



FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA Y TECNOLOGÍAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Modalidad Artículo Académico

Tema

Efecto de la hipercapnia en el desarrollo temprano del erizo de mar *Echinometra vanbrunti*

Autor

JOSÉ ANTONIO LUQUE MORA

Periodo 2024 – 2



Lic. Dolores Muñoz Verduga, Ph.D.
Presidenta del Tribunal de Titulación



Blga. Tania Lin Maldonado Sabando, Mg.
Miembro Tribunal de Titulación



Blgo. Javier Cañarte Pin, Mg.
Miembro Tribunal de Titulación

Manta, Manabí, Ecuador

11 de Febrero de 2025

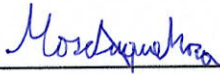
Declaración de autoría

Yo, Luque Mora José Antonio declaro que he concluido la realización del trabajo de titulación bajo la modalidad de Artículo Académico previo a la obtención del título de Biólogo, con el tema: "Efecto de la hipercapnia en el desarrollo temprano del erizo de mar *Echinometra vanbrunti*".


Se ha revisado la versión final del manuscrito y apruebo su presentación para su publicación.

Me encuentro en el derecho de asegurar que este trabajo es original, no ha sido publicado previamente.

Firma:



Luque Mora José Antonio
C.I. 1316690302

 Uleam UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ	NOMBRE DEL DOCUMENTO: CERTIFICADO DE TUTOR(A).	CÓDIGO: PAT-04-F-004
	PROCEDIMIENTO: TITULACIÓN DE ESTUDIANTES DE GRADO BAJO LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	REVISIÓN: 1 Página 1 de 1

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido, revisado y aprobado preliminarmente el Trabajo de Integración Curricular, en la modalidad de: Artículo Científico, bajo la autoría del estudiante Luque Mora José Antonio, legalmente matriculado en la carrera de Biología, período académico 2024-2025, cumpliendo el total de 384 horas, cuyo tema del proyecto es **“Efecto de la hipercapnia en el desarrollo temprano del erizo de mar *Echinometra vanbruntii*”**.

La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, y la originalidad del mismo, requisitos suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 06 de enero de 2025.

Lo certifico,



Blgo. Francisco Navarrete-Mier, Ph.D.
Docente Tutor(a)
Área: Cambio Climático



FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA Y TECNOLOGÍAS

Carrera DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Modalidad Artículo Académico

Tema

Efecto de la hipercapnia en el desarrollo temprano del erizo de mar *Echinometra vanbrunti*

Autor

JOSÉ ANTONIO LUQUE MORA

Periodo 2024 – 2

Efecto de la hipercapnia en el desarrollo temprano del erizo de mar *Echinometra vanbrunti*

José Luque-Mora^{1*}, Patricia Castillo-Briceño¹, Francisco Navarrete-Mier¹

¹Grupo de Investigación Bioma Ecuatorial y Acidificación Oceánica EBIOAC - Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí ULEAM, Manta-Ecuador

*Correo institucional: e1316690302@live.uleam.edu.ec

RESUMEN

En el presente estudio se enfrentó al erizo de mar *Echinometra vanbrunti* durante sus primeras 50 horas de desarrollo, ante dos condiciones de hipercapnia (hipercapnia moderada pH-T 7,44; hipercapnia alta pH-T 7,17; y condición control pH-T 7,88). En hipercapnia alta se presentó una disminución significativa de la saturación de Ω -Calcita y Ω -Aragonita y es en esta condición además que se detectó mortalidad significativa ($43,58 \pm 2,81$ individuos/ml) con respecto al control ($68,15 \pm 6,12$ individuos/ml), así como también, retraso en el desarrollo, determinado por la longitud del cuerpo ($101,59 \pm 12,0$ μm) comparado con el control ($128,39 \pm 8,20$ μm). Se evidenció también retraso en el crecimiento identificado por la longitud total del brazo, en hipercapnia alta ($148,91 \pm 9,69$ μm) e hipercapnia moderada ($177,47 \pm 3,97$ μm) comparado con el control ($227,81 \pm 6,72$ μm). La proporción del brazo largo/cuerpo en control ($1,78 \pm 0,06$) fue mayor a diferencia de la hipercapnia moderada ($1,52 \pm 0,07$) y la hipercapnia alta ($1,48 \pm 0,12$). La proporción de tamaño de brazos no se afectó a las 24 horas pos-fertilización en hipercapnia moderada ($1,03 \pm 0,01$) e hipercapnia alta ($1,05 \pm 0,01$) comparado con el control ($1,03 \pm 0,01$) ni a las 50 horas post-fertilización en hipercapnia moderada ($1,04 \pm 0,01$) e hipercapnia alta ($1,06 \pm 0,03$) comparado con el control ($1,05 \pm 0,02$). Este trabajo identifica por primera vez en el Ecuador la respuesta fisiológica del erizo de mar *E. vanbrunti* ante condiciones de hipercapnia.

Palabras clave: Larva, Supervivencia, Crecimiento, Anomalías, Carbonatos

Effect of hypercapnia on the early development of the sea urchin *Echinometra vanbrunti*

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

ABSTRACT

In the present study, the sea urchin *Echinometra vanbrunti* in its first 50 hours of development was subjected to two hypercapnia conditions (moderate hypercapnia pH-T 7.44; high hypercapnia pH-T 7.17; and control condition pH-T 7.88). In high hypercapnia, there was a significant decrease in Ω -Calcite and Ω -Aragonite saturation and it is in this condition that significant mortality was detected (43.58 ± 2.81 individuals/ml) with respect to the control (68.15 ± 6.12 individuals/ml), as well as developmental delay, determined by body length (101.59 ± 12.0 μm) compared to the control (128.39 ± 8.20 μm). Growth retardation identified by total arm length was also evident in high hypercapnia (148.91 ± 9.69 μm) and moderate hypercapnia (177.47 ± 3.97 μm) compared to control (227.81 ± 6.72 μm). The long arm/body ratio in control (1.78 ± 0.06) was higher in contrast to moderate hypercapnia (1.52 ± 0.07) and high hypercapnia (1.48 ± 0.12). The arm size ratio was not affected at 24 hours post-fertilization in moderate hypercapnia (1.03 ± 0.01) and high hypercapnia (1.05 ± 0.01) compared to control (1.03 ± 0.01) nor at 50 hours post-fertilization in moderate hypercapnia (1.04 ± 0.01) and high hypercapnia (1.06 ± 0.03) compared to control (1.05 ± 0.02). This work identifies for the first time in Ecuador the physiological response of the sea urchin *E. vanbrunti* to hypercapnia conditions.

Keywords: Larvae, Survival, Growth, Anomalies, Carbonates

INTRODUCCIÓN

El incremento en el uso de combustibles fósiles en las últimas décadas ha generado una mayor tasa de emisiones de CO₂ antropogénico hacia la atmosfera (Yoro & Daramola, 2020). La concentración de CO₂ atmosférico ha aumentado de aproximadamente 380 ppm previo a la revolución industrial hasta superar los 421 ppm en la actualidad (Tans & Keeling, 2024). Los modelos del IPCC indican que se podría llegar a superar los 1000 ppm de CO₂ atmosférico a finales de siglo (IPCC, 2023). El efecto de una mayor concentración de CO₂ o hipercapnia, ocasiona una mayor retención de la radiación emitida por la tierra, lo que origina el calentamiento global y consecuentemente el cambio climático (Yoro & Daramola, 2020). Pero además, cuando el CO₂ atmosférico entra en contacto con el agua oceánica produce una reacción química que resulta en la liberación de iones de hidrógeno (H⁺), los cuales reducen el pH marino; fenómeno conocido como acidificación oceánica (Findlay & Turley, 2021). Este proceso produce efectos negativos en múltiples taxones marinos, y es de especial preocupación los impactos encontrados sobre invertebrados marinos que forman estructuras calcáreas (Findlay & Turley, 2021). Una de las razones posibles de estos impactos es que debido a la reducción del pH del agua de mar, se disminuye la disponibilidad de iones de carbonato (CO₃⁻²), un componente vital para la construcción de sus estructuras calcáreas (Doney et al., 2020).

Los erizos de mar representan más de 900 especies y se caracterizan por tener un esqueleto de carbonato de calcio (CaCO₃) (Lawrence, 2020). Son organismos bentónicos que se distribuyen en todo el océano desde áreas tropicales, hasta ecosistemas árticos; y habitan zonas de arrecife, bosques de algas, bosques de pasto marino y profundidades (Lawrence, 2020). A nivel reproductivo son animales dioicos, con monomorfismo y fecundación externa (Pontheaux et al., 2021). En su ciclo de vida presentan 3 etapas principales, la embrionaria compuestas por los clivajes, blastulación y gastrulación; la fase larvaria en la que se forma el echino-pluteo y empieza a alimentarse; la metamorfosis en la termina su etapa plantónica, llegan a ser juveniles e inician su etapa bentónica (Pontheaux et al., 2021).

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

Los erizos de mar tienen gran relevancia a nivel ecológico y socioeconómico. Por ejemplo, a nivel ecológico, su rol en los ecosistemas es de pastoreadores e ingenieros ambientales (Sangil & Guzman, 2016). Mientras que a nivel socioeconómico el consumo de las gónadas de erizos como producto tiene alto valor y son comercializados en numerosos países de Asia y Europa (Stefansson et al., 2017). Históricamente las etapas tempranas de desarrollo temprano de los erizos de mar, han sido utilizadas como modelos en el estudio del desarrollo animal (Ettensohn, 2017). También se ha planteado su uso como bioindicadores de estresores del cambio climático (Foo et al., 2020; Zhan et al., 2016a). Pero además, los beneficios ecológicos, socioeconómicos e investigativos de los erizos de mar podrían verse afectados bajo condiciones de cambio climático, siendo las etapas de desarrollo temprano donde se han detectado con mayor frecuencia efectos negativos (Byrne & Hernández, 2020). Por ejemplo, se ha encontrado un retraso en el crecimiento de la longitud del brazo post-oral de la larva de *Arbacia lixula* expuestas a pH 7,7 en comparación con el control (Foo et al., 2020), o como en el caso de *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Echinometra mathei* que en entre pH de 7,8 a 6,8 se retrasó el crecimiento a medida que disminuía el pH (Kurihara & Shirayama, 2004). Además, las tasas de supervivencia también se han visto afectadas: En un estudio con 3 condiciones de pH reducido (7,71; 7,60; 7,51) se estimó que la eclosión de las blástulas de *Strongylocentrotus intermedius* a las 18 horas post-fertilización (hpf), se redujo para los tratamientos experimentales, además las tasas de supervivencia de las larvas de cuatro brazos presentaron menor supervivencia a medida que disminuía el pH a las 70 hpf (Zhan et al., 2016b). En otra investigación con la misma especie se detectó una mayor tasa de mortalidad en las larvas de cuatro brazos en la concentración más baja de pH (7,49) (Li et al., 2020). Por otro lado, en la especie *Hemicentrotus pulcherrimus* en 3 condiciones de pH (pH 7.76; 7.65; 7.55), la eclosión de las blástulas 25 hpf, fue mayor en el control que en los dos niveles más bajos de pH; y en el mismo estudio se encontró que la tasa de supervivencia de las larvas de cuatro brazos a las 120 hpf en el control era mayor que las 3 condiciones de hipercapnia (Zhan et al., 2016a). Por otro lado, se ha detectado que la

hipercapnia causa morfologías anómalas, por ejemplo en *Glyptocidaris crenularis* se encontró que la asimetría de los brazos post-orales de las larvas de cuatro brazos aumentaba cuando disminuía el pH (7.68; 7.58; 7.48) (Zhan et al., 2018).

La investigación de las afectaciones del bajo pH con estadios tempranos de desarrollo de equinoideos ha sido bien documentada en países de latitudes altas (Foo et al., 2020; Li et al., 2020), pero en países de latitudes medias y bajas, aún hay pocos estudios (Byrne & Hernández, 2020). Además, bajo escenarios futuros de cambio climático, la zona ecuatorial podría ser susceptible a procesos acidificación oceánica y experimentar alteraciones en el balance de la química de carbonatos por estar en sitios de surgencia (Byrne et al., 2013b; Kapsenberg et al., 2017).

En cuanto a Ecuador el estudio de la hipercapnia es escaso, los pocos estudios que se realizan son principalmente en crustáceos y moluscos (Navarrete-Mier & Castillo-Briceño, 2020) sin embargo, hasta el mejor de nuestro conocimiento no hay estudios previos sobre hipercapnia en equinodermos en Ecuador. Al no disponer de estudios ante escenarios de cambio climático, que evalúen la susceptibilidad de las especies de erizos que se encuentran en una zona tropical como Ecuador, no tenemos información si las afectaciones pueden ser similares a las que presentan especies encontradas en zonas templadas o polares. Sin embargo si tenemos conocimiento de la biología reproductiva de *Echinometra vanbrunti* (Galarza Verkovitch, 2014) y tomando en cuenta que es una especie con una amplia distribución a lo largo del país, entre las zonas intermareal y submareal (Cárdenas-Calle et al., 2020; Sonnenholzner et al., 2013), hemos plantado su uso como modelo para trabajos de cambio climático. Por lo tanto, en esta investigación analizamos la influencia de condiciones de hipercapnia en la supervivencia, crecimiento y potencial de desarrollo de anomalías en los primeros estadios de desarrollo del erizo de mar negro *Echinometra vanbrunti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de recolección de erizos de mar y sitio de estudio

50 individuos adultos sanos de erizo negro *E. vanbrunti* fueron colectados desde los intersticios de las rocas en la zona intermareal de San Mateo (0°57'10.9"S; 80°48'60.0"W), dos horas antes de la baja mar el día 24/10/2024 a las 14h00 (Fig. 1a). Los erizos de mar fueron trasladados en un tanque de plástico con 40 l de agua de mar filtrada, hasta el laboratorio del grupo de investigación Bioma Ecuatorial y Acidificación Oceánica, (EBIOAC), Manta. El estudio contó con la Autorización de Recolección Sin Fines Comerciales (MAATE-ARSFC-2024-0518), proporcionado por el Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica (MAATE).

2.2. Mantenimiento en el laboratorio EBIOAC-ULEAM

Se mantuvo a los individuos adultos en 4 acuarios de vidrio: en 3 acuarios (14 l) estaban 10 erizos y en el 4 acuario (28 l) se colocó 20 individuos. Cada acuario tenía agua de mar filtrada a través de un bolso de 125 µm (Fig. 1b). La temperatura del agua varió entre 24 – 26 °C y se mantuvo aireación continua en los acuarios. Se estabilizó a los individuos en las mismas condiciones y no se los alimentó, el motivo de esto es porque se utilizó solo para inducir el desove y se los devolvió al sitio de colecta 2 días después de recolectarlos. Además, se ha identificado que los erizos de mar son resistentes a ambientes adversos, logrando sobrevivir sin alimentación por un largo periodo de tiempo (Lawrence, 2020).

2.3. Inducción del desove y Fertilización

Después de los dos días en el laboratorio, cada individuo se extrajo con guantes de nitrilo de la pecera y se inyectó con 1-1,5 ml de KCl (Cloruro de potasio) 0,5 M, en la región intracelomática para inducir el desove (Foltz et al., 2004; Sonnenholzner-Varas et al., 2018) (Fig. 1c). Cuando las hembras expulsaron los óvulos se depositaron en 3 vasos de precipitación de 100 ml. Los 300 ml con óvulos obtenidos de 7 hembras se añadieron a un vaso de precipitación con 700 ml de agua de mar. El esperma de 5 machos se recolectó en seco en un tubo de ensayo de 15 ml mantenido con hielos para disminuir la temperatura. Se activó a los espermatozoides

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

con agua de mar, y con el fin de evitar poliespermia se realizó una disolución de 1 en 10 y con una pipeta Pasteur se colocó 3 ml de esta solución con espermatozoides previamente activados en un recipiente con los óvulos para realizar la fertilización, registrando este tiempo como minuto 0 o inicial. Inmediatamente posterior a la fecundación, con un vaso de precipitación se distribuyó homogéneamente 111 ml con los óvulos fecundados en 9 acuarios experimentales con 3 l de agua de mar. La población inicial de erizos fue de 90.040 embriones/l. Por otro lado, una vez finalizada la inducción para la liberación de gametos, se colocó a los individuos adultos en otro acuario con agua limpia. Los erizos adultos fueron devueltos vivos al lugar de colecta el mismo día de la fertilización.

2.4. Diseño experimental

La experimentación bajo condiciones de hipercapnia se estableció con un tratamiento control y 2 tratamientos de pH reducido, cada uno con 3 réplicas: control (pH-T 7,88) hipercapnia moderada (pH-T 7,44) e hipercapnia alta (pH-T 7,17) (Fig. 1d). El control y tratamientos se distribuyó aleatoriamente en acuarios plásticos (n=9) con 3 litros de agua de mar filtrada a través de un tamiz de 125 μ m. En los acuarios experimentales se realizó 2 aberturas en la tapa, una para introducir el electrodo y otra para las mangueras de CO₂, aireación y un palito plástico como soporte (los 3 materiales unidos con una amarra). La simulación de condiciones de hipercapnia se realizó mediante la inyección controlada de CO₂ de grado alimentario. El sistema de manguera de CO₂ inició desde la manguera del manómetro del cilindro, esta tuvo una unión en "T", en un extremo se enroscó un splitter de 4 vías y en la otra un splitter de 2 vías; a cada vía se le añadió una manguera de CO₂. Cada manguera de CO₂ se conectó a un extremo de las válvulas solenoides (total 6 válvulas solenoides o electroválvulas). Así mismo el otro extremo de la válvula solenoide se le añadió una manguera mantenida por sobre 60 cm de los acuarios experimentales y cada manguera tuvo una llave difusora y una válvula antirretorno. Al extremo se extendió otra manguera a cada acuario experimental con ingreso de CO₂. Se mantuvo aireación continua para

los acuarios experimentales por medio de 2 motores (marca JAD, modelos: S-4000B y SC-7500-2)

Para controlar y regular los niveles de inyección de CO₂, se usó el sistema (IKS Aquastar Versión 2, Alemania). La fuente de energía del sistema la proveyó un transformador de 110 a 220 V, al que se conectaba la computadora IKS y 2 barras de poder. A cada barra de poder se le conectó 3 enchufes de válvulas solenoides. A la computadora se conectó 8 electrodos de pH y se configuró conjunto con las válvulas solenoides para que los valores de pH se mantengan en un rango cercano al valor que se estableció. Se introdujo los electrodos en las aberturas de las tapas de los acuarios experimentales. Su distribución fue la siguiente, 1 electrodo para una réplica de control, 3 electrodos para las réplicas de hipercapnia moderada y 3 para hipercapnia alta. Se tuvo 1 electrodo en otra réplica de control, pero sus valores no se registraron porque el electrodo estuvo defectuoso. Se escogió el método estanque para la inyección de CO₂. Se estabilizó finalmente el burbujeo de la aireación y CO₂ mediante los reguladores que hubo entre mangueras. Las mangueras de CO₂ y aireación fueron sujetas a una cuerda localizada a 1,2 m de altura desde los acuarios experimentales. Se calibró los electrodos con buffers (NBS) 7 y 4 antes de la experimentación.

El tiempo de duración del experimento fue de 50 horas. Se midió los parámetros de temperatura, salinidad y pH en escala total en tiempos específicos durante los 3 días del estudio (Fig. 1e). Con un multiparámetro de mano (YK-5, YINMIK) se realizó muestreos discretos de salinidad y temperatura. Además, se realizó muestreos diarios de pH en escala total (pH-T). Para el registro de pH-T se utilizó el pH-metro (Orion Star A211, Thermo Fisher Scientific) conectado a un electrodo Ross (Orion 8102BNUWP, Thermo Fisher Scientific) y un sensor de temperatura (Orion 927007MD, Thermo Fisher Scientific). Se calibró el electrodo Ross a través de una curva a distintas temperaturas de Buffer-Tris (Material de referencia certificado, Dickson's Lab UCSD). Se registró inicialmente la medición de la salinidad en cada acuario experimental y luego se tomó muestreos de 180 ml de agua de mar con un vaso de plástico. Se introdujo el electrodo y el

sensor de temperatura en la muestra, se contabilizó 1 minuto y se registró el mV y temperatura. Posteriormente se realizó un duplicado de la lectura de pH y temperatura (el mismo proceso se realizó para cada acuario experimental. Se añadió los datos de salinidad, mV, y temperatura a una tabla de cálculos para determinar el pH-T. También se recolectó muestras para el análisis de Alcalinidad Total (AT) al inicio del experimento una vez iniciada la inyección de CO₂ y al finalizar el experimento. Al finalizar la experimentación se utilizó un colector para los individuos restantes y se ubicó en un recipiente con 3 l de agua dulce por 24 h para sacrificarlos por ósmosis.

2.5. Evaluación de respuesta ante condiciones de hipercapnia

2.5.1. Supervivencia

Para determinar la supervivencia por medio del conteo, se homogenizó el agua de cada acuario experimental y se extrajo 1ml del medio del acuario, se repitió el proceso 3 veces para cada acuario (Fig. 1f). Posteriormente se ubicó en un tubo eppendorf de 1,5 ml para el muestreo a los 0,5 y para las 50 hpf se colocó en pocillos plásticos, teniendo en total 27 muestras (3 muestreos x 9 acuarios experimentales). Luego de realizar los muestreos se fijó las muestras con 1 gota de formalina al 10%. Con una pipeta Pasteur se extrajo la muestra y se la ubicó en los canales de una placa de vidrio. La placa se la ubicó bajo el microscopio óptico y luego, en forma de zigzag con un contador de mano se procedió a contar los estadios vivos en desarrollo. Una vez contados se anotó en la hoja de registros. Después se extrajo la muestra contada, se la ubicó en su pocillo, se enjuagó la pipeta aparte con agua de mar, y se continuó con la siguiente réplica.

2.5.2. Crecimiento y Asimetría

Para determinar el crecimiento a las 24 hpf con una jeringuilla de 5 ml se extrajo 3 ml del fondo de cada acuario experimental (n=9) (Fig. 1f). Se ubicó en los pocillos plásticos y se fijó con 1 gota de formalina al 10%. A las 50 hpf se realizó el muestreo, al fondo, al medio y cerca de la superficie del acuario experimental (n= 9). Luego se los fijó con una gota de formalina al 10%.

Con una pipeta Pasteur se extrajo del fondo del pocillo de plástico aproximadamente 0,1 ml,

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

tratando de obtener varios individuos. La muestra se ubicó en las dos cuadrillas de una cámara de Neubauer. Se realizó fotografías de la etiqueta a la que pertenecía la muestra y se registró el tiempo de inicio de toma de fotografías de cada muestra. Mediante análisis de imagen con el software ImageJ (Schneider et al., 2012) (Fig. 1g). Se realizó la medición de la longitud de 10 larvas a las 24 hpf y de larvas a las 50 hpf de cada réplica del control (n=30), hipercapnia moderada (n=30), hipercapnia alta (n=30). Se utilizó la medida de la longitud total del brazo más largo (μm), para determinar el crecimiento en los tiempos definidos. La longitud del cuerpo (μm) solo se la registró para las 50 hpf. La asimetría de la longitud total de los brazos se la obtuvo de la proporción entre el brazo más largo/brazo más corto (μm) a 24 y 50 hpf. A las 50 hpf se determinó la proporción de la longitud del brazo largo/longitud del cuerpo (μm).

2.6. Análisis AT y Sistema de Carbonatos

Se recolectó muestras de 250 ml para el análisis de Alcalinidad Total al iniciar y al finalizar los experimentos. La muestra inicial fue del agua filtrada de los acuarios previa a la puesta de organismos y la muestra final se tomó de cada uno de ellos después de la filtración con una malla de 50 μm . Se almacenó la muestra en botellas plásticas de 250 ml con 200 μl de cloruro de mercurio saturado. Para la medición de Alcalinidad Total se usó un equipo de Grand Titulación Orion Star T910 (Thermo Fisher Scientific) usando un electrodo Ross (Orion 8102BNUWP Thermo Fisher Scientific) calibrado con sistema NBS. Para la titulación se usó ácido clorhídrico 0.1N provisto por el laboratorio del Dr. Andrew Dickson (Material certificado, Dickson's Lab UCSD). Toda titulación se realizó por duplicado con 50 ml de muestra.

Para el análisis del sistema de carbonatos se utilizó el software CO2SYS V2.1. ajustado con la constante de disociación de Lueker (Lueker et al., 2000) y para el KHSO_4 la constante de disociación de Dickson (Dickson, 1990). Se añadió al software los datos de Alcalinidad Total, pH-T y las mediciones auxiliares de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y salinidad (ppt) y se obtuvo las estimaciones de $p\text{CO}_2$, TCO_2 , $f\text{CO}_2$, Ω -Calcita y Ω -Aragonita.

2.7. Procesamiento de datos y análisis estadístico

La estadística de los parámetros físico-químicos, conteos para la supervivencia a las 0,5 y 50 hpf, la longitud total del brazo (μm), la longitud del cuerpo (μm), la proporción del brazo largo/brazo corto y la proporción del brazo largo/cuerpo a las 24 y 50 hpf de los controles y tratamientos se ejecutó en el software de Past versión (4.13) (Hammer et al., 2001) (Fig. 1g). El nivel de significancia que se utilizó fue $p < 0.05$. A los datos se les ejecutó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y la prueba de Levene para identificar la Homogeneidad de las varianzas entre el control y tratamientos. Los datos ambientales en control y tratamientos fueron determinados por la prueba de Kruskal-Wallis con el test de Dunn y ajuste de Bonferroni para evaluar las variaciones entre grupos. Se identificaron las diferencias estadísticas con el ANOVA de una vía entre el control y tratamientos (pH como factor) para el conteo y crecimiento. La prueba post-hoc que se utilizó fue la prueba de Tukey. Debido a diferencias en la normalidad y homogeneidad solo los datos de la proporción de brazo largo/brazo corto se le realizó la prueba de Kruskal-Wallis con el test de Dunn y ajuste de Bonferroni para ver las variaciones entre grupos. Todas las gráficas presentadas se procesaron el software de SigmaPlot V 14.0 (Systat Software; San Jose, CA, USA).

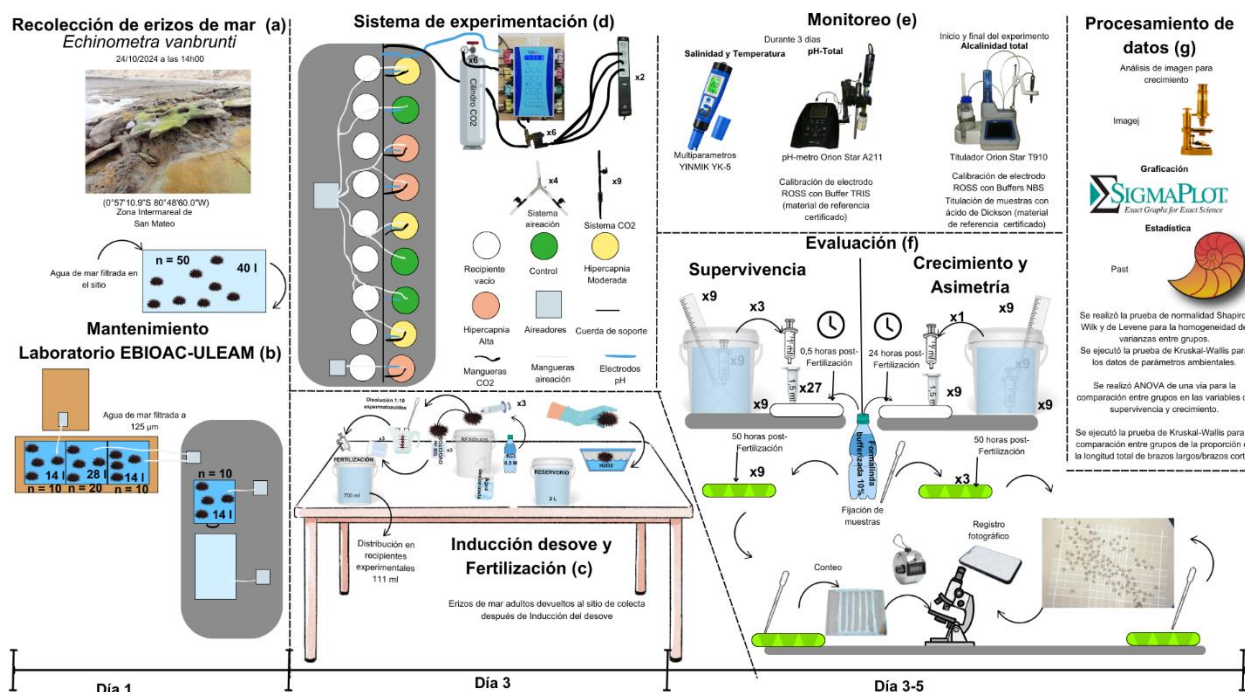


Figura 1

Esquema del diseño experimental desarrollado en el estudio, a) Recolección de erizos de mar, b) Mantenimiento Laboratorio EBIOAC-ULEAM, c) Inducción desove y Fertilización, d) Sistema de experimentación, e) Monitoreo, f) Evaluación de respuesta ante condiciones de hipercapnia, g) Procesamiento de datos.

RESULTADOS

3.1. Parámetros físicos-químicos

Se registraron los parámetros en los acuarios experimentales durante los días de experimentación. En un inicio el pH-T en los acuarios experimentales presentó los siguientes valores ($7,872 \pm 0,01$ pH-T) (Media \pm D.S.), la Alcalinidad Total varió ($2250,33 \pm 12,45$ µmol/kg), la $p\text{CO}_2$ tuvo ($630,65 \pm 63,62$ µmol/kg), la $\Omega\text{Calcita}$ ($3,59 \pm 0,26$ ΩCa), la $\Omega\text{Aragonita}$ ($2,35 \pm 0,17$ ΩAr). Otros parámetros obtenidos se pueden observar en la Tabla 1.

Al finalizar el experimento los parámetros físico-químicos presentaron la siguiente variación. Los valores de pH-T de la hipercapnia moderada ($7,448 \pm 0,05$ pH-T), fue igual ($p > 0,05$)

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

entre el control ($7,903 \pm 0,00$ pH-T) e hipercapnia alta ($7,104 \pm 0,09$ pH-T). Pero la hipercapnia alta fue diferente al control ($p < 0,05$). Los parámetros de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no variaron entre el experimento ($p > 0,05$), el control tuvo ($24,70 \pm 0,00^{\circ}\text{C}$), la hipercapnia moderada ($24,73 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$) y la hipercapnia alta ($24,67 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$). La salinidad (ppt) no varió ($p > 0,05$) en el control ($31,53 \pm 0,15$ ppt) la hipercapnia moderada ($31,53 \pm 0,06$ ppt) e hipercapnia alta ($31,57 \pm 0,10$ ppt). La Alcalinidad Total de la hipercapnia moderada ($2168,16 \pm 16,30$ $\mu\text{mol/kg}$) fue igual ($p > 0,05$) a la del control ($2123,66 \pm 10,73$ $\mu\text{mol/kg}$) e hipercapnia alta ($2207,66 \pm 5,0$ $\mu\text{mol/kg}$) pero la hipercapnia alta fue mayor ($p < 0,05$) que el control. La TCO_2 ($\mu\text{mol/kg}$) de la hipercapnia moderada ($2135,98 \pm 14,70$ $\mu\text{mol/kg}$) fue igual ($p > 0,05$), al control ($1929,64 \pm 2,14$ $\mu\text{mol/kg}$) e hipercapnia alta ($2289,95 \pm 33,18$ $\mu\text{mol/kg}$) pero la hipercapnia alta fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al control. La $f\text{CO}_2$ ($\mu\text{mol/kg}$) en la hipercapnia moderada ($1776,18 \pm 203,60$ $\mu\text{mol/kg}$) fue igual al control ($542,34 \pm 6,45$ $\mu\text{mol/kg}$) e hipercapnia alta ($4183,27 \pm 853,39$ $\mu\text{mol/kg}$) pero fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en la hipercapnia alta comparada con el control. La $p\text{CO}_2$ ($\mu\text{mol/kg}$) de la hipercapnia moderada ($1781,90 \pm 203,71$ $\mu\text{mol/kg}$) fue igual al control ($544,09 \pm 6,47$ $\mu\text{mol/kg}$) e hipercapnia alta ($4196,73 \pm 856,15$ $\mu\text{mol/kg}$), pero en la hipercapnia alta fue significativamente mayor que el control. La ΩCa de la hipercapnia moderada ($1,42 \pm 0,15$ ΩCa) fue igual ($p > 0,05$) al control ($3,51 \pm 0,03$ ΩCa) e hipercapnia alta ($0,68 \pm 0,13$ ΩCa) pero la hipercapnia alta fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el control. La ΩAr de la hipercapnia moderada ($0,92 \pm 0,10$ ΩAr) fue igual ($p > 0,05$) al control ($2,29 \pm 0,02$ ΩAr) e hipercapnia alta ($0,45 \pm 0,09$ ΩAr) pero la hipercapnia alta fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el control. En la Tabla 2 se presentan los datos en comparación de grupos al finalizar el experimento.

Tabla 1

Características del sistema de carbonatos al Iniciar el experimento con embriones de erizo E. vanbrunti en cada grupo experimental (Media \pm D.S.).

Parámetros Físico-Químicos		
Medidos	pH (Escala Total)	7,872 \pm 0,01
	Temperatura (°C)	25,27 \pm 0,06
	Salinidad (ppt)	31,35 \pm 0,00
	AT (μ mol/kg)	2250,33 \pm 12,45
Calculados	TCO ₂ (μ mol/kg)	2058,91 \pm 16,88
	fCO ₂ (μ mol/kg)	628,64 \pm 63,42
	pCO ₂ (μ mol/kg)	630,65 \pm 63,62
	Ω Ca	3,59 \pm 0,26
	Ω Ar	2,35 \pm 0,17

Tabla 2

Características del sistema de carbonatos al finalizar el experimento con larvas de erizo E. vanbrunti en cada grupo experimental (Media \pm D.S.). Literales diferentes indican diferencias significativas (Kruskall-Wallis $p < 0,05$).

Parámetros Físico-Químicos		control	hipercapnia moderada	hipercapnia alta
Medidos	pH (Escala Total)	7,903 \pm 0,00 ^a	7,448 \pm 0,05 ^{ab}	7,104 \pm 0,09 ^b
	Temperatura (°C)	24,52 \pm 0,03 ^a	24,55 \pm 0,05 ^a	24,50 \pm 0,10 ^a
	Salinidad (ppt)	31,59 \pm 0,10 ^a	31,71 \pm 0,02 ^a	31,70 \pm 0,18 ^a
	AT (μ mol/kg)	2123,66 \pm 10,73 ^a	2168,16 \pm 16,30 ^{ab}	2207,66 \pm 5,00 ^b
Calculados	TCO ₂ (μ mol/kg)	1929,64 \pm 2,14 ^a	2135,98 \pm 14,70 ^{ab}	2289,95 \pm 33,18 ^b
	fCO ₂ (μ mol/kg)	542,34 \pm 6,45 ^a	1776,18 \pm 203,6 ^{ab}	4183,27 \pm 853,39 ^b
	pCO ₂ (μ mol/kg)	544,09 \pm 6,47 ^a	1781,90 \pm 203,71 ^{ab}	4196,73 \pm 856,15 ^b
	Ω Ca	3,51 \pm 0,03 ^a	1,42 \pm 0,15 ^{ab}	0,68 \pm 0,13 ^b
	Ω Ar	2,29 \pm 0,02 ^a	0,92 \pm 0,10 ^{ab}	0,45 \pm 0,09 ^b

Nota: AT, Alcalinidad Total; TCO₂, carbono orgánico disuelto; fCO₂, Fugacidad de CO₂; pCO₂, presión parcial de CO₂; ΩCa, Calcita; ΩAr, Aragonita.

3.2. Supervivencia

Se distribuyó una cantidad homogénea de organismos en cada acuario experimental al inicio del experimento. A las 0.5 horas los conteos indicaron que la media de organismos por ml fue de 90,04 sin que haya diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0,05$) (Fig. 2). A las 50 hpf la población se redujo en todos los acuarios, sin embargo, se aprecia un gradiente de supervivencia con un conteo de número de individuos/ml: control ($68,15 \pm 6,12$ individuos/ml); hipercapnia moderada ($46,04 \pm 8,08$ individuos/ml); hipercapnia alta ($43,58 \pm 2,81$ individuos/ml). Se detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) solamente entre el control y la hipercapnia alta (Fig. 2). Al finalizar el experimento el porcentaje de supervivencia en cada grupo experimental fue: control ($68,15 \pm 6,12\%$); hipercapnia moderada ($46,04 \pm 8,08\%$); hipercapnia alta ($43,58 \pm 2,81\%$).

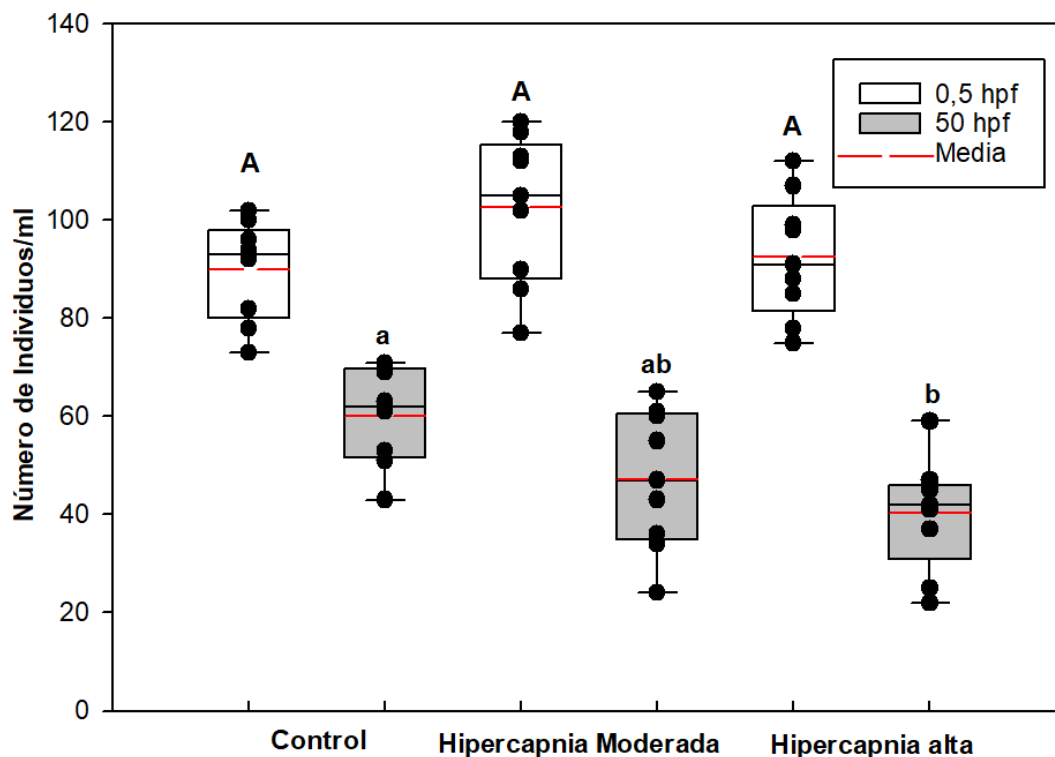


Figura 2

*Número de individuos de *E. vanbrunti* por ml a las 0,5 y 50 horas post-fertilización, en las diferentes condiciones experimentales. Las letras indican los grupos estadísticos diferentes (Anova y post-hoc de Tukey). Letras mayúsculas comparan entre grupos a 0.5 hpf y letras minúsculas compran entre grupos a 50 hpf.*

3.3. Crecimiento

Las larvas se midieron por medio de análisis de imagen en cada grupo experimental, las larvas fotografiadas se pueden observar en la (Fig. 3). A las 24 hpf se observó un decrecimiento de la longitud total del brazo en los grupos experimentales a medida que aumentó la hipercapnia: control ($135,66 \pm 5,57 \mu\text{m}$); hipercapnia moderada ($121,30 \pm 8,31 \mu\text{m}$); hipercapnia alta ($102,55 \pm 6,38 \mu\text{m}$). Se detectó diferencias significativas entre el control y la hipercapnia alta ($p < 0,05$), la hipercapnia moderada también fue diferente de la hipercapnia alta ($p < 0,05$) pero no fue diferente del control ($p > 0,05$) (Fig. 4). A las 50 hpf el aumento de la hipercapnia resultó en un decrecimiento

acrecentado de la longitud total del brazo en los tratamientos: control ($227,81 \pm 6,72 \mu\text{m}$); hipercapnia moderada ($177,47 \pm 3,97 \mu\text{m}$); hipercapnia alta ($148,91 \pm 9,69 \mu\text{m}$). En este tiempo la longitud total del brazo de los tratamientos fue significativamente mayor en el control comparado con la hipercapnia moderada e hipercapnia alta ($p < 0,05$) (Fig. 4).

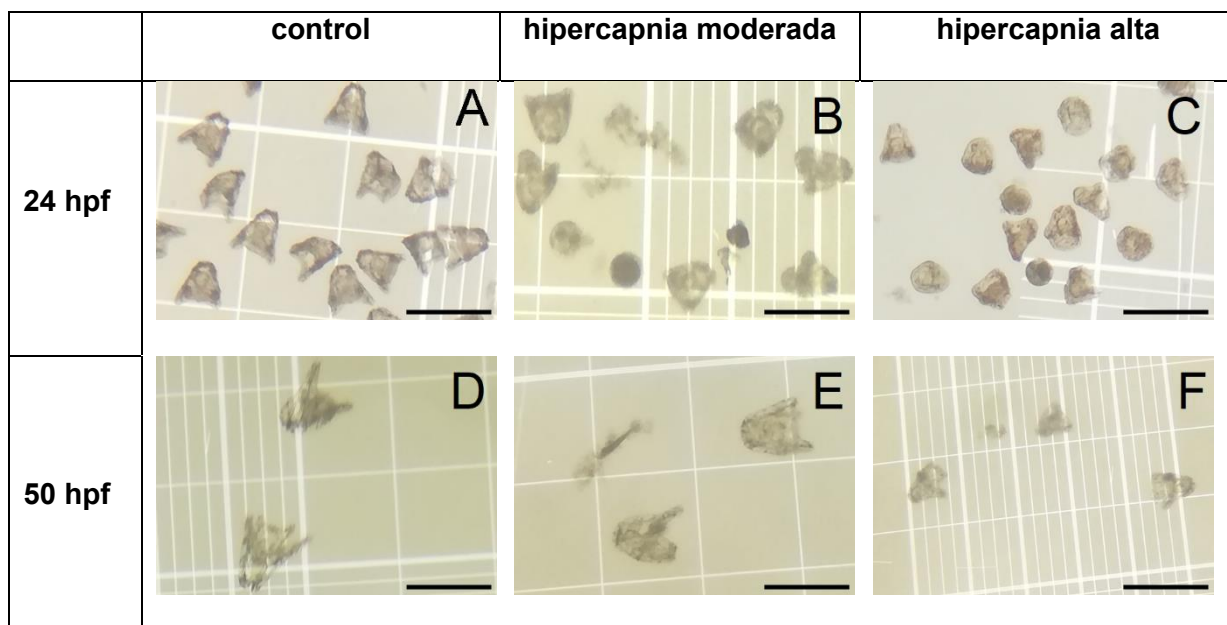


Figura 3

Larvas a las 24 horas post-fertilización en control y tratamientos (A, B y C). Larvas a las 50 horas post-fertilización en control y tratamientos (D, E y F). Línea negra representa la escala de 200 μm .

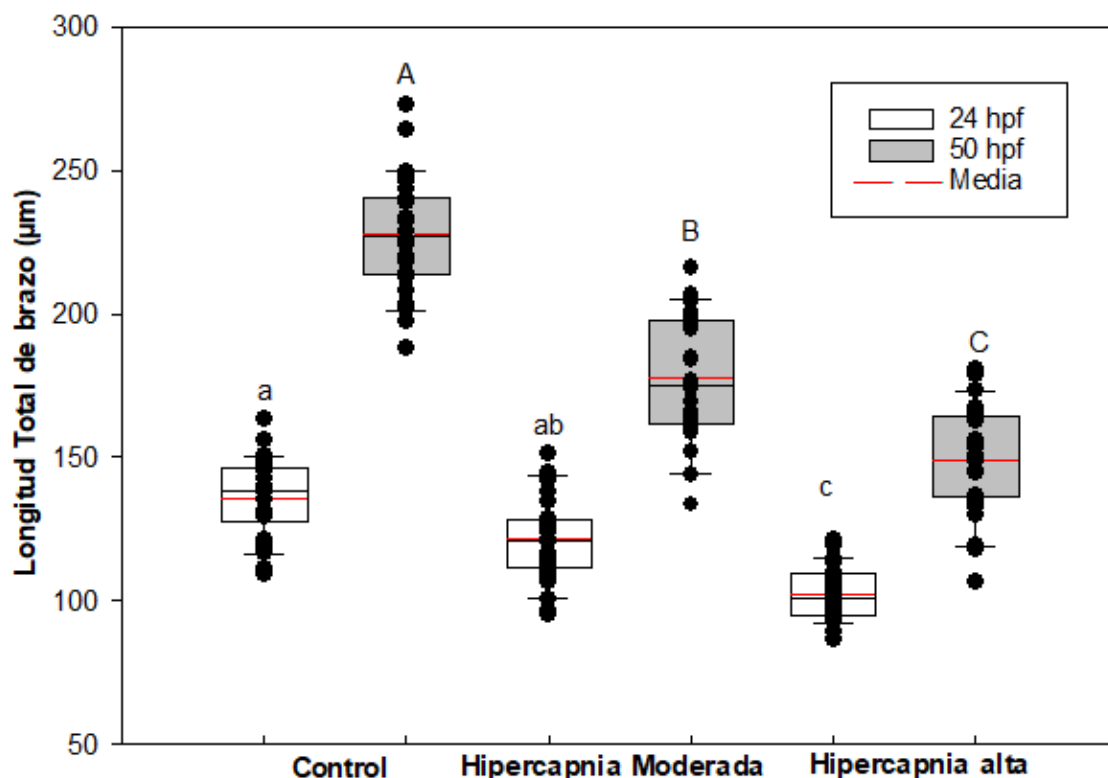


Figura 4

*Longitud total de brazo de *E. vanbrunti* a las 24 y 50 horas post-fertilización, en las diferentes condiciones experimentales. Las letras indican los grupos estadísticos diferentes (Anova y post-hoc de Tukey). Letras minúsculas comparan entre grupos a 24 hpf y letras mayúsculas comparan entre grupos a 50 hpf.*

El incremento de la hipercapnia resultó en una disminución del crecimiento de la longitud del cuerpo a las 50 hpf (Fig. 5). La longitud del cuerpo en la hipercapnia moderada ($117,37 \pm 3,25 \mu\text{m}$) estuvo en un rango cercano al control ($128,39 \pm 8,20 \mu\text{m}$) e hipercapnia alta ($101,59 \pm 12,01 \mu\text{m}$), pero la longitud del cuerpo en hipercapnia alta fue notablemente menor que el control (Fig. 5). Se detectó que la longitud del cuerpo fue significativamente igual, cuando la hipercapnia moderada se comparaba con el control e hipercapnia alta ($p > 0,05$). Por otro lado, la longitud del

cuerpo en hipercapnia alta fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en las condiciones control (Fig. 5).

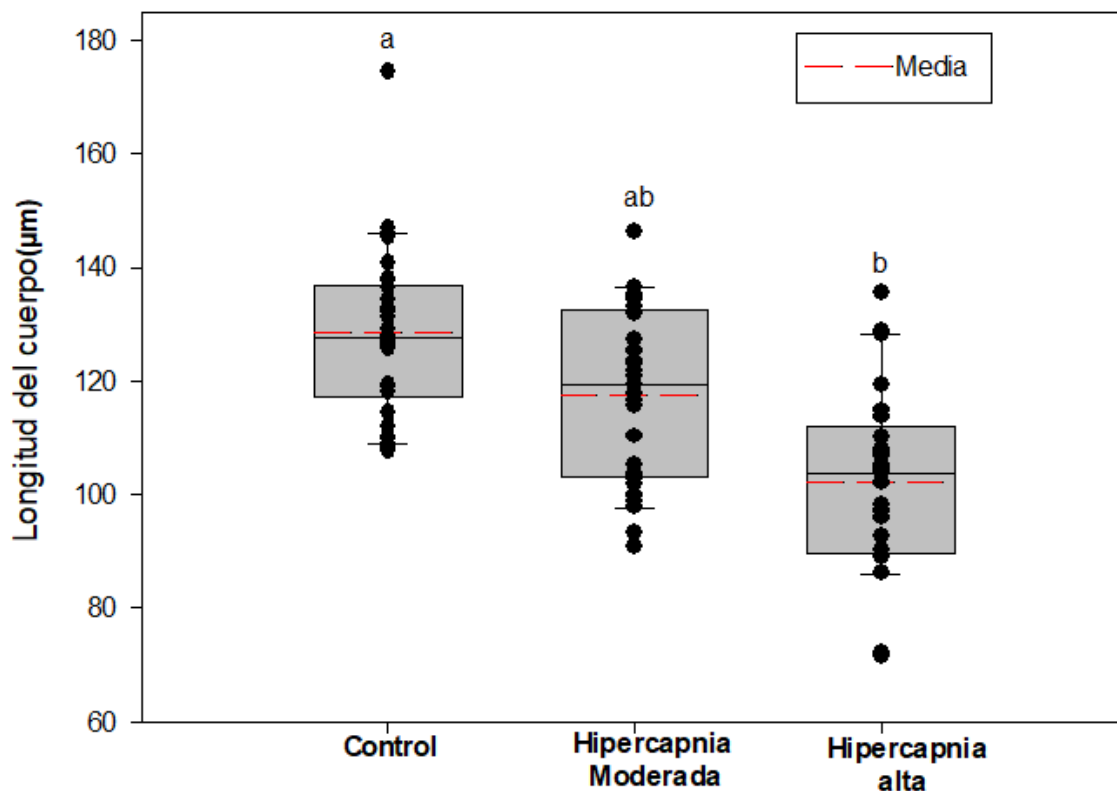


Figura 5

Longitud del cuerpo de E. vanbrunti a las 50 hpf, en las diferentes condiciones experimentales. Las letras indican los grupos estadísticos diferentes (Anova y post-hoc de Tukey). Letras minúsculas comparan entre grupos a 50 hpf.

Los niveles de hipercapnia utilizados en este estudio no tuvieron un efecto notable entre la proporción del brazo largo/brazo corto a las 24 y 50 hpf comparados con el control. A pesar de que a las 24 hpf se observó una ligera desproporción del brazo largo/brazo corto en hipercapnia alta ($1,05 \pm 0,01$), la proporción de los brazos fue igual ($p > 0,05$) comparando el control ($1,03 \pm 0,01$) e hipercapnia moderada ($1,03 \pm 0,01$) (Fig. 6). A las 50 hpf la proporción del brazo largo/brazo corto en el control ($1,05 \pm 0,02$) tuvo una ligera desproporción, similar a lo que sucedió

con la hipercapnia alta ($1,06 \pm 0,03$) comparando con la hipercapnia moderada ($1,04 \pm 0,01$). Aunque así, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los 3 grupos experimentales, por lo que no hubo asimetría entre los brazos a las 50 hpf (Fig. 6).

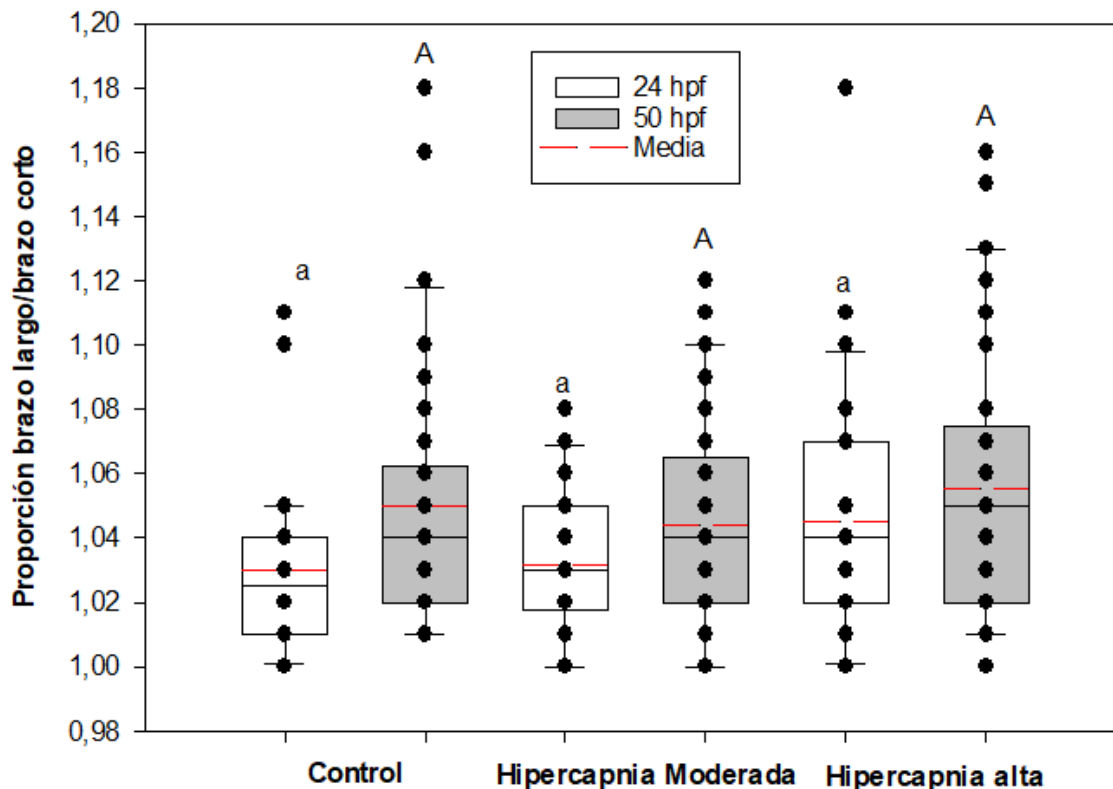


Figura 6

Proporción brazo largo/brazo corto de E. vanbrunti a las 24 y 50 horas post-fertilización, en las diferentes condiciones experimentales. Las letras indican los grupos estadísticos diferentes (Kruskal-Wallis y post-hoc de Dunn). Letras minúsculas comparan entre grupos a 24 hpf y letras mayúsculas comparan entre grupos a 50 hpf.

La proporción brazo largo/cuerpo a las 50 hpf resultó ser igual en hipercapnia moderada e hipercapnia alta comparado con el control. El control tuvo una proporción brazo largo/cuerpo marcada ($1,78 \pm 0,06$) a diferencia de la hipercapnia moderada ($1,52 \pm 0,07$) y la hipercapnia alta ($1,48 \pm 0,12$) siendo estas similares entre las mismas (Fig. 7). Se detectó que la proporción brazo

largo/cuerpo en el control fue significativamente diferente ($p < 0,05$) a la hipercapnia moderada e hipercapnia alta, pero que entre los niveles de hipercapnia no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la proporción brazo largo/cuerpo (Fig. 7). Por esto se determinó que la longitud de los brazos en hipercapnia moderada e hipercapnia alta se relacionaron significativamente con la longitud del cuerpo a diferencia de lo que sucedió con el control.

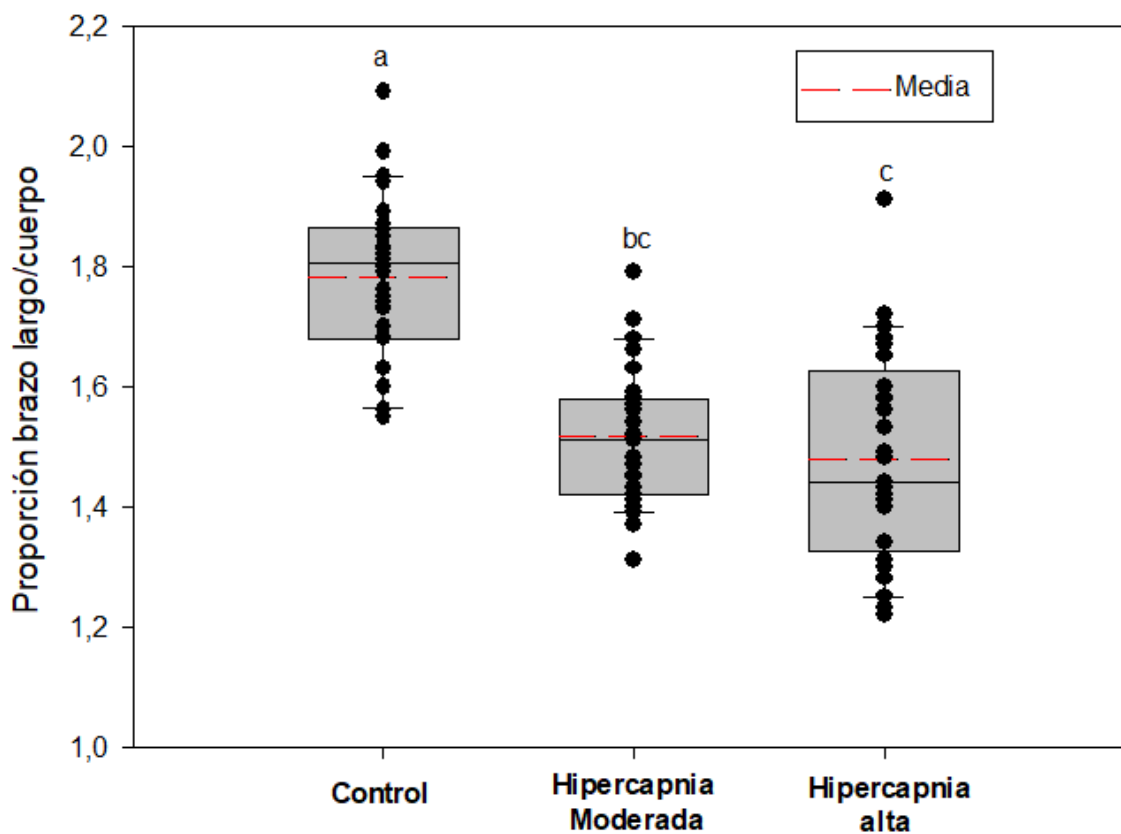


Figura 7

Proporción de brazo largo/cuerpo de E. vanbrunti a las 50 horas post-fertilización, en las diferentes condiciones experimentales. Las letras indican los grupos estadísticos diferentes (ANOVA y post-hoc de Tukey). Letras minúsculas comparan entre grupos a las 50 hpf.

DISCUSIÓN

Los resultados detectados en este estudio indican que la supervivencia y el crecimiento de los estadios tempranos de *E. vanbrunti* son afectados por condiciones de hipercapnia. Estos efectos se han descrito anteriormente en especies de latitudes medias y altas (Foo et al., 2020; Kurihara & Shirayama, 2004; Li et al., 2020), sin embargo, este es hasta el mejor de nuestro conocimiento, el primer estudio con una especie altamente relevante a nivel ecológico para los arrecifes rocosos intermareales en el Pacífico Tropical.

El diseño experimental con el que se trabajó en este artículo es similar a otros diseños en los que trabajan a través de la inyección de CO₂ para llegar a ciertos niveles de pH en los que los organismos experimentales van a estar expuestos (Clark et al., 2009; Stumpp et al., 2011). El tiempo de exposición en nuestro caso fue de 50 horas considerando el hecho de que hasta ese tiempo los individuos pueden desarrollarse sin necesidad de alimento suplementario. Debido a que las condiciones del laboratorio no permitían una estandarización de un alimento extra decidimos trabajar solo las primeras 50 horas de desarrollo, como lo han realizado otros estudios a las 72 hpf (Kurihara & Shirayama, 2004) o 96 hpf (Zhan et al., 2018b). Además considerando que las primeras horas de desarrollo son importantes porque son los estados donde otros estudios han encontrado que hay alteraciones en la supervivencia (Zhan et al., 2018b; Zhan et al., 2016a) o en el crecimiento (Byrne, Ho, et al., 2013; Kurihara & Shirayama, 2004).

De esta forma nuestro diseño experimental planteó una serie de acuarios que al finalizar la experimentación se mantuvieron en un pH control ($7,903 \pm 0,00$ pH-T), hipercapnia moderada ($7,448 \pm 0,05$ pH-T) e hipercapnia alta ($7,104 \pm 0,09$ pH-T) simulando condiciones de hipercapnia que podrían ocurrir en escenarios futuros.

Estas condiciones de hipercapnia están directamente relacionadas con el sistema de carbonatos, en la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos al final del experimento. En el cual se puede destacar que el pH se mantiene en los niveles deseados, y que la temperatura y

salinidad no varían en los grupos experimentales y la Alcalinidad Total tiene un ligero descenso hacia la hipercapnia alta. En esta situación es destacable que tanto la $p\text{CO}_2$ como el TCO_2 aumentan de forma gradual conforme aumentan los niveles de hipercapnia. De la misma forma los niveles de ΩCa disminuyen desde: Control ($3,51 \pm 0,03 \Omega\text{Ca}$); hipercapnia moderada ($1,42 \pm 0,15 \Omega\text{Ca}$) hasta la hipercapnia alta ($0,68 \pm 0,13 \Omega\text{Ca}$). De la misma forma los niveles de la ΩAr disminuyen progresivamente en Control ($2,29 \pm 0,02 \Omega\text{Ar}$); hipercapnia moderada ($0,92 \pm 0,10 \Omega\text{Ar}$) e hipercapnia alta ($0,45 \pm 0,09 \Omega\text{Ar}$). Estos resultados indican que las condiciones de hipercapnia alta estarían bajo el nivel 1 de disolución lo cual implica una disolución del sistema de carbonatos. Estos niveles se trabajaron de manera similar como se ha realizado en otros estudios en el campo de la acidificación oceánica en los que exponen a niveles de hipercapnia y la saturación de ΩCa y ΩAr se disminuye (Zhan et al., 2018; Zhan et al., 2016a).

La supervivencia de los individuos a 0,5 hpf fue significativamente igual entre los grupos experimentales, manteniendo poblaciones similares. Sin embargo, a las 50 hpf se aprecia una reducción de la supervivencia en: control ($68,15 \pm 6,12$); hipercapnia moderada ($46,04 \pm 8,08$) e hipercapnia alta ($43,58 \pm 2,81$). En nuestro estudio la supervivencia de larvas de cuatro brazos en hipercapnia alta se redujo significativamente cuando se comparó con el control. Los porcentajes de supervivencia en los tres niveles fueron: control ($68,15 \pm 6,12\%$); hipercapnia moderada ($46,04 \pm 8,08\%$); hipercapnia alta ($43,58 \pm 2,81\%$). Estos porcentajes de supervivencia están en concordancia a lo que ha ocurrido en otros estudios. Por ejemplo, la larva de cuatro brazos de la especie *Hemicentrotus pulcherrimus* expuesta a una reducción de pH en 7,55 y a 120 hpf provocó una reducción de su supervivencia en ($50,33 \pm 13,58 \%$) comparada con el control ($91,11 \pm 1,84 \%$) en un pH de 8,06 (Zhan, et al., 2016a). Asimismo las larvas de cuatro brazos de la especie *Strongylocentrotus intermedius* en un pH de 7,51 a 70 hpf resultó en una reducción de la supervivencia menor al 40% comparada con el control que fue mayor al 75% en un pH de 8,00 (Zhan, et al., 2016b). Lo mismo ocurre con la larva de cuatro brazos de *Glyptocidaris crenularis* que en un pH de 7,48 a las 96 hpf tuvo una disminución de la supervivencia menor al 40% comparada con el control que fue mayor al 75% en un pH de 8,00 (Zhan, et al., 2016b).

Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

supervivencia en ($39.22 \pm 0.51\%$) comparado con el control ($87,89 \pm 5,40\%$) en un pH de 7,98 (Zhan et al., 2018a). Por otro lado, en otro estudio con larvas de la especie *Parecentrotus lividus* no encontraron una disminución en la supervivencia en una exposición de gradientes de pH de 7,9 a 7,6 a 69 hpf comparado con el pH control 8,1 (Martin et al., 2011). De la misma manera, reportaron que la supervivencia de las larvas de cuatro brazos de las especies *Tripneustes gratilla* 96 hpf, *Evechinus chloroticus* 312 hpf, *Pseudechinus huttoni*, 216 hpf, y *Sterechinus neumayeri* 168 hpf no tuvieron disminución en la supervivencia en un gradiente de pH de 7,8 a 7,00 comparando con el control 8,00 – 8,20 manteniendo una supervivencia superior al 52%, solo *T. gratilla* tuvo una disminución en la supervivencia en un pH de 7,00 (Clark et al., 2009). Los efectos de la disminución de la supervivencia podrían atribuirse al acortamiento de los brazos y la corrosión de las espículas causadas por la reducción del pH. El efecto negativo de la baja supervivencia podría estar asociado al coste de mantenimiento energético y descalcificación causada por la disminución del pH (Hu & Stumpp, 2023; Zhan et al., 2016b).

Las medidas morfométricas de las larvas tuvieron variación dependiendo del grupo, encontrando diferencias en la longitud total del brazo dependiente del tiempo, reducción de la longitud del cuerpo, igual proporción del brazo largo/brazo corto y diferente proporción de brazo largo/cuerpo. En cuanto a longitud total del brazo en un estudio con las especies *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Echinometra mathei* detectaron diferencias de la longitud total del brazo entre un pH de 7,6; 7,4 y 7,0 a 72 hpf (Kurihara & Shirayama, 2004). En la especie *Sterechinus neumayeri* también fue afectada la longitud de los brazos post-orales (μm) a un pH de 7,8 y 7,6 a los 21 días post fertilización (Byrne et al., 2013a). La especie *Tripneustes gratilla* tuvo brazos post-orales (μm) más cortos a un pH de 7,8 y 7,6 a las 96 hpf (Sheppard-Brennand et al., 2010). Por otro lado *Strongylocentrotus intermedius* presentó una menor longitud de los brazos post-orales (μm) en un pH de 7,71; 7,60 y 7,51 a 70 hpf (Zhan et al., 2016). Asimismo, en la especie *Paracentrotus lividus* detectaron una reducción de la longitud total del brazo (μm) a un pH de 7,5, 7,25 y 7,00 a las 46 y 69 hpf (Martin et al., 2011). Estos resultados concuerdan con los que

obtuvimos en nuestro estudio (Fig. 4). Si bien no se detectaron diferencias entre un pH 7,89 y 7,45 a las 24 hpf es posible que sea porque a este tiempo el crecimiento de los brazos posteriores no es significativo. Por lo que las diferencias pueden ser notables mientras continúe el desarrollo bajo condiciones de hipercapnia.

La longitud del cuerpo a las 50 hpf en hipercapnia alta fue significativamente menor en comparación con el control y la hipercapnia moderada (Fig. 5). Por esto en el pH de 7,1 además de haber un retraso en el crecimiento hubo un retraso en el desarrollo. Comparable al retraso en el crecimiento y desarrollo que obtuvieron con las larvas de *Paracentrotus lividus* (Martin et al., 2011).

La proporción de brazo largo/brazo corto de las larvas de cuatro brazos no se afectó negativamente en ninguno de los tiempos y tratamientos probados en este estudio (Fig. 6). Por lo que podemos indicar que las larvas de *E. vanbrunti* no presentan una asimetría entre los brazos a las 24 y 50 hpf. Acorde a lo reportado con la especie *Tripneustes gratilla* en un pH de 7,6 y 7,8 (Sheppard-Brennand et al., 2010). Incluso las larvas de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* no presentó asimetrías en un pH de 7,7 realizando muestreos diarios durante 21 días (Stump et al., 2011). Sin embargo las larvas de la especie *Paracentrotus lividus* en un pH de 7,25 y 7,00 tuvieron brazos asimétricos pero en pHs mayores a 7,5 no se encontraron diferencias (Martin et al., 2011). Por otra parte las larvas de la especie *Strongylocentrotus intermedius* presentaron variación en la proporción de asimetrías, teniendo efectos significativos en un pH de 7,51 comparado con el control (Zhan et al., 2016b). La proporción de brazo largo/cuerpo fue significativamente menor en hipercapnia moderada y alta, comparado con el control (Fig. 7). Por lo que se evidencia un acortamiento de los brazos en los dos tratamientos. Similar a los resultados obtenidos en un pH de 8,1 y un tratamiento de 7,5 con larvas de la especie *Paracentrotus lividus* (Martin et al., 2011). Se cree que el efecto de un retraso en el crecimiento y desarrollo es por el esfuerzo energético que tienen que realizar las larvas para compensar el

estrés causado por el CO₂. Las células mesenquimales primarias involucradas en la esqueletogénesis, se ven afectadas por la poca regulación que tiene la cavidad del cuerpo de la larva (Hu & Stumpp, 2023). Por esto su regulación acido-base extra e intra celular se ve alterada en condiciones de hipercapnia.

Anteriormente se ha especulado que el acortamiento de los brazos tendría efectos en la natación de las larvas. Inicialmente se reportó la disminución de la natación en un dólar de mar en condiciones de hipercapnia (Chan et al., 2011). Pero otros estudios reportaron que no se había perdido la velocidad en la natación, incluso para larvas con retraso en el crecimiento (Chan et al., 2015, 2016). Otro efecto que se especula que puede ser afectado es la alimentación ya que las bandas ciliares que tienen las larvas, además de estar involucradas en la natación también están involucradas en la alimentación (Hart & Strathmann, 1994; Strathmann et al., 1992). Por otro lado, han encontrado que la digestión se ve afectada por el incremento de la hipercapnia (Stumpp et al., 2013). Hasta nuestro conocimiento no se ha reportado un estudio de efectos en la depredación de las larvas sin embargo una reducción de tamaño podría hacerlos sensibles ante predadores (Allen, 2008). También se ha reportado que la exposición continua a condiciones de hipercapnia tiene efectos en el reclutamiento de la población (Dorey et al., 2022).

Los resultados presentados en este estudio indican que las condiciones de hipercapnia tendrían un impacto significativo tanto en la supervivencia como en el crecimiento de las larvas de erizo de *E. vanbrunti* a las 50 hpf. Si bien los valores de pH definidos en el laboratorio se mantienen en rangos estables, no es lo que sucede en el ambiente natural en donde las variaciones de pH son mayores incluso en zonas intermareales. La diferencia de esta variabilidad podría tener también un impacto en el desarrollo y la supervivencia de los organismos, pero en este estudio no se evaluó esto ya que el objetivo del estudio fue analizar como los valores fijos de pH podrían tener una influencia en el desarrollo de este erizo. Cabe destacar además que esta es una información novedosa, ya que es la primera vez que se realiza un estudio con larvas de *E. vanbrunti* expuestas a condiciones de hipercapnia. De igual manera la información

presentada necesita ser complementada con otros estudios que apliquen distintos niveles de pH, con exposiciones a largo plazo y contemplando múltiples estresores, para aproximarse a un escenario real de lo que les sucedería a *E. vanbrunti* en un océano futuro.

CONCLUSIÓN

La etapa larvaria de *Echinometra vanbrunti* es afectada negativamente por el aumento de la hipercapnia teniendo sus principales efectos a las 50 hpf. Las larvas en hipercapnia alta en un pH de 7,1 presentaron afectaciones en la supervivencia, retraso del crecimiento, desarrollo y disminución de la tasa de ΩCa y ΩAr . Por su parte las larvas en la hipercapnia moderada a un pH de 7,4 no presentaron efectos en la mortalidad, pero sí tuvieron un retraso en el crecimiento. Pese a las alteraciones en el crecimiento, ninguna de las hipercapnias tuvo influencia en la asimetría de brazos. Esta afectación podría hacer vulnerable a las larvas de *E. vanbrunti* pudiendo tener repercusión en el éxito de sus poblaciones. Es necesario hacer otros estudios que involucren otros niveles de pHs, con exposiciones a largo plazo y contemplando otros estresores para aproximarse a un escenario real de lo que le podría pasar a *E. vanbrunti* en un océano futuro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Francisco Navarrete-Mier, Ph.D. y Patricia Castillo-Briceño Ph.D. por su tiempo, guía científica y apoyo durante el desarrollo de este estudio. Jennifer Mera Artega y Roddy M. Castro Morán por su apoyo durante el tiempo de desarrollo de este estudio. Al Blgo. Jorge Mera y LARDEMA S.A. por donarnos el agua de mar filtrada para pruebas previas y en la fase experimental. A Dumar Matamoros Pluas por prestarme su teléfono móvil para realizar el registro fotográfico. A Jean Delgado Mero y Nayit Ortega López por su ayuda durante la recolección y movilización de los individuos al laboratorio Bioma Ecuatorial y Acidificación

Oceánica. Al Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica por expedir la autorización de recolección de los especímenes (MAATE-ARSFC-2024-0518).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, J. D. (2008). Size-specific predation on marine invertebrate larvae. *The Biological Bulletin*, 214(1), 42-49. <https://doi.org/10.2307/25066658>
- Byrne, M., & Hernández, J. C. (2020). Sea urchins in a high CO₂ world: Impacts of climate warming and ocean acidification across life history stages. En J. M. Lawrence (Ed.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 43, pp. 281-297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00016-0>
- Byrne, M., Ho, M. A., Koleits, L., Price, C., King, C. K., Virtue, P., Tilbrook, B., & Lamare, M. (2013a). Vulnerability of the calcifying larval stage of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* to near-future ocean acidification and warming. *Global Change Biology*, 19(7), 2264-2275. <https://doi.org/10.1111/gcb.12190>
- Byrne, M., Lamare, M., Winter, D., Dworjanyn, S. A., & Uthicke, S. (2013b). The stunting effect of a high CO₂ ocean on calcification and development in sea urchin larvae, a synthesis from the tropics to the poles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1627), 20120439. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0439>
- Cárdenas-Calle, M., Mora, E., Torres, G., Pérez-Correa, J., Bigatti, G., Signorelli, J., & Coronel, J. (2020). *Biodiversity Data Journal*, 8, e53818. <https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e53818>
- Chan, K. Y. K., García, E., & Dupont, S. (2015). Acidification reduced growth rate but not swimming speed of larval sea urchins. *Scientific Reports*, 5(1), 9764. <https://doi.org/10.1038/srep09764>
- Chan, K. Y. K., Grünbaum, D., Arnberg, M., & Dupont, S. (2016). Impacts of ocean acidification on survival, growth, and swimming behaviours differ between larval urchins and brittlestars. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3), 951-961. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv073>

- Chan, K. Y. K., Grünbaum, D., & O'Donnell, M. J. (2011). Effects of ocean-acidification-induced morphological changes on larval swimming and feeding. *Journal of Experimental Biology*, *214*(22), 3857-3867. <https://doi.org/10.1242/jeb.054809>
- Clark, D., Lamare, M., & Barker, M. (2009). Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Marine Biology*, *156*(6), 1125-1137. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1155-8>
- Dickson, A. G. (1990). Thermodynamics of the dissociation of boric acid in synthetic seawater from 273.15 to 318.15 K. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, *37*(5), 755-766. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(90\)90004-F](https://doi.org/10.1016/0198-0149(90)90004-F)
- Doney, S. C., Busch, D. S., Cooley, S. R., & Kroeker, K. J. (2020). The Impacts of Ocean Acidification on Marine Ecosystems and Reliant Human Communities. *Annual Review of Environment and Resources*, *45*(1), 83-112. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-012320-083019>
- Dorey, N., Butera, E., Espinel-Velasco, N., & Dupont, S. (2022). Direct and latent effects of ocean acidification on the transition of a sea urchin from planktonic larva to benthic juvenile. *Scientific Reports*, *12*(1), 5557. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09537-7>
- Ettensohn, C. A. (2017). Sea Urchins as a Model System for Studying Embryonic Development. En *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99509-6>
- Findlay, H. S., & Turley, C. (2021). Chapter 13—Ocean acidification and climate change. En T. M. Letcher (Ed.), *Climate Change (Third Edition)* (pp. 251-279). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821575-3.00013-X>
- Foltz, K. R., Adams, N. L., & Runft, L. L. (2004). Echinoderm Eggs and Embryos: Procurement and Culture. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 74, pp. 39-74). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)74003-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)74003-0)

- Foo, S. A., Koweek, D. A., Munari, M., Gambi, M. C., Byrne, M., & Caldeira, K. (2020). Responses of sea urchin larvae to field and laboratory acidification. *Science of The Total Environment*, 723, 138003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138003>
- Galarza Verkovich, C. D. (2014). *Modularidad y heterocronía en dos eventos del desarrollo embrionario de dos especies de erizo de mar (familia: Echinometridae) con desarrollo planctotrófico y diferente tamaño de huevo*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/handle/22000/11807>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-9.
- Hart, M. W., & Strathmann, R. R. (1994). Functional Consequences of Phenotypic Plasticity in Echinoid Larvae. *The Biological Bulletin*, 186(3), 291-299. <https://doi.org/10.2307/1542275>
- Hu, M. Y., & Stumpp, M. (2023). Surviving in an Acidifying Ocean: Acid-Base Physiology and Energetics of the Sea Urchin Larva. *Physiology*, 38(5), 242-252. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2023>
- Kapsenberg, L., Okamoto, D. K., Dutton, J. M., & Hofmann, G. E. (2017). Sensitivity of sea urchin fertilization to pH varies across a natural pH mosaic. *Ecology and Evolution*, 7(6), 1737-1750. <https://doi.org/10.1002/ece3.2776>
- Kurihara, H., & Shirayama, Y. (2004). Effects of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development. *Marine Ecology Progress Series*, 274, 161-169. <https://doi.org/10.3354/meps274161>
- Lawrence, J. M. (2020). *Sea urchins: Biology and ecology* (4th ed). Academic press.
- Li, Y., Yin, W., Zhan, Y., Jia, Y., Cui, D., Zhang, W., & Chang, Y. (2020). Comparative metabolome analysis provides new insights into increased larval mortality under seawater acidification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Science of The Total Environment*, 747, 141206. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141206>
- Lueker, T. J., Dickson, A. G., & Keeling, C. D. (2000). Ocean pCO₂ calculated from dissolved inorganic carbon, alkalinity, and equations for K₁ and K₂: Validation based on laboratory measurements of
- Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

- CO₂ in gas and seawater at equilibrium. *Marine Chemistry*, 70(1), 105-119.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(00\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(00)00022-0)
- Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M.-L., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y., Kerros, M.-E., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Jeffree, R., & Gattuso, J.-P. (2011). Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1357-1368. <https://doi.org/10.1242/jeb.051169>
- Navarrete-Mier, F., & Castillo-Briceño, P. (2020). Vulnerabilidad de los recursos marinos en Ecuador frente a escenarios de cambio climático. *Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y Acuicultura*, 9, 42-55.
- Pontheaux, F., Roch, F., Morales, J., & Cormier, P. (2021). Echinoderms: Focus on the Sea Urchin Model in Cellular and Developmental Biology. En *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*. CRC Press.
- Sangil, C., & Guzman, H. M. (2016). Assessing the herbivore role of the sea-urchin *Echinometra viridis*: Keys to determine the structure of communities in disturbed coral reefs. *Marine Environmental Research*, 120, 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.08.008>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sheppard-Brennand, H., Soars, N., Dworjanyan, S. A., Davis, A. R., & Byrne, M. (2010). Impact of Ocean Warming and Ocean Acidification on Larval Development and Calcification in the Sea Urchin *Tripneustes gratilla*. *PLOS ONE*, 5(6), e11372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011372>
- Sonnenholzner, J., Brandt, M., Francisco, V., Hearn, A., Luzuriaga, M., Guarderas, P., & Navarro, J. C. (2013). Echinoderms of Ecuador. En J. J. Alvarado & F. A. Solis-Marin (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America* (pp. 183-233). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-20051-9_6
- Sonnenholzner-Varas, J. I., Touron, N., & Orrala, M. M. P. (2018). Breeding, larval development, and growth of juveniles of the edible sea urchin *Tripneustes depressus*: A new target species for
- Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

- aquaculture in Ecuador. *Aquaculture*, 496, 134-145.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.019>
- Stefansson, G., Kristinsson, H., Ziemer, N., Hannon, C., & James, P. (2017). *Markets for Sea Urchins: A Review of Global Supply and Markets*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12657.99683>
- Strathmann, R. R., Fenaux, L., & Strathmann, M. F. (1992). HETEROCHRONIC DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN LARVAL SEA URCHINS AND ITS IMPLICATIONS FOR EVOLUTION OF NONFEEDING LARVAE. *Evolution*, 46(4), 972-986. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1992.tb00613.x>
- Stumpp, M., Hu, M., Casties, I., Saborowski, R., Bleich, M., Melzner, F., & Dupont, S. (2013). Digestion in sea urchin larvae impaired under ocean acidification. *Nature Climate Change*, 3(12), 1044-1049. <https://doi.org/10.1038/nclimate2028>
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M. C., & Dupont, S. T. (2011). CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(3), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.022>
- Tans, P., & Keeling, R. (2024). *Trends in atmospheric carbon dioxide*. NOAA Global Monitoring Laboratory and Scripps Institution of Oceanography.
- Yoro, K. O., & Daramola, M. O. (2020). CO₂ emission sources, greenhouse gases, and the global warming effect. In *Advances in Carbon Capture* (pp. 3-28). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00001-3>
- Zhan, Y., Hu, W., Duan, L., Liu, M., Zhang, W., Chang, Y., & Li, C. (2016a). Effects of seawater acidification on early development of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Aquaculture International*, 25(2), 655-678. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0064-3>
- Zhan, Y., Hu, W., Duan, L., Liu, M., Zhang, W., Chang, Y., & Li, C. (2018). Effects of seawater acidification on the early development of sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(4), 1442-1454. <https://doi.org/10.1007/s00343-018-6317-4>
- Contenido exclusivo para presentación como Trabajo de titulación de Tercer Nivel. Carrera de Biología. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías. Grupo de Investigación EBIOAC-ULEAM. Modalidad: Artículo Académico. Estudiante: José Antonio Luque Mora. Tutoría: Dr. Francisco Navarrete-Mier, Asesoría: Dra. Patricia Castillo-Briceño. La información incluida en este documento solo podrá ser publicada y/o difundida bajo expresa autorización de l@s director@s del Grupo EBIOAC.

Zhan, Y., Hu, W., Zhang, W., Liu, M., Duan, L., Huang, X., Chang, Y., & Li, C. (2016b). The impact of CO₂-driven ocean acidification on early development and calcification in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1-2), 291-302.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.003>