogénicos asociados al evento de mortalidad de conchas de abanico ocurrido en la bahía de Paracas ( Pisco , Perú) en junio del 2000. *Rev Peru Biol*. 2002;9(2):49–65.
- Caldeira K, Wickett ME. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*. 2003;425(6956):365.
- Cañas P, Bustos E, Robotham H. Estudio del ciclo reproductivo del ostión del norte *Chlamys (Argopecten) purpuratus*. Inst Fom Pesq. 1984;
- Cisneros R. Estudio bio-oceanográfico para determinar la capacidad de carga en la Bahía de Sechura. 2012. p. 1–212.
- Cisneros R, Bautista J, Juan A. Crecimiento comparativo de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en sistemas suspendidos. *Ecol Apl*. 2008;7(1,2):81–7.
- Cummings V, Hewitt J, van Rooyen A, Currie K, Beard S, Thrush S, et al. Ocean acidification at high latitudes: Potential effects on functioning of the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *PLoS One*. 2011;6(1).

- Dickinson GH, Ivanina A V, Matoo OB, Pörtner H-O, Lannig G, Bock C, et al. Interactive effects of salinity and elevated CO<sub>2</sub> levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. J Exp Biol. 2012;215:29–43.
- Doney SC, Fabry VJ, Feely R a, Kleypas J a. Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem. Ann Rev Mar Sci. 2009;1:169–92.
- Duarte C, Navarro JM, Acuña K, Torres R, Manríquez PH, Lardies MA, et al. Combined effects of temperature and ocean acidification on the juvenile individuals of the mussel *Mytilus chilensis*. J Sea Res. Elsevier B.V.; 2014;85:308–14.
- Esteban JF. Caracterización Microestructural y Cristalográfica de la Concha Prismatofoliada de Pectinoidea , Anomioidea y Ostreoidea ( Pteriomorphia : Bivalvia ). Implicaciones Evolutivas. Universidad de Granada; 2006.
- Everitt BS, Skron dal A. The Cambridge Dictionary of Statistics. Fourth Edi. Cambridge Univ. Press. New York; 2010.
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES J Mar Sci. 2008;65(3):414–32.
- Falini G, Albeck S, Weiner S, Addadi L. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. Source Sci New Ser. 1996;27124087(5245):67–9.
- Fan W, Li C, Wang X, Gong N, Xie L, Zhang R. Cloning, characterization and expression analysis of calcium channel beta subunit from pearl oyster (*Pinctada*

- fucata*). J Biosci Bioeng. 2007;104(1):47–54.
- Feely R a, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry VJ, et al. Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans. Science (80- ). 2004;305(5682):362–6.
- Findlay HS, Wood HL, Kendall M a., Spicer JJ, Twitchett RJ, Widdicombe S. Calcification, a physiological process to be considered in the context of the whole organism. Biogeosciences Discuss. 2009;6(1):2267–84.
- Friederich GE, Ledesma J, Ulloa O, Chavez FP. Air-sea carbon dioxide fluxes in the coastal southeastern tropical Pacific. Prog Oceanogr. Elsevier Ltd; 2008;79(2-4):156–66.
- Gattuso J-P, Lavigne H. Technical Note: Approaches and software tools to investigate the impact of ocean acidification. Biogeosciences. 2009;6:2121–33.
- Gazeau F, Parker LM, Comeau S, Gattuso JP, O'Connor W a., Martin S, et al. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. Mar Biol. 2013;160(8):2207–45.
- Gazeau F, Quiblier C, Jansen JM, Gattuso J-P, Middelburg JJ, Heip CHR. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification. Geophys Res Lett. 2007;34(7):1–5.
- González ML, López DA, Pérez MC, Castro JM. Effect of temperature on the scope for growth in juvenile scallops *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquac Int. 2002;10(4):339–48.

- González ML, López DA, Pérez MC, Riquelme VA, Uribe JM, Le Pennec M. Growth of the scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), in southern Chile. *Aquaculture*. 1999;175(3-4):307–16.
- Green MA, Waldbusser GG, Reilly SL, Emerson K, O'Donnell S'. Death by dissolution: Sediment saturation state as a mortality factor for juvenile bivalves. *Limnol Oceanogr*. 2009;54(4):1037–47.
- Hahn S, Rodolfo-Metalpa R, Griesshaber E, Schmahl WW, Buhl D, Hall-Spencer JM, et al. Marine bivalve shell geochemistry and ultrastructure from modern low pH environments: Environmental effect versus experimental bias. *Biogeosciences*. 2012;9(5):1897–914.
- Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, et al. Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*. 2008;454(7200):96–9.
- Hammer KM, Kristiansen E, Zachariassen KE. Physiological effects of hypercapnia in the deep-sea bivalve *Acesta excavata* (Fabricius, 1779) (Bivalvia; Limidae). *Mar Environ Res*. Elsevier Ltd; 2011;72(3):135–42.
- Harper EM. Are calcitic layers an effective adaptation against shell dissolution in the Bivalvia? *J Zool*. 2000;251:179–86.
- IPCC. Summary for Policymakers. *Clim. Chang*. 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 2013.
- Jacinto M, Moron O, Martiñez C, Villanueva P, Guzmán M, Córdova J. Evaluación

- de la calidad del ambiente marino en el área de Bayóvar - Ensenada de Sechura, 8 a 10 Mayo 1996. Inf Progres Inst del Mar del Perú- Callao. 1997;54:30–64.
- Kanagusuku K. Evaluación de los bioincrustantes presentes en sistemas de cultivo suspendido de *Argopecten purpuratus* (Lamarck,1819) “Concha de abanico” en la Bahía de Samanco. Universidad Ricardo Palma; 2009.
- Kennedy WJ, Taylor JD, Hall A. Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Biological Rev Cambridge Philos Soc.* 1969;44:499–530.
- Kikuchi Y, Tamiya N. Chemical taxonomy of the hinge-ligament proteins of bivalves according to their amino acid compositions. *Biochem J.* 1987;242:505–10.
- Kleypas JA, Feely RA, Fabry VJ, Langdon C, Sabine CL, Robbins LL. Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research - St Petersburg report. 2006. p. 88.
- Kurihara H. Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser.* 2008;373:275–84.
- Liu W, He M. Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chinese J Oceanol Limnol.* 2012;30(2):206–11.
- López Cabanillas HF. Variación estacional de especies productoras de floraciones algales nocivas y su relación con algunos factores físicos y químicos en la playa de Atenas, Bahía de Paracas, Pisco, durante setiembre 2004 - Agosto 2005. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2008.

- López DA, Riquelme VA, González ML. The effects of epibionts and predators on the growth and mortality rates of *Argopecten purpuratus* cultures in southern Chile. *Aquac Int.* 2000;8(5):431–42.
- Lorrain A, Paulet YM, Chauvaud L, Dunbar R, Mucciarone D, Fontugne M. 13C variation in scallop shells: Increasing metabolic carbon contribution with body size? *Geochim Cosmochim Acta.* 2004;68(17):3509–19.
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG. First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *PLoS One.* 2012;7(3):1–14.
- McClintock JB, Angus R a., McDonald MR, Amsler CD, Catledge S a., Vohra YK. Rapid dissolution of shells of weakly calcified Antarctic benthic macroorganisms indicates high vulnerability to ocean acidification. *Antarct Sci.* 2009;21(05):449.
- McElhany P, Busch DS. Appropriate pCO<sub>2</sub> treatments in ocean acidification experiments. *Mar Biol.* 2013;160(8):1807–12.
- Melzner F, Stange P, Trübenbach K, Thomsen J, Casties I, Panknin U, et al. Food supply and seawater pCO<sub>2</sub> impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PLoS One.* 2011;6(9).
- Mendo J, Yamashiro C, Rubio J, Camella A, Jurado E, Maldonado M, et al. Evaluación de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la Bahía Independancia, Pisco, Perú. *Inf. Inst. Mar Perú.* 1987;

- Michaelidis B, Ouzounis C, Paleras A, Pörtner HO. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. Mar Ecol Prog Ser. 2005;293(Lackner 2003):109–18.
- Millero FJ. Carbonate constant for estuarine waters. Mar Freshw Res. 2010;61:139–42.
- Morse JW, Mucci A, Millero FJ. The solubility of calcite and aragonite in seawater of 35‰ salinity at 25°C and atmospheric pressure. Geochim Cosmochim Acta. 1980;44(1):85–94.
- Mucci A. The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure. Am J Sci. 1983;283:780–90.
- Navarro JM. Fisiología energética de pectínidos iberoamericanos. Los moluscos pectínidos Iberoamérica Cienc y Acuic. 2002. p. 61–76.
- Navarro JM, Leiva GE, Martinez G, Aguilera C. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. J Exp Mar Bio Ecol. 2000;247(1):67–83.
- Palmer AR. Growth in marine gastropods: a non-destructive technique for independently measuring shell and body weight. Malacologia. 1982;23(1):63–73.
- Palmer AR. Calcification in marine molluscs: how costly is it? Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(4):1379–82.
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WA. Populations of the Sydney rock oyster,

- Saccostrea glomerata*, vary in response to ocean acidification. *Mar Biol.* 2011;158(3):689–97.
- Parker LM, Ross PM, O'Connor WD, Pörtner HO, Scanes E, Wright JM. Predicting the Response of Molluscs to the Impact of Ocean Acidification. *Biology (Basel)*. 2013;2:651–92.
- Pörtner HO. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Mar Ecol Prog Ser.* 2008;373:203–17.
- Ramajo L, Marbà N, Prado L, Peron S, Lardiles MA, Rodríguez-Navarro A, et al. Biomineralization changes with food supply confer juvenile scallops (*Argopecten purpuratus*) resistance to ocean acidification. *Glob Chang Biol.* 2015;1–13.
- Range P, Chícharo MA, Ben-Hamadou R, Piló D, Matias D, Joaquim S, et al. Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased pCO<sub>2</sub> and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales? *J Exp Mar Bio Ecol.* Elsevier B.V.; 2011;396(2):177–84.
- Range P, Piló D, Ben-Hamadou R, Chícharo MA, Matias D, Joaquim S, et al. Seawater acidification by CO<sub>2</sub> in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Mar Bio Ecol.* Elsevier B.V.; 2012;424-425:89–98.
- Riebesell, U., Fabry, V. J., Hansson, L., and Gattuso, J.-P. (Eds.): Guide to Best Practices for Ocean Acidification Research and Data Reporting, Publications

- Office of the European Union, Luxembourg, 260 p., 2010.
- Ries JB, Cohen AL, McCorkle DC. Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geology*. 2009;37(12):1131–4.
- Rodolfo-Metalpa R, Houlbrèque F, Tambutté É, Boisson F, Baggini C, Patti FP, et al. Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nat Clim Chang*. Nature Publishing Group; 2011;1(6):308–12.
- Rodolfo-Metalpa R, Lombardi C, Cocito S, Hall-Spencer JM, Gambi MC. Effects of ocean acidification and high temperatures on the bryozoan *Myriapora truncata* at natural CO<sub>2</sub> vents. *Mar Ecol*. 2010;31(3):447–56.
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, et al. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science* (80- ). 2004;305:367–71.
- Schalkhauser B, Bock C, Stemmer K, Brey T, Pörtner HO, Lannig G. Impact of ocean acidification on escape performance of the king scallop, *Pecten maximus*, from Norway. *Mar Biol*. 2013;160(8):1995–2006.
- Talmage SC, Gobler CJ. Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic bivalves. *PLoS One*. 2011;6(10).
- Tarazona J, Espinoza R, Solís M, Arntz W. Crecimiento y producción somática de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco (Perú) comparados entre eventos El Niño y La Niña. *Rev Biol Mar Oceanogr*. 2007;42(3):275–85.

- Thomsen J, Casties I, Pansch C, Körtzinger A, Melzner F. Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: Laboratory and field experiments. *Glob Chang Biol.* 2013;19(4):1017–27.
- Thomsen J, Gutowska MA, Saphörster J, Heinemann A, Trübenbach K, Fietzke J, et al. Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO<sub>2</sub>-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences.* 2010;7(11):3879–91.
- Thomsen J, Melzner F. Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol.* 2010;157(12):2667–76.
- Waldbusser GG, Bergschneider H, Green MA. Size-dependent pH effect on calcification in post-larval hard clam *Mercenaria spp.* *Mar Ecol Prog Ser.* 2010;417:171–82.
- Waldbusser GG, Voigt EP, Bergschneider H, Green MA, Newell RIE. Biocalcification in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in Relation to Long-term Trends in Chesapeake Bay pH. *Estuaries and Coasts.* 2011;34(2):221–31.
- Waller TR. The Evolution of the *Argopecten gibbus* Stock (Mollusca: Bivalvia), with Emphasis on the Tertiary and Quaternary Species of Eastern North America. *J Paleontol.* 1969;43:1–125.
- Watson SA, Peck LS, Tyler PA, Southgate PC, Tan KS, Day RW, et al. Marine

invertebrate skeleton size varies with latitude, temperature and carbonate saturation: Implications for global change and ocean acidification. *Glob Chang Biol.* 2012;18(10):3026–38.

Watson S-A, Southgate PC, Tyler PA, Peck LS. Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO<sub>2</sub> - driven ocean acidification. *J Shellfish Res.* 2009;28(January):431–7.

Weiner S, Dove PM. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev Mineral.* 2003;54(1):1–29.

Wheeler AP. Mechanisms of Molluscan Shell Formation. *Calcif Biol Syst.* CRC Press; 1992. p. 432.

Wilbur KM. Shell formation and regeneration. In: Wilbur KM, Yonge CM, editors. *Physiol Mollusca*, Vol 1. Academic Press Inc.; 1964. p. 488.

Wolff M. Population dynamics of the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* during the El Niño Phenomenon of 1983. *Can J Fish Aquat Sci.* 1987;44:1684–91.

Wolff M, Mendo J. Management of the Peruvian bay scallop (*Argopecten purpuratus*) metapopulation with regard to environmental change. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst.* 2000;10:117–26.

Yamashiro C, Mendo J. Evaluacion de la poblacion de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la Bahia Independencia, Pisco, Perú. 1988.

