



FACULTAD DE LA VIDA Y TECNOLOGÍAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Modalidad Artículo Académico

Tema:

Caracterización de la variabilidad diaria de parámetros químicos del agua en el desarrollo de procesos de larvicultura de camarón (*Penaeus vannamei*).

Autores:

Briones Espinoza María José

Mogro Mendoza Mauricio Javier

Periodo 2022 – 2

Tutores:

Patricia Castillo Briceño, Francisco Navarrete Mier

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD DIARIA DE PARÁMETROS QUÍMICOS DEL AGUA EN EL DESARROLLO DE PROCESOS DE LARVICULTURA DE CAMARÓN (*Penaeus vannamei*)

Briones Espinoza María José^a, Mogro Mendoza Mauricio Javier^b, Castillo Briceño Patricia^c, Navarrete Mier Francisco^d

Grupo de Investigación EBIOAC, Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí

Correo institucional: ^a e1312817677@live.uleam.edu.ec, ^b e1719785923@live.uleam.edu.ec, ^c patricia.castillo@uleam.edu.ec, ^d francisco.navarrete@uleam.edu.ec

RESUMEN

Actualmente, los niveles de CO₂ atmosférico son los más altos que han existido en los últimos 800,000 años. A medida que la concentración de este gas continúa aumentando, la acidificación del océano se convierte en un problema cada vez más preocupante y urgente. Ecuador es el principal productor de camarones en América Latina, y esta industria representa la segunda fuente de ingresos más importante después del petróleo. La trayectoria del país en la producción de acuicultura está bien establecida, lo que ha desarrollado protocolos eficientes. Sin embargo, los efectos que la acidificación del océano tendrá en este sector a corto y largo plazo aún son desconocidos. Este estudio se desarrolló con el objetivo de analizar las fluctuaciones diarias en los parámetros químicos asociados con la acidificación del océano en el cultivo de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*), como una herramienta básica para comprender el estado actual de gestión en este sector de la acuicultura. Encontramos que a lo largo del día el pH en zoea y mysis presenta sus medias más bajas a las 16h00 (7.77 y 7.78) y las más altas a las 8h00 (7.79) mientras que en postlarva la variación diaria no presentó diferencias significativas; la temperatura presentó diferencias significativas en zoea y mysis donde sus medias más bajas fueron a las 8h00 (34.36 y 34.27) y las más altas a las 16h00 (35.03 y 34.94), la salinidad no mostró diferencias significativas a lo largo del día en ninguno de los estadios y el oxígeno solo presentó diferencias significativas en la variabilidad diaria de mysis con sus medias más bajas a las 20h00 y 24h00 (3.79) y sus más altas a las 12h00 (4.12).

Además, se encontró que el pH permaneció estable (7.82 ± 0.07) durante todo el ciclo de cultivo; sin embargo, la alcalinidad total (AT) aumentó progresivamente desde $2458,75 \pm 203,43$ unidades en presiembrá hasta $3663,25 \pm 123,97$ unidades en la etapa de postlarvas. Este aumento de la AT estaría relacionado debido al manejo de procesos de equilibrio iónico que se llevan a cabo a lo largo del cultivo. Además pese a que los niveles de pCO_2 llegaron a $1152,35 \pm 415,38$, las formas biocompatibles de carbonato de calcio (calcita y aragonita) se mantuvieron dentro de rangos aptos para el desarrollo de los organismos.

Palabras clave: Acidificación oceánica, balance iónico, producción acuícola

Characterization of the daily variability of water chemical parameters in the development of shrimp (*Penaeus vanamei*) larviculture processes.

ABSTRACT

Currently, atmospheric CO_2 levels are the highest they have been in the past 800,000 years. As the concentration of this gas continues to increase, ocean acidification becomes an increasingly urgent and concerning problem. Ecuador is the leading producer of shrimp in Latin America, and this industry represents the second most important source of income after oil. The country's trajectory in aquaculture production is well-established, which has developed efficient protocols. However, the effects that ocean acidification will have on this sector in the short and long term are still unknown. This study was developed with the objective of analyzing daily fluctuations in the chemical parameters associated with ocean acidification in the cultivation of shrimp larvae (*Penaeus vannamei*), as a basic tool to understand the current state of management in this sector of aquaculture. We found that throughout the day, pH in zoea and mysis presents its lowest averages at 4:00 PM (7.77 and 7.78) and the highest at 8:00 AM (7.79), while in postlarvae, daily variation did not show significant differences; temperature showed significant differences in zoea and mysis, where their lowest averages were at 8:00 AM (34.36 and 34.27) and the highest at 4:00 PM (35.03 and

34.94), salinity did not show significant differences throughout the day in any of the stages, and oxygen only presented significant differences in the daily variability of mysis with its lowest averages at 8:00 PM and 12:00 AM (3.79) and its highest at 12:00 PM (4.12).

Additionally, it was found that pH remained stable (7.82 ± 0.07) throughout the cultivation cycle; however, total alkalinity (AT) progressively increased from 2458.75 ± 203.43 units in pre-seeding to 3663.25 ± 123.97 units in the post-larval stage. This increase in AT would be related to the management of ion equilibrium processes that take place throughout the cultivation. Additionally, despite pCO₂ levels reaching 1152.35 ± 415.38 , the biocompatible forms of calcium carbonate (calcite and aragonite) remained within suitable ranges for the development of organisms.

Palabras clave: Ocean acidification, alkalization, aquaculture production

1. INTRODUCCIÓN

El secuestro de carbono es uno de los servicios que brinda el océano para la regulación climática, absorbiendo aproximadamente 1/3 de las emisiones atmosféricas anuales de dióxido de carbono (CO_2), amortiguando así los efectos climáticos del aumento de los niveles de este gas a partir de la revolución industrial (Hopkins et al., 2020; Reid et al., 2009). El CO_2 es absorbido por los océanos y reacciona con el agua formando ácido carbónico del que se libera un ion Hidrógeno (H^+) y un ion bicarbonato que al disociarse libera otro H^+ y un ion carbonato aumentando así la concentración de H^+ en el océano disminuyendo su pH (Hilmi et al., 2015), a este proceso se lo conoce como acidificación oceánica (AO), efecto que es impulsado por el aumento de emisiones de CO_2 atmosférico que conlleva al océano a absorber mayores cantidades de este gas de forma más acelerada (Falkenberg et al., 2020; Hopkins et al., 2020)

Los iones de H^+ en exceso reaccionarán posteriormente con iones carbonato, lo que disminuirá la disponibilidad de estos para los organismos calcificadores que utilizan estos iones para biomineralizar CaCO_3 en sus formas biocompatibles como aragonita y calcita para construir sus esqueletos (Gilbert et al., 2022; Hilmi et al., 2015).

La AO es un problema creciente y actualmente los niveles de CO_2 atmosférico son los más elevados de los últimos 800 000 años y mantienen la tendencia al aumento (Lüthi et al., 2008), A medida que la concentración de CO_2 en la atmósfera sigue aumentando, la acidificación del océano se convierte en un problema cada vez más urgente y preocupante (Caldeira & Wickett, 2003), debido a que traerá consigo efectos negativos en la estabilidad de las relaciones tróficas (Hancock et al., 2020; Rockström et al., 2009) derivarán en problemas socioeconómicos, dentro de los cuales se estima que la pesca y la acuicultura serán de los sectores más afectados (Hilmi et al., 2015).

Las afectaciones por la acidificación oceánica son visibles en las diversas escalas biológicas, desde los cocolitofóridos (Kottmeier et al., 2022), arrecifes de coral (Cornwall et al., 2021) y otros organismos calcificadores (Levin et al., 2015) se ven afectados en el desarrollo de su exoesqueleto (Hall et al., 2020), recuperación de heridas (Taylor et al., 2015), procesos

reproductivos (Reuter et al., 2011), disminución de la diversidad (Busch & McElhany, 2016) y alteraciones en la composición taxonómica en las zonas costeras (Fabricius et al., 2014). Adicional a esto ante agravantes como la baja disponibilidad de oxígeno, la AO puede afectar a los genes reguladores del consumo de oxígeno (Hannan et al., 2020). En gasterópodos como *Limacina helicina* organismos calcificantes que ante la baja disponibilidad de aragonita limitan la calcificación, debido a restricciones fisiológicas y energéticas que suceden en respuesta al estrés ambiental (Bednaršek et al., 2017).

Aun así, el impacto de la AO varía entre especies y estados de desarrollo, sin embargo, en general se estima un impacto negativo en la mayoría de especies de animales marinos. Por ejemplo: Organismos calcificadores como los cocolitofóridos se ven afectados en el desarrollo de sus cocolitos impidiendo la formación de estos escudos que los aíslan del medio y la formación de los conductos que regulan la homeostasis de hidrógeno en la célula (Kottmeier et al., 2022); las algas *Hydrolithon reinboldii* y corales calcificantes *Goniopora sp.* organismos de diferentes taxones no incrementan su tolerancia a los efectos de AO aunque hayan sido expuestos a mayor variabilidad de pH durante su desarrollo (Cornwall et al., 2018); en peces, así como otros taxones, tienen respuestas especie-específica ante AO, como en el caso de *Menidia beryllina* que presentan reducción en su tasa de crecimiento y supervivencia (Baumann et al., 2012) mientras que en *Leuresthes tenuis* la tasa de crecimiento no se redujo significativamente y mostraron mayor tolerancia a niveles elevados de $p\text{CO}_2$ (Tasoff & Johnson, 2018).

También, los estadios larvales de equinodermos *Evechinus chloroticus* en pH menor a 7.7 se registran retrasos de crecimiento de 5%, efecto que es más marcado conforme el pH desciende llegando a tener un efecto del 12% en pH de 7.5 (Sewell et al., 2021)

Pese a los avances en el estudio del impacto de la AO en diversos taxones, en crustáceos es aún un campo en desarrollo. De todas formas se ha reportado que los crustáceos en diversas etapas larvares tienen diferentes requerimientos de mineralización del caprazón y tolerancia de $p\text{CO}_2$ en el medio en el que se desarrollan, efecto que actúa de manera independiente en cada estadio larval y que puede disminuir la supervivencia conforme el $p\text{CO}_2$ aumenta (Noisette et al., 2021). Otro caso donde se ve afectada la biomineralización es en el cangrejo buey de mar

(*Metacarcinus magister*) donde se ha visto que la vulnerabilidad de disolución de su caparazón aumenta en ambientes con pH reducidos (Bednaršek et al., 2020). Por otro lado también se conoce que especímenes de cangrejo Bairdi (*Chionoecetes bairdi*) sometidos a condiciones de AO demandan más energía en los procesos de homeostasis impidiendo su desarrollo de exoesqueleto y funciones reproductivas (Meseck et al., 2016).

En el caso del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), aunque es la especie de crustáceo más cultivada a nivel mundial, los estudios sobre el impacto de AO son aún muy limitados. Aunque a la fecha ya se han reportado afecciones fisiológicas a nivel de sistema inmunitario como fallas en el reconocimiento de patógenos y en procesos de regulación en la expresión de vías de inmunidad innata, además se sabe que generan alteraciones negativas en la composición de la microbiota intestinal, lo que sugiere que a exposiciones prolongadas a pH reducido podría incluso afectar a la tasa del crecimiento de los organismos (Yu et al., 2020).

Para Ecuador, el cultivo del camarón blanco es clave en su desarrollo económico. Solo en el año 2022, las exportaciones de camarón superaron los \$6.500 millones de dólares, posicionando a este sector productivo como el segundo rubro generador de divisas después del petróleo (*Estadísticas - Cámara Nacional de Acuicultura, 2022; Segovia Larrea, 2020*). La trayectoria del país en producción acuícola se encuentra bien consolidada, lo que ha permitido el desarrollo de protocolos eficientes (Marcillo, 2017). Sin embargo en contexto de cambio climático y AO aún se desconocen en su mayoría los efectos y retos que tendrá que enfrentar el sector acuicultor a corto y largo plazo (Clements & Chopin, 2017), pese a que la susceptibilidad de los organismos de zonas tropicales ante el cambio climático ha sido motivo de gran preocupación científica.

El monitoreo local de los océanos es una pieza clave para comenzar a gestionar la mitigación de los efectos de la AO en sistemas de producción e impulsar acciones de adaptación que permitan la continuidad de los sistemas de producción. Asimismo nos permite mejorar la comprensión alrededor de las interacciones entre el océano y la sociedad (Falkenberg et al., 2020). La necesidad de estudiar los efectos de esta problemática en especies con alta importancia económica es imperativa, sin embargo, aún son escasos los estudios nacionales orientados al

monitoreo de parámetros relacionados a la AO que permitirán estimar su potencial impacto y diseñar estrategias de mitigación a fin de aumentar la capacidad de resiliencia de este sector acuicultor frente a cambio climático (Castillo-Briceno & Navarrete-Mier, 2015).

El presente estudio ha sido desarrollado con el objetivo de analizar las fluctuaciones diarias en los parámetros químicos asociados a la AO el cultivo de larvas de camarón (*Penaeus vannamei*), como una herramienta base para entender el estado actual del manejo de este sector acuícola, promoviendo investigaciones que nos permitan prever potenciales riesgos asociados a la AO.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de monitoreo

El presente estudio se llevó a cabo en un laboratorio de producción de larvas de camarón, ubicado cerca de Puerto Cayo (1°18'30" S 80°45'45" W), parroquia perteneciente al Cantón Jipijapa. Esta infraestructura está permanentemente activa y cuenta con 12 tanques divididos en dos sistemas de producción independientes. Esta instalación de cultivo y produce de 24 a 27 millones de larvas por corrida.

Se escogió trabajar en esta instalación en Puerto Cayo debido a que es un área con poco desarrollo de actividad acuícola y urbana que suponen mejor calidad del agua; en contraste con otras ciudades como Manta donde también se desarrolla este sector.



Figura 1: Ubicación del laboratorio donde se realizó la toma de datos en Puerto Cayo

Toma de datos

La toma de datos en campo se desarrolló del 16 de septiembre de 2022 al 21 de enero de 2022

con un total de 12 monitoreos de 24 horas correspondientes a 3 diferentes siembras, donde se colectaron datos cada 4 horas a lo largo del día (04h00, 08h00, 12h00, 16Hh0, 20h00, 24h00) obteniéndose 3 monitoreos de 24 horas por cada estadio en estudio incluyendo los estaques previos a la siembra. Realizando un total de 288 horas de trabajo en campo.

Se monitorearon los estanques de cultivo en diferentes estadios larvales (zoea 2-3, mysis 2-3 y postlarva 4-5), además de los estanques preparados sin organismos el día previo a la siembra y reservorios de agua con agua de mar recirculada y filtrada, cultivo de microalgas y agua de pozo utilizadas en el cultivo.

Se tomaron dos muestras en puntos distantes de cada estanque y se registraron datos de pH (en escala NBS) , mg/L de oxígeno disuelto y saturación de oxígeno, salinidad y temperatura con un Multipárametros HI 9829 (Hanna Instruments), además se midió pH en escala total y temperatura con el potenciómetro OriónStar A211 (ThermoScientific) equipado con el electrodo Ross-Ultra 8102BNUWP (Thermoscientific) que posee una resolución de 0.001, calibrado mediante buffer Tris (Batch #24) certificado por Dickson's Lab.

Para el registro de datos *in situ* se contó con un área de laboratorio donde se mantuvieron los equipos durante la toma de datos y se llevaron las muestras recolectadas de cada tanque, para el caso de los que estanques con organismos vivos las muestras se manejaron una a la vez para que los tiempos de espera entre lecturas hasta que los equipos se estabilicen_ sean semejantes. Los recipientes donde se transportaron las muestras hacia el área de toma de datos fueron enjuagados con agua filtrada antes de cambiar de estanque para evitar contaminación cruzada, y homogenizados con la misma agua del estanque antes de tomar la muestra, se mantuvo al mismo investigador para la medición y anotación de datos durante las 24 horas con el fin de evitar el sesgo por investigador.

Al inicio de cada monitoreo de 24 horas se calibró el Multiparámetros usando la solución de calibración rápida QuickCal Hi9828-0 y/o los buffers para pH de 4, 7 y 10. Para medir pH en escala total se usó el potenciómetro Orion Star, se colocó el electrodo dentro del Tris y se

tomaron pareados los datos de milivoltaje y temperatura (°C) a medida que se le incrementó la temperatura a la solución hasta acercarse a valores similares a los que tuvieron los estanques medidos. Con los datos recolectados se generó una regresión con la que posteriormente se calculó el valor de pH en escala total. Este equipo se calibró antes de iniciar cada toma de datos en las diferentes franjas horarias monitoreadas (6 veces en total por monitoreo diario).

Recolección de muestras para Alcalinidad Total (AT)

En los dos primeros monitoreos del segundo ciclo de siembra se tomaron muestras en todas las franjas horarias donde se realizaban mediciones, posterior a eso se tomaron muestras a las 20h00 y a las 08h00. Se recolectó agua de mar sin tratar, agua de mar filtrada y agua de 3 estanques de siembra, las muestras se recolectaron en botellas plásticas transparentes y fueron filtradas *in situ* mediante una red de 0,5 mm de abertura de malla y posteriormente por papel filtro. Las muestras fueron fijadas con cloruro de mercurio al llegar al laboratorio de EBIOAC.

Análisis de alcalinidad

Se hicieron dos lecturas por cada botella de muestra. Para cada medición se utilizaron 50 ml de muestra y se tituló utilizando el pH Titrator OrionStar T910 (ThermoScientific) con ácido clorhídrico 0.1N ajustado a salinidad del mar y certificado por Dickson's Lab y equipado con el electrodo Ross-Ultra. Como material de referencia para las mediciones se utilizó el Batch #154 para mediciones oceánicas de Dickson's Lab (anexo 1).

Los datos obtenidos mediante el análisis de AT junto con los recolectados *in situ* se procesaron en el software CO2SYS (Pierrot et al., 2006) ajustado con las constantes de disociación de Lueker (Lueker et al., 2000), y para el KHSO_4 , la constante de disociación de Dickson (Dickson, 2002), y seleccionado en escala total para la obtención de los valores de estado de saturación de aragonita (Ω_{Ar}) y calcita (Ω_{Ca})

Análisis estadístico

A todos los datos obtenidos se les aplicaron pruebas de normalidad (histogramas) y de homocedasticidad (Prueba F). Para la obtención de las diferencias entre grupos (horas y

estadios) se aplicó Kruskal Wallis utilizando un nivel de significancia de 0,05; posteriormente para el análisis de correlación entre los parámetros medidos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis de datos se realizó en los programas de Infostat, Excel y SigmaPlot v12.0

3. RESULTADOS

Con los análisis realizados se pudo determinar los parámetros de química de carbonatos relevantes para entender las fluctuaciones diarias y a lo largo de una corrida en un sistema de larvicultura de camarón.

Durante las diferentes etapas planteadas en el estudio se pudo determinar que la variabilidad del pH no varía en promedio más de 0.12 desde presiembra hasta la etapa de postlarva siendo un pH muy estable. Los parámetros como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto que son directamente controlados en los procesos de acuicultura tienen fluctuaciones relativamente bajas y acordes a lo esperado en un sistema de producción intensiva de larvas. Pero con respecto a la AT, se evidencia que cambia de $2458.75 \pm 203.43 \mu\text{m}/\text{kg}$ en presiembra, hasta llegar a valores de $3663.25 \pm 123.97 \mu\text{m}/\text{kg}$; los parámetros calculados como aragonita, calcita y pCO_2 se ven incrementados durante el ciclo (tabla 1).

Tabla 1. Resumen con las medias y desviación estándar de cada uno de los parámetros medidos y calculados (usando CO2SYS) considerados para este estudio para las diferentes etapas de larvicultura.

	PARÁMETROS	PRESIEMBRA	ZOEA	MYSIS	POSTLARVA
MEDIDOS	pH (escala total)	$7,90 \pm 0,08$	$7,78 \pm 0,02$	$7,78 \pm 0,02$	$7,80 \pm 0,03$
	Salinidad (UPS)	$29,61 \pm 1,33$	$29,71 \pm 1,31$	$26,93 \pm 1,01$	$24,31 \pm 4,22$
	Temperatura (°C)	$30,58 \pm 2,89$	$34,66 \pm 0,52$	$34,67 \pm 0,52$	$34,05 \pm 0,90$
	OD (%)	$76,80 \pm 9,88$	$77,38 \pm 12,45$	$66,23 \pm 8,97$	$60,04 \pm 13,93$
	OD (mg/l)	$4,90 \pm 0,57$	$4,61 \pm 0,69$	$4,08 \pm 0,41$	$3,71 \pm 0,81$
	Alcalinidad total ($\mu\text{m}/\text{kg}$)	$2458,75 \pm 203,43$	$2539,73 \pm 119,58$	$3178,50 \pm 303,66$	$3663,25 \pm 123,97$
CALCULADOS	pCO_2 (μatm)	$627,95 \pm 173,83$	$793,83 \pm 233,24$	$1043,23 \pm 314,01$	$1152,35 \pm 415,38$
	ΩCa (μatm)	$4,72 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,28$	$5,4 \pm 0,6$	$5,92 \pm 0,98$
	ΩAr (μatm)	$3,11 \pm 0,23$	$3,06 \pm 0,17$	$3,57 \pm 0,4$	$3,91 \pm 0,7$

En la variabilidad diaria del pH en los diferentes etapas, la presiembra no registra diferencias significativas entre sus mediciones según Kruskal Wallis con un valor de $p > 0.05$ (fig. 3a), en el estadio de zoea los valores reportados para las 16h tiene la media más baja del muestreo y es significativamente diferente a todas las otras horas registradas con excepción de las 12h y 20h, las 8h poseen la media más alta teniendo diferencia significativas con todas la horas medidas

con excepción de las 4h, 12h y 24h, mysis a las 16h registra la media más baja, encontrando diferencias significativas con las 4h y 8h, la medición de las 8h es la más alta de esta serie y es significativamente diferente a todas las otras medidas registradas en este estadio, las 4h es significativamente diferente que las 8h y 16h, la postlarva no registra diferencias significativas en ninguna de las mediciones registradas con un $p>0.05$. (fig. 3 b)

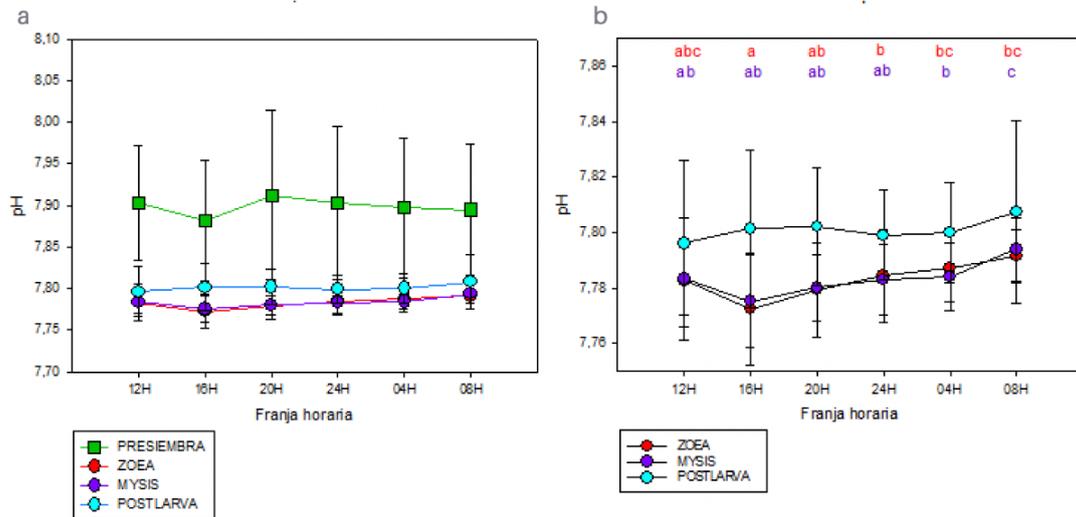


Figura 3 : a) Variabilidad diaria de pH en las diferentes etapas del cultivo b) Variabilidad diaria de pH en los diferentes estadios del cultivo sin los datos de presiembra (para mejor visualización); cada letra coloreada indica grupos estadísticos diferentes dentro del estadio correspondiente al color de la letra y la ausencia de ellas indica que no hay diferencias estadísticamente significativas.

En la variabilidad diaria de temperatura en los diferentes etapas, la presiembra no registra diferencias significativas entre sus mediciones según Kruskal Wallis con un valor de $p>0.05$ (fig. 4a), en el estadio de zoea los valores reportados para las 8h tiene la media más baja del muestreo y es significativamente diferente a todas las otras horas registradas con excepción de las 4h y 24h, las 16h poseen la media más alta teniendo diferencia significativas con todas la horas medidas con excepción de las 20h, a las 12h encontramos diferencias significativas con 8h y 16h, mysis a las 8 horas registra la media más baja encontrando diferencias significativas con todas las medidas registradas en este estadio, la medición de las 16h es la más alta de esta serie y es significativamente diferente a todos las otras medidas registradas con excepción de las 12h y 20h, las 24h y las 4h son significativamente diferente que las 8h y 16h, la postlarva no registra diferencias significativas en ninguna de las mediciones registradas con un $p>0.05$. (fig 4 b).

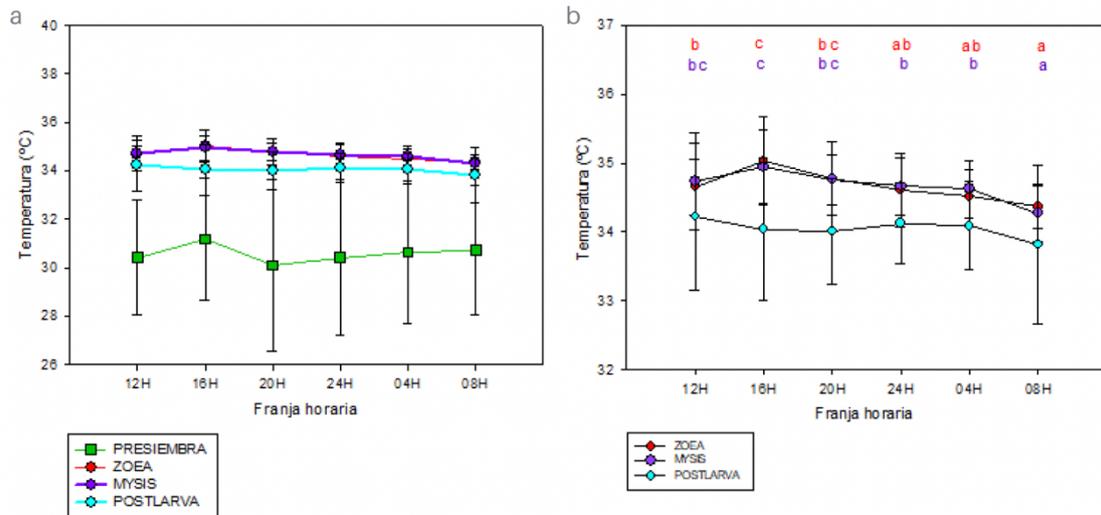


Figura 4 : a) Variabilidad diaria de temperatura en las diferentes etapas del cultivo b) Variabilidad diaria de temperatura en los diferentes estadios del cultivo sin los datos de presiembra (para mejor visualización); cada letra coloreada indica grupos estadísticos diferentes dentro del estadio correspondiente al color de la letra y la ausencia de ellas indica que no hay diferencias estadísticamente significativas.

En la variabilidad diaria de salinidad las diferentes etapas presiembra, zoea, mysis y postlarva no registra diferencias significativas entre sus mediciones diarias según Kruskal Wallis ($p > 0.05$). La salinidad en mysis y en postlarva es menor que en presiembra y zoea debido a que en el laboratorio adicionan agua de mar como parte del protocolo conforme los animales desarrollan (fig. 5).

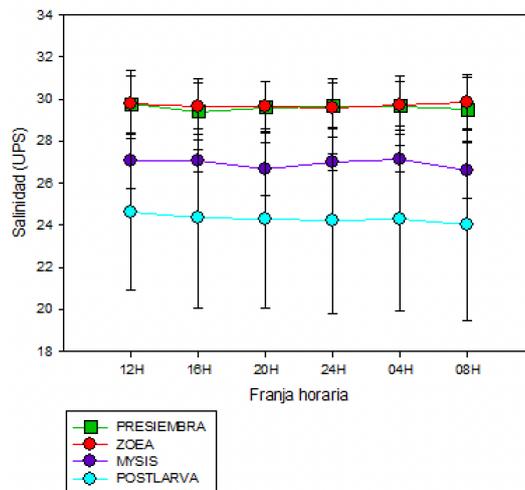


Figura 5: Variabilidad diaria de salinidad en las diferentes etapas del cultivo

En la variabilidad diaria del oxígeno disuelto en los diferentes etapas, la presiembra registra diferencias significativas entre sus mediciones según Kruskal Wallis siendo las 12h el monitoreo con media mas baja y un mismo grupo con las 16h pero significativamente diferente a todas las otras, las 20h registran la media mas alta siendo similar con las mediciones de las 4h y 8h pero diferentes que los otros datos obtenidos, las 24h es significativamente diferente que las 12h, 16h y 20h, zoea no registra diferencias significativas entre sus mediciones según Kruskal Wallis ($p>0.05$), mysis registra su media mas baja a las 20h sus valores no muestran diferencias estadísticamente significativas con las 24h pero si con las otras mediciones registradas en este estadio, la medición mas alta se registra a las 12h que es similar a 8h pero diferente las otras mediciones de este estadio, las 4h es significativamente diferente a las 12h, 20h y 24h pero similar que las 8h y 16H, postlarva no registra diferencias significativas entre sus mediciones según Kruskal Wallis ($p>0.05$). (fig. 6)

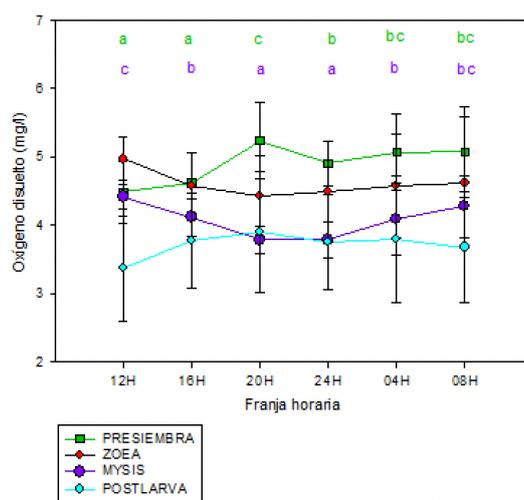


Figura 6: a) Variabilidad diaria de oxígeno disuelto en las diferentes etapas del cultivo b) Variabilidad diaria de oxígeno disuelto en los diferentes estadios del cultivo; cada letra coloreada indica grupos estadísticos diferentes dentro del estadio correspondiente al color de la letra y la ausencia de ellas indica

Para la variabilidad diaria de alcalinidad total se consideraron únicamente las 8h00 y las 20h00, no se encontraron diferencias significativas entre ambas franjas horarias pero si entre los estadios de cultivo en los que se muestreó, siendo presiembra y zoea significativamente diferentes a mysis y postlarva pero similares entre ellas, destacando que la media más baja la registra la Presiembra con un valor mínimo registrado de 1995 μatm y la media más alta en Postlarva con un valor máximo registrado de 3879 μatm (fig. 7)

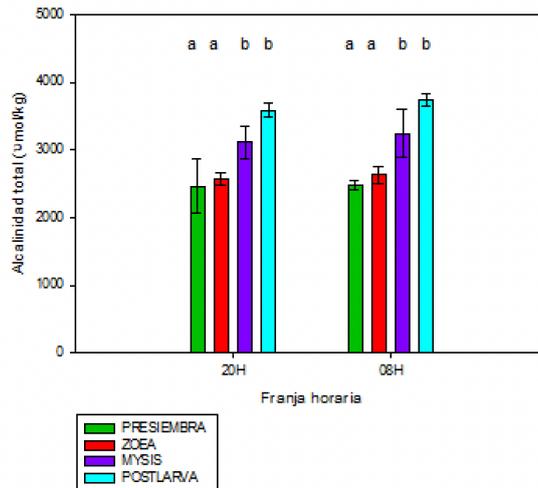


Figura 7 Variabilidad de Alcalinidad Total ($\mu\text{mol/Kg}$) en las distintas etapas de cultivo

Para la variabilidad diaria de presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$) se consideraron únicamente las 8h00 y las 20h00, no se encontraron diferencias significativas entre ambas franjas horarias pero si entre los estadios de cultivo en los que se muestreó, siendo presiembra diferente a los otros tres estadios de cultivo al igual que zoea pero significativamente diferentes a mysis y postlarva que son similares entre ellas, destacando que la media más baja la registra la presiembra con un valor mínimo registrado de $202.1 \mu\text{atm}$ y la media más alta en Postlarva con un valor máximo registrado de $1524.1 \mu\text{atm}$ (fig. 8)

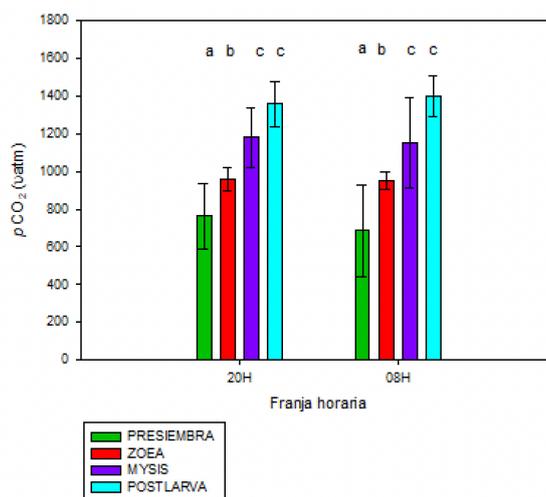


Figura 8 Variabilidad de $p\text{CO}_2$ ($\mu\text{mol/Kg}$) en las distintas etapas de cultivo

Para la variabilidad diaria de la saturación de Aragonita (ΩAr) y Calcita (ΩCa) se consideraron únicamente las 8h00 y las 20h00, en los datos de ΩAr y ΩCa no se encontraron diferencias

significativas entre las horas consideradas pero si entre los estadios de cultivo en los que se muestreó, siendo presiembr a y zoea significativamente diferentes a mysis y postlarva pero similares entre ellas, destacando que las medias más baja la registra la zoea con un valor mínimo registrado de 2.63 Ω Ar y 3.93 Ω Ca μ atm y las medias más alta en postlarva con un valor máximo registrado de 4.45 Ω Ar y 7.34 Ω Ca μ atm (fig. 9a).

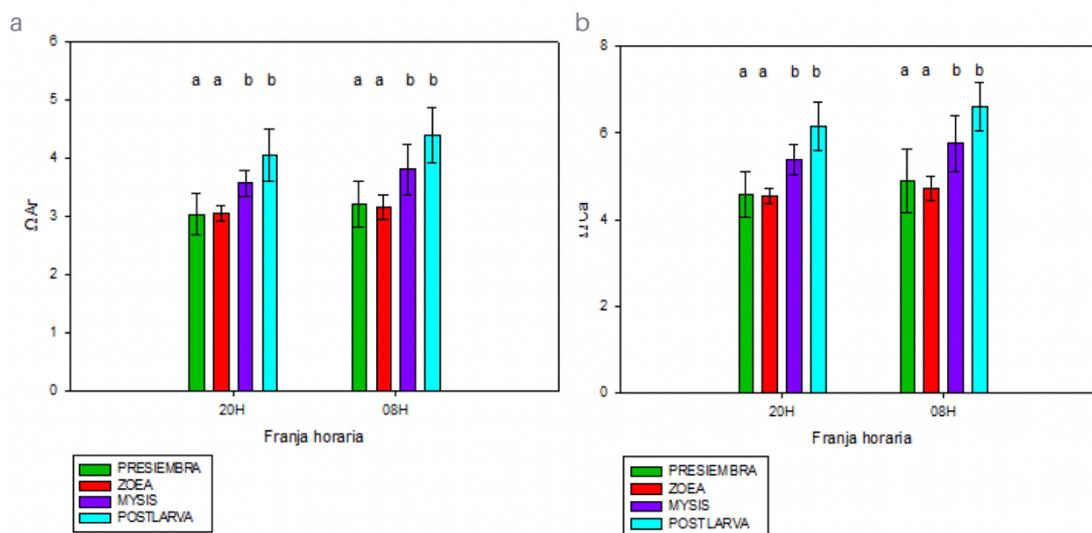


Figura 9: a) Variabilidad de saturación de Aragonita (μ mol/Kg) en las distintas etapas de cultivo. b) Variabilidad de saturación de calcita (μ mol/Kg) en las distintas etapas de cultivo

La correlación encontrada entre los parámetros de pH y temperatura, según el coeficiente de correlación de Spearman estos dos parámetros presentan una fuerte correlación en los estadios de cultivo presiembra, zoea, mysis y postlarva todos ellos con un valor de $\rho_{(717)} = -0.99/0$ (Spearman $_{(gl)} =$ coeficiente de Spearman/probabilidad pvalor) (fig. 11a). En la correlación encontrada entre los parámetros de pH y salinidad, presentan una débil correlación en el estadio de presiembra con un valor de $\rho_{(717)} = -0.24/0.3 \times 10^{-3}$, correlación moderada en los estadios de zoea, mysis y postlarva con un valor de $\rho_{(717)} = -0.71/0$, $-0.5/0.1 \times 10^{-9}$, $-0.43/0.3 \times 10^{-10}$ respectivamente (fig. 11b).

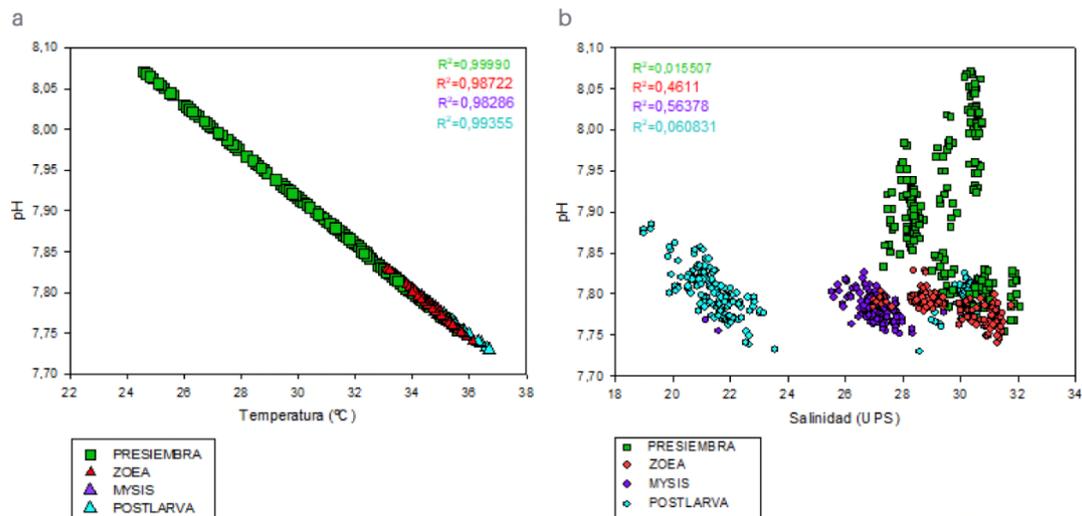


Figura 10: a) Correlación de pH y temperatura en las diferentes etapas del cultivo. b) Correlación de pH y salinidad en las diferentes etapas del cultivo. El valor de R^2 se encuentra con el mismo color que los puntos de la etapa que corresponde.

La correlación encontrada entre los parámetros de pH y oxígeno disuelto, según el coeficiente de correlación de Spearman estos dos parámetros presentan una moderada correlación en los estadios de zoea y postlarva con un valor de $\rho_{h(717)} = -0.54/0.2 \times 10^{-11}$, $0.44/0.2 \times 10^{-10}$ respectivamente, pero no están correlacionados en los estadios de presiembra y mysis. (fig. 12a). La correlación encontrada entre los parámetros de temperatura y salinidad, presentan una débil correlación en el estadio de presiembra con un valor de $\rho_{h(718)} = 0.23/0.7 \times 10^{-3}$, correlación moderada en los estadios de zoea, mysis y postlarva con un valor de $\rho_{h(717)} = 0.64/0$, $0.52/0.4 \times 10^{-10}$, $0.36/0.4 \times 10^{-7}$ respectivamente. (fig. 12b)

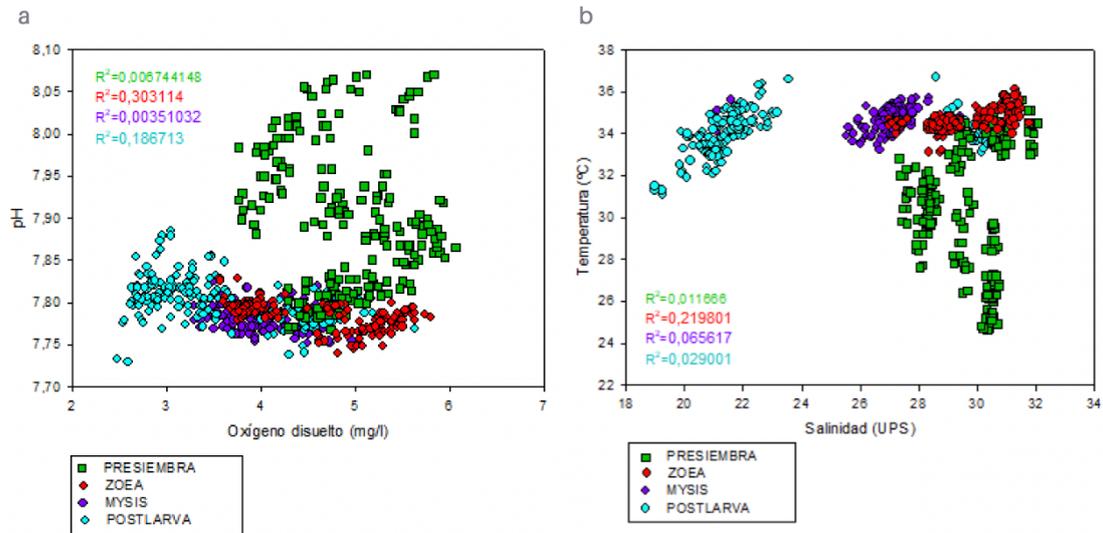


Figura 11: a) Correlación de pH y oxígeno disuelto en las diferentes etapas del cultivo. b) Correlación de temperatura y salinidad en las diferentes etapas del cultivo. El valor de R² se encuentra con el mismo color que los puntos de la etapa que corresponde.

La correlación encontrada entre los parámetros de temperatura y oxígeno disuelto, según el coeficiente de correlación de Spearman estos dos parámetros presentan una moderada correlación en los estadios de zoea y postlarva con un valor de $\rho_{(718)} = 0.44/0.3 \times 10^{-7}$, $0.41/0.1 \times 10^{-9}$ respectivamente, pero no están correlacionados en los estadios de presembrado y mysis. (fig. 13a) La correlación encontrada entre los parámetros de salinidad y oxígeno disuelto, presentan una moderada correlación en los estadios de presembrado, zoea y postlarva con un valor de $\rho_{(718)} = -0.42/0.1 \times 10^{-9}$, $0.73/0$, $0.39/0.1 \times 10^{-8}$ respectivamente, débil correlación en el estadio de mysis con un valor de $\rho_{(717)} = 0.16/0.06$. (fig. 13b)

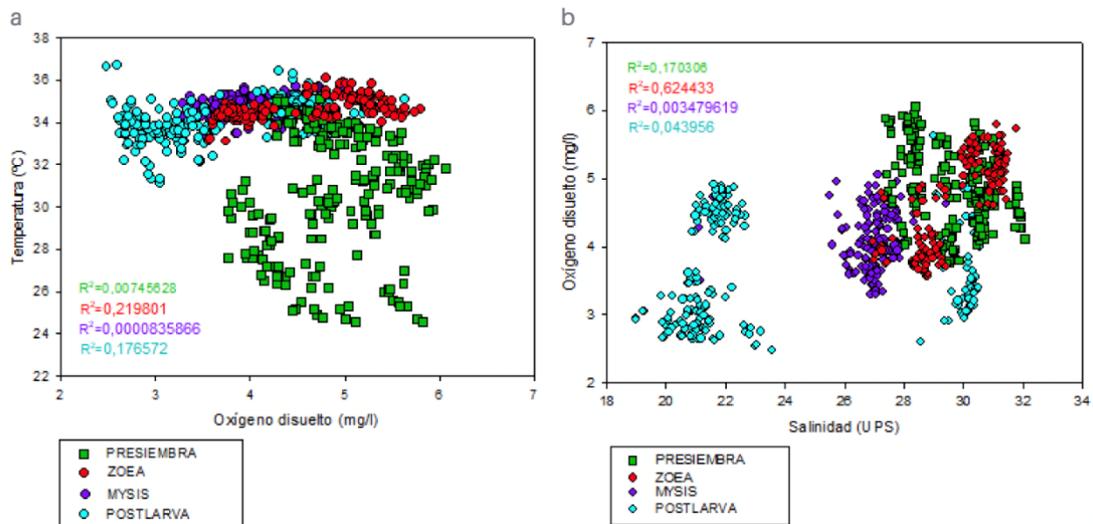


Figura 12: a) Correlación de temperatura y oxígeno disuelto en las diferentes etapas del cultivo. b) Correlación de oxígeno disuelto y salinidad en las diferentes etapas del cultivo. El valor de R^2 se encuentra con el mismo color que los puntos de la etapa que corresponde.

4. DISCUSIÓN

Este estudio explora por primera vez la dinámica de química de carbonatos en la acuicultura de camarón blanco en Manabí. Donde se encontró que a lo largo del día, el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto si presentan diferencias significativas mientras que la salinidad no varía a lo largo del día en ninguno de los estadios. El pH en zoea y mysis presenta sus medias más bajas a las 16h00 (7.77 y 7.78) y las más altas a las 8h00 (7.79) mientras que en postlarva la variación diaria no presentó diferencias significativas; la temperatura presentó diferencias significativas en zoea y mysis donde sus medias más bajas fueron a las 8h00 (34.36 y 34.27) y las más altas a las 16h00 (35.03 y 34.94), y el oxígeno solo presentó diferencias significativas en la variabilidad diaria de mysis con sus medias más bajas a las 20h00 y 24h00 (3.79) y sus más altas a las 12h00 (4.12). Además, se encontró que el pH se mantuvo estable a lo largo del cultivo, sin embargo, la alcalinidad total se elevó progresivamente hasta postlarva debido a procesos de balance iónico que se llevan a cabo en la producción y que a su vez mantuvieron ambas formas biocompatibles del carbonato de calcio dentro de rangos que promueven el desarrollo de los organismos. Este proceso de balance iónico en el que son agregados sales de potasio, magnesio y calcio, se traduce en un aumento de la alcalinidad y a

su vez ocasiona que se mantengan condiciones de pH funcionales para el desarrollo de los organismos y cubriendo las necesidades de producción.

Debido a la presencia continua de algas en los dos primeros estadios del cultivo (zoea y mysis), se espera que durante el día el pH se eleve (Mustapha, 2019), aun cuando existe la presión de la temperatura a lo largo del día las condiciones del agua no se ven afectadas según lo esperado, al avanzar el día los efectos del sol serían más fuertes presionando la acumulación de H⁺ en el agua y generando el descenso del pH, fenómeno que no estuvo presente en nuestro estudio, que pudo llegar a darse por el balance iónico llevado a cabo en el manejo de la larvicultura (Haddout et al., 2022) .

Durante el desarrollo los organismos acuáticos ectotermos dependen de factores externos para mantener sus niveles metabólicos en beneficio de su desarrollo, ante el aumento de temperatura la disolución del oxígeno disminuye, ante esta baja de la disponibilidad de oxígeno las tasas metabólicas se ven afectadas negativamente, los organismos conforme se desarrollan incrementan sus requerimientos de oxígeno y actividad incrementando la presión en el alcance aeróbico (Haddout et al., 2022; Rubalcaba et al., 2020), en el desarrollo de nuestro análisis las condiciones de temperatura se mantuvieron altas con una variabilidad de 0.52°C considerando las mediciones en zoea, mysis y postlarva, conforme los organismos crecen OD disminuye llegando a 3.71mg/l en el estadio de postlarva, manteniéndose siempre en valores aptos para el desarrollo del cultivo.

En el cultivo la temperatura se mantuvo sin variar en sus medias generales ya que este parámetro es controlado por los acuicultores; la temperatura es uno de los principales factores que afectan al desarrollo de los ectotermos, las temperaturas elevadas favorecen el crecimiento de los organismos, sin embargo en el caso de los que tienen diferentes estadios larvales los estadios mas avanzados requieren de la disminución de la temperatura para desarrollarse correctamente (Ismael et al., 1998; Tyler, 1971). Al comprobar las diferencias que existen en la variación diaria encontramos en zoea y mysis un descenso en la temperatura a las 8h coincidiendo con la reposición del agua que se realiza como mantenimiento en el cultivo y el inicio del efecto térmico

que provoca el sol en el cultivo y un acenso a las 16 h coincidiendo con el final del día cuando el agua ya ha recibido toda la fuerza de la radiación solar misma que se encuentra en descenso por la cercanía del sol al horizonte (Rugebregt & Nurhati, 2020).

La salinidad es un factor importante en el desarrollo de los organismos, las variaciones en estas podrían provocar estrés como mecanismo de defensa de los organismos cultivados, este cambio en los procesos metabólicos y conductuales provocan una respuesta fisiológica en los organismos demandando mayor oxígeno para compensar el desgaste energético que representa la osmorregulación (Rahi et al., 2021), entre todos nuestros estadios medidos se registra una menor cantidad de oxígeno disuelto en el estadio de postlarva, descenso que coincide con la disminución controlada de la salinidad que varía según lo requiera el siguiente sistema de cultivo en este proceso productivo, durante el cultivo la variabilidad diaria del OD no fue significativa en zoea y postlarva, mientras que en mysis encontramos diferencias significativas a las 20h y 24h, en este estadios se administran como dieta algas que a partir de las 16h cambian su rol de consumidores de CO₂ a consumir oxígeno (Mustapha, 2019) cambiando la dinámica del agua representando una mayor presión a la demanda de oxígeno, esto sumado a los esfuerzos propios de los organismos cultivados que se encuentran en una fase de transición alimenticia incrementando su demanda de oxígeno (Olivotto et al., 2017).

Nuestro estudio encuentra correlaciones débiles entre salinidad y oxígeno disuelto en todas las etapas de cultivo, esto también se ha visto en ecosistemas estuarinos, con constantes variaciones de salinidad (Haddout et al., 2022) La salinidad y el pH se correlacionan moderadamente durante nuestro estudio en los estadios de zoea, mysis, y postlarva, esta relación garantiza que los valores de K, Mg, y Ca sean las adecuadas para el desarrollo de los organismos y su equilibrio osmótico, así ante una mayor concentración de salinidad en el medio mayor serán los requerimientos de estos macronutrientes que también se encargan de buferizar el agua del cultivo (Liu et al., 2021).

Durante el cultivo encontramos correlación moderada entre los parámetros de pH y OD en los estadios de zoea y postlarva, mientras que en presiembr y mysis no se encontró relación, el

oxígeno y el pH son dos variables estrechamente relacionadas dado que una disminución del OD puede representar una mayor concentración de CO₂ repercutiendo directamente en la concentración de H⁺ (Mistry et al., 2019). La salinidad y la temperatura durante el cultivo se mantuvieron constantes con el fin de garantizar el desarrollo de los organismos cultivados, *P. vannamei* pese a caracterizarse por ser eurihalina pueden sufrir problemas por osmorregulación cuando estos parámetros varían de manera brusca ya que su desarrollo branquial no ha culminado (Bermudes-Lizárraga et al., 2017).

Encontramos que pCO₂ aumenta a lo largo del cultivo hasta en postlarva alcanzar medias superiores a las pronosticadas para finales de siglo y supone también descenso en los niveles de pH disminuyendo la saturación de calcita y aragonita (Dissard et al., 2010) , sin embargo el pH en este estudio se mantiene estable y ambas formas de carbonato de calcio aumentan progresivamente el cultivo avanza. Esto debido a la buferización intencional contemplada en el manejo del sistema, el incremento de la alcalinidad total y el mantenimiento la salinidad disminuyen la vulnerabilidad del sistema ante la precipitación de calcita, aragonita y baja de pH.

5. CONCLUSIONES

- A lo largo del día el pH en zoea y mysis presenta sus medias más bajas a las 16h00 (7.77 y 7.78) y las más altas a las 8h00 (7.79) mientras que en postlarva la variación diaria no presentó diferencias significativas
- La temperatura presentó diferencias significativas en zoea y mysis donde sus medias más bajas fueron a las 8h00 (34.36 y 34.27) y las más altas a las 16h00 (35.03 y 34.94)
- La salinidad no mostró diferencias significativas a lo largo del día en ninguno de los estadios.
- El oxígeno solo presentó diferencias significativas en la variabilidad diaria de mysis con sus medias más bajas a las 20h00 y 24h00 (3.79) y sus más altas a las 12h00 (4.12).
- El pH se mantuvo estable a lo largo del cultivo y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estadios.

- La alcalinidad total, $p\text{CO}_2$, Ω calcita y Ω aragonita aumentaron de forma progresiva a lo largo del cultivo.
- Salinidad y temperatura son parámetros altamente controlados por los requerimientos de cultivo manteniéndose la temperatura estable y la salinidad disminuye según los requerimientos del comprador de la postlarva.
- Pese a tener un suministro continuo de oxígeno, este decrece por la presión biológica del cultivo medida los organismos crecen.

6. AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres, por permitirnos crecer en un camino que quizá no fue claro, pero siempre nos hicieron saber que la única manera en la que la luz llegue es avanzado, gracias por reconocernos aun cuando ante nuestros ojos las dudas no dejaban de aparecer, creyendo en cada proyecto en cada tarea y en cada palabra que con emoción compartíamos para hacerlos parte de nuestra vida y aventura biológica.

A nuestros tutores, por abrirnos las puertas a un mundo de ciencia, conocimiento y verdad, por demostrarnos que la ciencia es colaborativa, inclusiva y respetuosa, por confiar en ambos y ver más allá de lo que nosotros creímos que éramos capaces.

Un agradecimiento especial al Laboratorio Bocayolar, Carlos Villagomez, Geovanny Delgado, esta investigación no hubiera podido desarrollarse sin su apertura. Al biólogo Alfonso Rosales, por la predisposición a explicarnos los procesos de larvicultura que se desarrollaban en el laboratorio y al equipo de trabajo de ambas bases de producción, por su colaboración durante el proceso de toma de datos.

A nuestros compañeros de equipo EBIOC, Arianna, Ariel, Jennifer, José, Julia, Leonardo y Roddy por brindarnos compañerismo, soporte, complicidad cuando nadie nos entiende y hacernos saber que siempre podremos estar juntos los incomprensidos.

Y a nuestros quienes, que dedicaron su tiempo a vernos crecer y asegurarse de que lleguemos hasta aquí, compartiéndonos sin dudar su tiempo, sabiduría, llantos y felicidad.

5. Bibliografía

Baumann, H., Talmage, S. C., & Gobler, C. J. (2012). Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature Climate Change*, 2(1), Art. 1.

<https://doi.org/10.1038/nclimate1291>

- Bednaršek, N., Feely, R. A., Beck, M. W., Alin, S. R., Siedlecki, S. A., Calosi, P., Norton, E. L., Saenger, C., Štrus, J., Greeley, D., Nezhin, N. P., Roethler, M., & Spicer, J. I. (2020). Exoskeleton dissolution with mechanoreceptor damage in larval Dungeness crab related to severity of present-day ocean acidification vertical gradients. *The Science of the Total Environment*, 716, 136610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136610>
- Bednaršek, N., Feely, R. A., Tolimieri, N., Hermann, A. J., Siedlecki, S. A., Waldbusser, G. G., McElhany, P., Alin, S. R., Klinger, T., Moore-Maley, B., & Pörtner, H. O. (2017). Exposure history determines pteropod vulnerability to ocean acidification along the US West Coast. *Scientific Reports*, 7(1), 4526. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03934-z>
- Bermudes-Lizárraga, J., Nieves-Soto, M., Medina-Jasso, M., Reyes, J. C., Flores-Campaña, L., Salas, A., & Piña-Valdez, P. (2017). Efecto de la temperatura y salinidad en el crecimiento larval de *Litopenaeus vannamei*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52, 611-615. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300016>
- Busch, D. S., & McElhany, P. (2016). Estimates of the Direct Effect of Seawater pH on the Survival Rate of Species Groups in the California Current Ecosystem. *PLoS ONE*, 11(8), e0160669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160669>
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365. <https://doi.org/10.1038/425365a>
- Castillo-Briceno, P., & Navarrete-Mier, F. (2015). Potenciales Impactos de la Acidificación de los Océanos para las Pesquerías y Acuicultura Marina en Ecuador. *Tilapia&Camarones*, 7, 28-33.
- Clements, J. C., & Chopin, T. (2017). Ocean acidification and marine aquaculture in North America: Potential impacts and mitigation strategies. *Reviews in Aquaculture*, 9(4), 326-341. <https://doi.org/10.1111/raq.12140>
- Cornwall, C. E., Comeau, S., DeCarlo, T. M., Moore, B., D'Alexis, Q., & McCulloch, M. T. (2018). Resistance of corals and coralline algae to ocean acidification: Physiological control of calcification under natural pH variability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1884), 20181168. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1168>
- Cornwall, C. E., Comeau, S., Kornder, N. A., Perry, C. T., van Hooijdonk, R., DeCarlo, T. M.,

- Pratchett, M. S., Anderson, K. D., Browne, N., Carpenter, R., Diaz-Pulido, G., D'Olivo, J. P., Doo, S. S., Figueiredo, J., Fortunato, S. A. V., Kennedy, E., Lantz, C. A., McCulloch, M. T., González-Rivero, M., ... Lowe, R. J. (2021). Global declines in coral reef calcium carbonate production under ocean acidification and warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(21), e2015265118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015265118>
- Dickson, A. G. (2002, mayo 1). *Thermodynamics of the dissociation of boric acid in potassium chloride solutions from 273.15 to 318.15 K* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/je00061a009>
- Dissard, D., Nehrke, G., Reichart, G. J., & Bijma, J. (2010). Impact of seawater on calcification and Mg/Ca and Sr/Ca ratios in benthic foraminifera calcite: Results from culturing experiments with *Ammonia tepida*. *Biogeosciences*, *7*(1), 81-93. <https://doi.org/10.5194/bg-7-81-2010>
- Estadísticas—Cámara Nacional de Acuacultura. (2022, marzo 31). <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Fabricius, K. E., De'ath, G., Noonan, S., & Uthicke, S. (2014). Ecological effects of ocean acidification and habitat complexity on reef-associated macroinvertebrate communities. *Proceedings. Biological Sciences*, *281*(1775), 20132479. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2479>
- Falkenberg, L. J., Bellerby, R. G. J., Connell, S. D., Fleming, L. E., Maycock, B., Russell, B. D., Sullivan, F. J., & Dupont, S. (2020). Ocean Acidification and Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(12), 4563. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124563>
- Gilbert, P. U. P. A., Bergmann, K. D., Boekelheide, N., Tambutté, S., Mass, T., Marin, F., Adkins, J. F., Erez, J., Gilbert, B., Knutson, V., Cantine, M., Hernández, J. O., & Knoll, A. H. (2022). Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science Advances*, *8*(10), eabl9653. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl9653>
- Haddout, S., Priya, K. L., Hogueane, A. M., Casila, J. C. C., & Ljubenkov, I. (2022). Relationship of salinity, temperature, pH, and transparency to dissolved oxygen in the Bouregreg estuary (Morocco): First results. *Water Practice and Technology*, *17*(12), 2654-2663.

- <https://doi.org/10.2166/wpt.2022.144>
- Hall, E. R., Wickes, L., Burnett, L. E., Scott, G. I., Hernandez, D., Yates, K. K., Barbero, L., Reimer, J. J., Baalousha, M., Mintz, J., Cai, W.-J., Craig, J. K., DeVoe, M. R., Fisher, W. S., Hathaway, T. K., Jewett, E. B., Johnson, Z., Keener, P., Mordecai, R. S., ... Styron, J. (2020). Acidification in the U.S. Southeast: Causes, Potential Consequences and the Role of the Southeast Ocean and Coastal Acidification Network. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00548>
- Hancock, A. M., King, C. K., Stark, J. S., McMinn, A., & Davidson, A. T. (2020). Effects of ocean acidification on Antarctic marine organisms: A meta-analysis. *Ecology and Evolution*, 10(10), 4495-4514. <https://doi.org/10.1002/ece3.6205>
- Hannan, K. D., Munday, P. L., & Rummer, J. L. (2020). The effects of constant and fluctuating elevated pCO₂ levels on oxygen uptake rates of coral reef fishes. *The Science of the Total Environment*, 741, 140334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140334>
- Hilmi, N., Allemand, D., Kavanagh, C., Laffoley, D., Metian, M., Osborn, D., & Reynaud, S. (2015). Bridging the Gap Between Ocean Acidification Impacts and Economic Valuation: Regional Impacts of Ocean Acidification on Fisheries and Aquaculture. *IUCN (International Union for Conservation of Nature) Global Marine and Polar Programme*.
- Hopkins, F. E., Suntharalingam, P., Gehlen, M., Andrews, O., Archer, S. D., Bopp, L., Buitenhuis, E., Dadou, I., Duce, R., Goris, N., Jickells, T., Johnson, M., Keng, F., Law, C. S., Lee, K., Liss, P. S., Lizotte, M., Malin, G., Murrell, J. C., ... Williamson, P. (2020). The impacts of ocean acidification on marine trace gases and the implications for atmospheric chemistry and climate. *Proceedings. Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 476(2237), 20190769. <https://doi.org/10.1098/rspa.2019.0769>
- Ismael, D., Anger, K., & Moreira, G. S. (1998). Influence of temperature on larval survival, development, and respiration in *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 51(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1007/BF02908727>
- Kottmeier, D. M., Chrachri, A., Langer, G., Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., & Brownlee, C. (2022). Reduced H⁺ channel activity disrupts pH homeostasis and calcification in coccolithophores at low ocean pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(19), e2118009119.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.2118009119>
- Levin, L. A., Mendoza, G. F., Grupe, B. M., Gonzalez, J. P., Jellison, B., Rouse, G., Thurber, A. R., & Waren, A. (2015). Biodiversity on the Rocks: Macrofauna Inhabiting Authigenic Carbonate at Costa Rica Methane Seeps. *PLOS ONE*, *10*(7), e0131080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131080>
- Liu, Z., Liu, Q., Zhang, D., Wei, S., Sun, Q., Xia, Q., Shi, W., Ji, H., & Liu, S. (2021). Comparison of the Proximate Composition and Nutritional Profile of Byproducts and Edible Parts of Five Species of Shrimp. *Foods*, *10*(11), 2603. <https://doi.org/10.3390/foods10112603>
- 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 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)
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., & Stocker, T. F. (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature*, *453*(7193), Art. 7193. <https://doi.org/10.1038/nature06949>
- Marcillo, F. (2017). Shrimp farming and the environment in Ecuador: Past and present. *World Aquaculture*, *48*(3), 39-42.
- Meseck, S. L., Alix, J. H., Swiney, K. M., Long, W. C., Wikfors, G. H., & Foy, R. J. (2016). Ocean Acidification Affects Hemocyte Physiology in the Tanner Crab (*Chionoecetes bairdi*). *PLoS ONE*, *11*(2), e0148477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148477>
- Mistry, A. N., Ganta, U., Chakrabarty, J., & Dutta, S. (2019). A review on biological systems for CO₂ sequestration: Organisms and their pathways. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *38*(1), 127-136. <https://doi.org/10.1002/ep.12946>
- Mustapha, A. (2019). *IMPORTANCE OF pH CONTROL IN AQUACULTURE*.
- Noisette, F., Calosi, P., Madeira, D., Chemel, M., Menu-Courey, K., Piedalue, S., Gurney-Smith, H., Daoud, D., & Azetsu-Scott, K. (2021). Tolerant Larvae and Sensitive Juveniles: Integrating Metabolomics and Whole-Organism Responses to Define Life-Stage Specific Sensitivity to Ocean Acidification in the American Lobster. *Metabolites*, *11*(9), 584. <https://doi.org/10.3390/metabo11090584>

- Olivotto, I., Oliver, M. P., & Turchi, C. (2017). Larval Diets and Nutrition. En *Marine Ornamental Species Aquaculture* (pp. 125-137). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9781119169147.ch9>
- Pierrot, D., Lewis, E., & Wallace, D. W. R. (2006). *MS Excel Program Developed for CO2 System Calculations* (ORNL/CDIAC-105a). Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory. 10.3334/CDIAC/otg.CO2SYS_XLS_CDIAC105a
- Rahi, Md. L., Azad, K. N., Tabassum, M., Irin, H. H., Hossain, K. S., Aziz, D., Moshtaghi, A., & Hurwood, D. A. (2021). Effects of Salinity on Physiological, Biochemical and Gene Expression Parameters of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*): Potential for Farming in Low-Salinity Environments. *Biology*, 10(12), 1220.
<https://doi.org/10.3390/biology10121220>
- Reid, P. C., Fischer, A. C., Lewis-Brown, E., Meredith, M. P., Sparrow, M., Andersson, A. J., Antia, A., Bates, N. R., Bathmann, U., Beaugrand, G., Brix, H., Dye, S., Edwards, M., Furevik, T., Gangstø, R., Hátún, H., Hopcroft, R. R., Kendall, M., Kasten, S., ... Washington, R. (2009). Chapter 1. Impacts of the oceans on climate change. *Advances in Marine Biology*, 56, 1-150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(09\)56001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(09)56001-4)
- Reuter, K. E., Lotterhos, K. E., Crim, R. N., Thompson, C. A., & Harley, C. D. G. (2011). Elevated pCO₂ increases sperm limitation and risk of polyspermy in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Global Change Biology*, 17(1), 163-171.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02216.x>
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin, F. S. I., Lambin, E., Lenton, T., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H. J., Nykvist, B., de Wit, C., Hughes, T., van der Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P., Costanza, R., Svedin, U., ... Foley, J. (2009). Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity. *Ecology and Society*, 14(2). <https://doi.org/10.5751/ES-03180-140232>
- Rubalcaba, J. G., Verberk, W. C. E. P., Hendriks, A. J., Saris, B., & Woods, H. A. (2020). Oxygen limitation may affect the temperature and size dependence of metabolism in aquatic ectotherms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(50), 31963-31968.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2003292117>
- Rugebregt, M. J., & Nurhati, I. S. (2020). Preliminary Study of Ocean Acidification: Relationship

- of pH, Temperature, and Salinity in Ohoililir, Southeast Maluku. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 618(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/618/1/012004>
- Segovia Larrea, S. (2020). 20 años de dolarización de la economía ecuatoriana: Análisis del sector externo. *Banco Central del Ecuador*.
- Sewell, M. A., Baker, D. W., Hudson, M. E., Millar, R. B., & Hickey, A. J. R. (2021). Near-future oceanic CO₂ delays development and growth in early-stage larvae of the endemic New Zealand sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Marine Biology*, 168(9), 141. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03932-w>
- Tasoff, A. J., & Johnson, D. W. (2018). Can larvae of a marine fish adapt to ocean acidification? Evaluating the evolutionary potential of California Grunion (*Leuresthes tenuis*). *Evolutionary Applications*, 12(3), 560-571. <https://doi.org/10.1111/eva.12739>
- Taylor, J. R. A., Gilleard, J. M., Allen, M. C., & Deheyn, D. D. (2015). Effects of CO₂-induced pH reduction on the exoskeleton structure and biophotonic properties of the shrimp *Lysmata californica*. *Scientific Reports*, 5, 10608. <https://doi.org/10.1038/srep10608>
- Tyler, J. E. (1971). Marine ecology, v. 1. Environmental factors, part 1. A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. Wiley-Interscience, New York, xv + 681 p. \$34.50. *Limnology and Oceanography*, 16(5), 841-842. <https://doi.org/10.4319/lo.1971.16.5.0841>
- Yu, Q., Xie, J., Huang, M., Chen, C., Qian, D., Qin, J. G., Chen, L., Jia, Y., & Li, E. (2020). Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 16, 100280. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100280>



Copies of this certificate and others can be obtained at:
http://cdiac.ornl.gov/oceans/Dickson_CRM/batches.html

University of California, San Diego
 Scripps Institution of Oceanography
 Marine Physical Laboratory
 9500 Gilman Drive
 La Jolla, CA 92093-0244

Certificate of Analysis

Reference material for oceanic CO₂ measurements

Batch 154 (Bottled January 22, 2016)

This reference material consists of natural sea water sterilized by a combination of filtration, ultra-violet radiation and addition of mercuric chloride.

Analysis Results

The various procedures used for these analyses are detailed overleaf.

Salinity	33.347	
Total dissolved inorganic carbon	2037.68 ± 1.09 μmol·kg ⁻¹	(9; 9)
Total alkalinity	2224.30 ± 0.68 μmol·kg ⁻¹	(32; 16)
Phosphate	0.61 μmol·kg ⁻¹	
Silicate	4.4 μmol·kg ⁻¹	
Nitrite	0.00 μmol·kg ⁻¹	
Nitrate	2.3 μmol·kg ⁻¹	

The cited uncertainties represent the standard deviation. Figures in parentheses are the number of analyses made (total number of analyses; number of separate bottles analysed). The nutrient levels may have changed on storage, their stability has not been examined. CO₂ analyses were performed over a period of time to confirm that the batch is stable.

The 95% confidence limits for the means of the certified analyses are thus:

Total dissolved inorganic carbon	2037.68 ± 0.84 μmol·kg ⁻¹
Total alkalinity	2224.30 ± 0.24 μmol·kg ⁻¹

STORAGE: The bottles should be stored out of direct sunlight, and preferably at or below room temperature (25 °C). They should not be allowed to freeze!

Andrew G. Dickson
 April 25, 2016