



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA EN *CHITON ARTICULATUS***

**SOWERBY, 1832 (MOLLUSCA-POLYPLACOPHORA)**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ALTAI CARLOS PAVÓN PANEQUE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSE LUIS CARBALLO CENIZO (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, UNAM)**

Comité Tutor:

Dr. ENRIQUE ÁVILA TORRES (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM)

Dr. JUAN FRANCISCO BELTRÁN (Universidad de Sevilla, US)

Dr. FREE ESPINOSA (Universidad de Sevilla, US)

Dr. CESAR MEGINA (Universidad de Sevilla, US)

CD.MX.

ABRIL 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**EFFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA EN *CHITON ARTICULATUS***

**SOWERBY, 1832 (MOLLUSCA-POLYPLACOPHORA)**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ALTAI CARLOS PAVÓN PANEQUE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSE LUIS CARBALLO CENIZO (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, UNAM)**

Comité Tutor:

Dr. ENRIQUE ÁVILA TORRES (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM)

Dr. JUAN FRANCISCO BELTRÁN (Universidad de Sevilla, US)

Dr. FREE ESPINOSA (Universidad de Sevilla, US)

Dr. CESAR MEGINA (Universidad de Sevilla, US)

**MÉXICO, CD. MX ABRIL 2017**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de marzo de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **PAVÓN PANEQUE ALTAI CARLOS** con número de cuenta **516494467**, con la tesis titulada **"EFECTOS DE LA ACIDIFICACIÓN OCEÁNICA EN *Chiton articulatus*, Sowerby 1832 (Mollusca-Polyplacopora)"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO**:

Presidente: DR. ENRIQUE AVILA TORRES  
Vocal: DR. FREE ESPINOSA TORRE  
Secretario: DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
Suplente: DR. JUAN FRANCISCO BELTRÁN GALA  
Suplente: DR. CÉSAR MEGINA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 17 de marzo de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## Agradecimientos

En primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme estudiar y realizar la tesis en esta institución de gran prestigio y de la cual tanto he aprendido

En segundo lugar, a los proyectos asignados al Dr. José Luis Carballo Cenizo, en especial al denominado “Efecto de la acidificación del océano en el proceso de bioerosión por esponjas destructoras de arrecifes coralinos.” SEP CONACYT CB-2012-01 con número de proyecto 177537, sin los cuales este experimento no se podía haber revisado y a los apoyos PAEP de movilidad que me han permitido darle difusión a los resultados científicos mediante una ponencia realizada en el congreso internacional “49th Western Society of Malacologists/ 82nd American Malacological Society Joint Annual Meeting” en Ensenada, Baja California, México en 2016.

Por último, agradecer al Dr. José Luis Carballo Cenizo por tutorizarme durante todo el experimento, la estancia en su laboratorio me ha permitido aprender mucho sobre mi ámbito de estudio. También quiero agradecer su implicación al comité tutorial, al Dr. Enrique Ávila, al Dr. Juan Francisco Beltrán, al Dr. Free Espinosa y por último pero no por ello menos importante al Dr. Cesar Megina.

## Agradecimientos a título personal

A título personal quiero agradecer a mis tutores el Dr. José Luis Carballo Cenizo y el Dr. José Carlos García Gómez por brindarme la oportunidad de realizar este estudio en estas condiciones. Otra persona que ha estado muy involucrada es el Dr. Benjamín Yañez Chávez sin cuya intensa ayuda durante el experimento durante el experimento, éste no se hubiera llevado a cabo. Tengo que agradecer a muchas personas su implicación directa en el experimento como Jessica, Laura, Cinthya y otros becarios del Laboratorio de Ecología del Bentos (UNAM). Al Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de sólidos del Instituto de Investigación de Materiales (UNAM) y también a los integrantes del Laboratorio de Biología Marina (US) que constantemente me han estado apoyando.

Extiendo mi más profunda gratitud a las personas que he conocido en Mazatlán como Luz, Lalo, Fernando, Lili, María y Mateo entre otros, quienes han propiciado que mi estancia diaria en la estación haya estado siempre colmada de ilusión y ganas de trabajar.

Vaya también mis agradecimientos para mis compañeros de piso y amigos Laura, Diana y Carlos, que me han apoyado en todo momento y sin cuyo continuo aliento no hubiera sido capaz de culminar este trabajo.

Por último pero no menos importante, a las instituciones que han permitido la realización de este experimento. Agradecer al convenio de Doble Maestría en Ciencias biológicas US-UNAM, al Master en Biología Avanzada (US) y a la Maestría en Ciencias Biológicas (UNAM), al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y al grupo de Ecología del Bentos en particular; aunque hay que mencionar de forma específica por su dedicación en el convenio a la Dra. Montserrat Arista y a la Dra. María del Coro Arizmendi.

Muchas gracias a todos, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

## Índice

Resumen .....	pág. 1-2
Introducción y antecedentes .....	pág. 2-6
Acidificación oceánica .....	pág. 2-3
Sistema oceánico de carbonatos .....	pág. 3-5
Respuesta biológica a la acidificación .....	pág. 5-6
<i>Chiton articulatus</i> .....	pág. 6-7
Motivación del proyecto y objetivos .....	pág. 7
Marco metodológico .....	pág. 8-11
Recolección y aclimatación previa al experimento .....	pág. 8
Aclimatación .....	pág. 8
Diseño experimental .....	pág. 8
Condiciones experimentales y medición de variables .....	pág. 8-10
Análisis estadísticos .....	pág. 10-11
Resultados y discusión .....	pág. 11-14
Conclusiones .....	pág. 15
Bibliografía .....	pág. 15-21
Material suplementario .....	pág. 22-31
Figuras .....	pág. 22-29
Tablas .....	pág. 30-31



## Resumen

La acidificación oceánica es uno de los problemas más importantes generados por el cambio climático. Esta se debe principalmente al aumento del CO<sub>2</sub> por causa antrópica, cuyo aumento provoca, entre otros efectos, que disminuya el pH marino. Los organismos que más pueden verse afectados por este proceso son aquellos que tienen estructuras de carbonato cálcico en su esqueleto ya que la disminución del pH provoca un desequilibrio en el balance del sistema oceánico de carbonatos. Dicho desequilibrio provoca cambios fisiológicos en los organismos y un coste metabólico derivado de contrarrestar ese efecto, y esto finalmente puede desembocar en cambios en las redes tróficas. Por todo ello, surge la necesidad de realizar estudios de acidificación oceánica y de desarrollo y puesta a punto de los sistemas de monitorización en ambientes controlados, así como de estudiar sus fortalezas y debilidades. Para estudiar el efecto de la acidificación oceánica en las estructuras calcáreas se incluyeron durante 23 días a ejemplares de *Chiton articulatus* Sowerby, 1832 (Mollusca-Polyplacophora) en estanques de experimentación. Los ejemplares sujetos a experimentación se sometieron, previamente aclimatados, a dos tratamientos. El primero de ellos fue mantenido a pH 7.8 (pH predicho para el año 2100), el segundo a pH 7.5 (predicho para el año 2200). El control se estableció a pH 8.1 (actual). Las variables que fueron estudiadas al concluir el experimento fueron la supervivencia, la resistencia y la plasticidad de las valvas. A las variables se les aplicó un Modelo Lineal General univariado y arrojó, al menos, diferencias significativas entre el control y los tratamientos acidificados. También se obtuvieron datos valiosos sobre las condiciones experimentales y permitió ahondar en el conocimiento de cómo afrontar un experimento de esta índole y mejorar su diseño experimental.

### Palabras clave:

**Acidificación oceánica, Ambientes controlados, *Chiton articulatus*, Monitorización, Hipercapnia, Cambio climático, Carbonato cálcico, Aragonita, Calcificación**

## Abstract

Ocean acidification is one of the most important problems triggered by climate change. This is mainly due to an increase of anthropogenic CO<sub>2</sub>, causing, among other effects, the decrease in marine pH. The most affected organisms by this process, are those that build calcium carbonate shells or skeletons, since the decrease of pH causes an imbalance in the equilibrium of the oceanic carbonate system. This imbalance produces physiological changes in the organisms and a metabolic cost derived from counteracting that effect, finally possibly leading to changes in the trophic networks. Given all of the above, there is a need to carry out ocean acidification studies and research and development of monitoring systems in controlled environments, as

well as to study their strengths and weaknesses. To study the effect of ocean acidification on calcareous structures, *Chiton articulatus* Sowerby, 1832 (Mollusca-Polyplacophora) was included in experimental ponds for 23 days. The experimental animals were submitted, previously acclimatized, to two treatments. The first one was maintained at pH 7.8 (predicted pH for year 2100), second at pH 7.5 (predicted for year 2200). Control was set to pH 8.1 (current). The variables that were studied at the conclusion of the experiment were survival, resistance and plasticity of the valves. A univariate General Linear Model was applied to the variables and showed, at least, significant differences between control and acidified treatments. Valuable data were also obtained on the experimental conditions and allowed to deepen the knowledge of how to tackle this kind of experiment and to improve its experimental design.

**Keywords:**

**Ocean acidification, Controlled Environments, *Chiton articulatus*, Monitoring, Hypercapnia, Global change, Calcium carbonate, Aragonite, Calcification**

## Introducción y antecedentes

### Acidificación oceánica

La concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera terrestre se ha incrementado un 40% en los últimos 150 años (desde 280 a 380 ppmv (partes por millón de volumen)) (Pearson y Palmer, 2000; Orr *et al.*, 2005). Como principales sumideros, los océanos han absorbido un 48% de este CO<sub>2</sub> (Peng, 2005; Bates *et al.*, 2014), esto ha ralentizado el calentamiento global pero ha iniciado un proceso que se conoce como “acidificación oceánica”(OA) (Scott C. Doney *et al.*, 2009; Bensoussan *et al.*, 2010; Fortunato, 2015).

El aumento de la tasa de incremento de CO<sub>2</sub> atmosférico está causado principalmente por la quema de combustibles fósiles y la deforestación, y es, al menos un orden de magnitud mayor a la mayor tasa registrada en millones de años (Sabine *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2014), siendo la concentración de CO<sub>2</sub> actual la más alta de los últimos 800 000 años (Scott C Doney *et al.*, 2009).

Los efectos de la acidificación oceánica son relativamente predecibles teniendo en cuenta el aumento del CO<sub>2</sub> antropogénico. Las grandes masas de agua absorben el dióxido de carbono, a causa de ello bajan los niveles de pH, e indirectamente, también baja el estado de saturación de carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>) en aguas superficiales. Además en estas aguas se genera la mayor parte de la producción (Caldeira y Wickett, 2003, 2005; Orr *et al.*, 2005).

Respecto a las series temporales que apoyan este incremento, algunas de las más largas se obtuvieron en Hawaii, con registros del CO<sub>2</sub> atmosférico en ppmv (estación Manua Loa) de

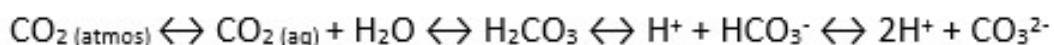
más de 50 años y, además, desde 1990, con registros de la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) y del pH oceánico en la estación Aloha (Figura 1) (IPCC, 2000; Pearson y Palmer, 2000; Floch *et al.*, 2008; Feely, Doney y Cooley, 2009; Bensoussan *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2014).

El Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC) predijo tres posibles escenarios en cuanto a la cantidad de emisiones implementados con los modelos generales de circulación (IPCC, 2000; Caldeira y Wickett, 2005; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007); el modelo más realista y con previsión intermedia pronostica que para finales de siglo los niveles de CO<sub>2</sub> podrían superar los 800 ppmv (A1B). De acuerdo con los mismos modelos para los océanos, también predicen que el carbono inorgánico disuelto (DIC) podría incrementarse más de un 12% en las aguas superficiales, y que la concentración de ion carbonato podría descender hasta un 60% (R. A. Feely *et al.*, 2004; Fabry *et al.*, 2008). La consecuente caída de pH rondaría en torno a los 0.4 unidades de pH para el año 2100. Si esto ocurre, puede potencialmente tener un gran impacto en los sistemas biológicos en los océanos que solo estamos empezando a entender.

Finalmente, durante los últimos años, miembros de la comunidad científica han reportado la urgente necesidad de estudios para dilucidar los efectos de los cambios en la química del carbono en los organismos y ecosistemas marinos; por ello, numerosos científicos han centrado sus investigaciones en las consecuencias derivadas del CO<sub>2</sub> antropogénico (Feely, Doney y Cooley, 2009).

### Sistema oceánico de carbonatos

A partir de la industrialización, el equilibrio químico del carbono en los océanos ha cambiado, y su interacción con respecto al calcio se ha modificado (Cox *et al.*, 2000; Morse, Arvidson y Lüttge, 2007; Dore *et al.*, 2009). Las reacciones principales del sistema de carbonatos son las siguientes (Reacción 1) (Millero, 2007):

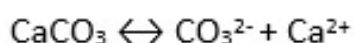


*Reacción 1: Equilibrio fundamental en la química del carbono oceánico*

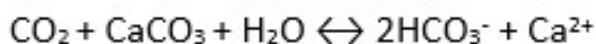
Esto es: La interfase aire-agua superficial está en continuo intercambio, si aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire, hay una serie de desencadenantes: Lo primero que sucede es que el CO<sub>2</sub> en estado gaseoso se disuelve y reacciona con las moléculas de agua dando lugar a ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), este ácido carbónico puede ceder un ion hidrógeno (H<sup>+</sup>) al ambiente y convertirse en un ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), este compuesto a su vez puede ceder otro ion hidrógeno y convertirse en ion carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), las reacciones explicadas están en equilibrio y este equilibrio depende en gran parte del pH, además de la concentración de sustratos y productos. Los iones hidrógeno liberados al medio contribuyen a la electronegatividad del mismo y por lo

tanto a su pH por definición, disminuyéndolo y provocando lo que se ha denominado acidificación oceánica (R. A. Feely *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2005).

Otro factor a tener en cuenta es la concentración de carbonato cálcico (Reacción 2), ya que la capacidad para absorber CO<sub>2</sub> atmosférico depende en parte del carbonato disuelto. Una reacción paralela a la anterior que también se da es la formación de bicarbonato a partir de agua, CO<sub>2</sub> y carbonato cálcico (Reacción 3). Debido a la última reacción mencionada se aumenta la acidez y reduce la disponibilidad de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> necesaria para los calcificadores (R. A. Feely *et al.*, 2004).



*Reacción 2*



*Reacción 3*

Los iones carbonatos son necesarios para las conchas y esqueletos de muchos organismos marinos en lo que incluimos plancton, corales, invertebrados, etc. En ambientes pelágicos, los carbonatos caen por la columna de agua y son: o bien disueltos, o bien depositados en superficie, o también pueden depositarse en sedimentos profundos. En relación con lo anterior, hay un límite, denominado horizonte de saturación, que separa las aguas superficiales, con sobresaturación de carbonato cálcico, de las aguas de las zonas más profundas, con subsaturación del mismo mineral. Por encima de ese límite el estado de saturación ( $\Omega$ ) (Reacción 4) es mayor a uno, y por debajo de ese valor es menor a uno, esto corresponde a un proceso de sobresaturación y subsaturación, respectivamente, que responde a la siguiente fórmula:

$$\Omega = \frac{[\text{Ca}^{2+}] [\text{CO}_3^{2-}]}{K'_{sp}}$$

*Reacción 2*

Siendo  $K'_{sp}$  el producto de la solubilidad aparente y depende de la salinidad, la presión, y la fase mineral concreta.

La alcalinidad, se define como la capacidad del agua para neutralizar ácidos o aceptar protones. Por lo tanto, el incremento de la alcalinidad total (TA) (Reacción 3) mejora la capacidad para absorber más CO<sub>2</sub> de la atmósfera. TA es una medida del exceso de cationes (como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) que está balanceado con los aniones formados por disociación de ácidos débiles como carbónico, bórico y otros (Duarte *et al.*, 2013).

El estado de saturación de los minerales de carbonato decrece de forma natural con la profundidad, y también está influido por el CO<sub>2</sub> disuelto que se produce por la respiración biológica y las temperaturas frías en las zonas profundas. A pesar de que el estado de saturación es un indicador muy útil para la biomineralización y disolución, algunos organismos calcificadores requieren de ambientes con unos niveles altos de saturación, y otros pueden ser capaces de generar estructuras en condiciones subsaturadas a cambio de un incremento del coste bioenergético (Comeau *et al.*, 2010; Gazeau *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011; Doney *et al.*, 2012).

### Respuesta biológica a la acidificación

En los organismos el carbonato cálcico se encuentra en dos formas metaestables, la aragonita y la calcita, siendo la aragonita aproximadamente 50% más soluble que la calcita (Mucci, 1983). El límite u horizonte de saturación es la profundidad en el que el estado de saturación es igual a 1 y este se encuentra a distintas profundidades dependiendo de la masa de agua en cuestión, siendo más vulnerables las que se encuentran en las mayores latitudes y aguas frías.

La capacidad de los organismos para resistir los cambios que van a acontecer es fundamental para su supervivencia y depende de sus niveles de tolerancia. En la actualidad, los cambios que se producen en los ecosistemas son demasiado rápidos para que los organismos puedan tolerarlo (Ries, Cohen y Mccorkle, 2009; Ridgwell y Schmidt, 2010), produciendo una mortalidad masiva, cambios dramáticos en la estructura y en la función ecosistémica, y además también se ven afectados los servicios que ellos proveen (Doney *et al.*, 2012).

Los organismos marinos costeros están expuestos a variedad de potenciales daños por estresantes ambientales como el “biofilm”, acción de las olas o los predadores. La acción de las olas puede erosionar las conchas con el sedimento transportado o los restos de estructuras calcáreas, por otra parte, los “biofilms” pueden liberar subproductos metabólicos que reduzcan el pH efectivo alrededor de la concha envolviendo al organismos un entorno más ácido que el exterior (Nienhuis *et al.*, 2010; Doney *et al.*, 2012; Kroeker *et al.*, 2013).

Si nos centramos en la aragonita, los pterópodos y los corales son los principales grupos que contienen en sus estructuras calcáreas este compuesto. Los pterópodos son los que más importancia cuantitativa tienen ya que son un productor planctónico y se encuentra en grandes densidades en zonas cercanas a los polos (R. a Feely *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2005). Por otra parte, a nivel cualitativo muchas especies de corales son especies bioingenieras que permiten el establecimiento de otras muchas especies gracias a los hábitats que proveen (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007).

Los moluscos son el segundo phylum más grande, con 90 000 especies descritas, cuyo tamaño oscila entre pocos milímetros y 20 metros. Habitan desde las cimas de las montañas hasta

las profundidades oceánicas (Rosenberg, 2014). Ellos son los principales organismos calcáreos, junto con los corales, y de gran importancia en el ciclo del carbono desde que aparecieron en el Cámbrico (Sigwart y Sutton, 2007; Kocot *et al.*, 2011).

Los efectos directos de los cambios del pH incluyen alteración de los materiales calcificados, incrementos de costes metabólicos, descenso de la eficiencia de mineralización de la rádula, cambios comportamentales y puede promover la disolución de la superficie de la concha alrededor de los aesthetes así como debilitar las valvas (Vendrasco *et al.*, 2008; Beniash *et al.*, 2010; Burnell *et al.*, 2013; Gazeau *et al.*, 2013; Kroeker *et al.*, 2013).

### *Chiton articulatus* Sowerby, 1832 (Mollusca-Polyplacophora)

*Chiton articulatus* pertenece a la clase Polyplacophora, en el orden Neoloricata, es un grupo que se ha mantenido más o menos constante por más de 500 millones de años (Okusu *et al.*, 2003; Sirenko, 2006; Puchalski, Eernisse y Johnson, 2008). En general los quitones viven desde el intermareal hasta las profundidades de 2000 metros y presentan 8 valvas articuladas, aunque existen especímenes raros que pueden tener 6, 7 o 9; estas valvas están rodeadas por una banda de tejido muscular llamada perinoto o cinturón (Abadía-Chanona, 2015). Las valvas están formadas por tres capas superpuestas, la más externa se denomina periostraco y se compone por una matriz orgánica, la capa intermedia y la interna se denominan ostraco e hipostraco respectivamente y están compuestas por carbonato cálcico. La disposición de las valvas así como el gran pie muscular que tienen, les permite proteger sus partes blandas y acoplarse perfectamente a superficies irregulares y duras de su hábitat. Los individuos de esta especie son ramoneadores marinos y tienen una función clave en el ecosistema intermareal, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (Connor *et al.*, 2015; Tejada-Martinez *et al.*, 2016). Por otra parte, los quitones también poseen un rádula excepcionalmente larga, que se extiende más de medio cuerpo, con los dientes mineralizados con magnetita de hierro (Lowenstam, 1962), estas estructuras son similares a la rádulas de los patelogasterópodos (lapas), además, la larga rádula con magnetita ha obtenido especial atención desde las ciencias de materiales con el fin de entender y replicar el proceso de biomineralización para aplicaciones industriales (Gordon y Joester, 2011; Wang *et al.*, 2013). Como en todos los moluscos con rádula, cuando los dientes anteriores están actuando sobre el sustrato, estos son erosionados y remplazados por una nueva fila de dientes (Shaw *et al.*, 2010). La deposición de minerales en los dientes varía entre especies y lo mismo sucede con la contribución relativa de hierro, fósforo y calcio (Macey y Brooker, 1996; Lee *et al.*, 2000; Brooker *et al.*, 2003). Un estudio previo reportó daño en la rádula en *Patella vulgata* bajo condiciones de acidificación (Marchant, Calosi y Spicer, 2010).

En cuanto a *C. articulatus* en particular, este molusco se sitúa en el intermareal por lo que es especialmente sensible al cambio climático. Esta especie varía de color gris pizarra hasta parduzco, a veces con tonos discretos color crema, con branquias holobranquiales con 55-70

plumas por cada lado, de tegumento suave (si no está erosionado) y brillante, con ausencia de ornamentos (Ferreira, 1983). Su idoneidad como indicador para el cambio climático se debe a dos factores principalmente: 1) Al agua marina superficial al ser la primera en verse influida por los efectos del incremento de CO<sub>2</sub> antropogénico; 2) A la interfase agua-aire, generadora de un escenario sometido a un elevado estrés. Es importante mencionar que esta especie es de amplia distribución, desde Mazatlán, Sinaloa, México (23°13'N; 106°25'W) hasta Puerto Ángel, Oaxaca, México (15°40' N; 9°29' W). Además, es el único quitón presente en las islas de San Benedicto, Socorro y Clarión (Ferreira, 1983).

Las placas o valvas de *C. articulatus* están formadas por aragonita, hecho inusual para el grupo de los moluscos (Runnegar, 1989). Las valvas están perforadas por canales rellenos de tejidos denominados aesthetes (Vendrasco *et al.*, 2008), los cuales poseen una terminación nerviosa sensorial expuesta a la superficie de la valva (ocelos) (Speiser, Eernisse y Johnsen, 2011). Los biomecanismos de articulación de las valvas han sido descritos con detalle, con un modelo en que se investiga la optimización entre movilidad y protección (Connors *et al.*, 2012). En diferentes estudios la disolución de las mismas bajo hipercapnia ha sido observada (Rodolfo-Metalpa *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2013).

## Motivación del proyecto y objetivos

Dadas las circunstancias del convenio de Doble Titulación Internacional US-UNAM (Universidad de Sevilla-Universidad Nacional Autónoma de México) surgió la oportunidad de realizar mi proyecto fin de Máster con el Doctor José Luís Carballo Cenizo por parte de la maestría en Ciencia Biológicas con escaso margen de maniobra, por ello los objetivos generales del mismo son los siguientes:

- 1) Evaluar de qué forma afecta la acidificación oceánica a las estructuras de carbonato cálcico, en especial a la resistencia y plasticidad.
- 2) Estudiar cómo afecta la acidificación oceánica a la supervivencia de *Chiton articulatus*.
- 3) Puesta a punto de las instalaciones de monitorización del cambio climático en ambientes controlados, del Laboratorio de Ecología del Bentos, situado en la Unidad académica Mazatlán y perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 4) Explorar fortalezas y debilidades de los sistemas de monitorización del cambio climático en ambientes controlados.

## Marco metodológico

### Recolección y aclimatación previa al experimento

Se recolectaron 60 individuos de *Chiton articulatus* en una zona cercana al faro de Mazatlán (23°10'38.14"N, 106°25'30.89"O) (Figura 2), en Sinaloa, México. La recolección fue realizada en marzo de 2016 (Abadía-Chanona, Avila-poveda y Arellano Martinez, 2014; Abadía-Chanona *et al.*, 2016), y los individuos se introdujeron en estanques de aclimatación a un pH de 8.1 aproximadamente. En estos acuarios fueron mantenidos por al menos 10 días con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y renovación constante de agua. La longitud de los individuos era de entre 20 y 30 mm, es decir, propia de estadio subadulto (Avila-poveda y Abadía-Chanona, 2013).

### Aclimatación

Se realizaron dos tipos de aclimatación. El primero de ellos sometió a los individuos recolectados a las condiciones que iban a tener durante el experimento pero sin el decremento del pH, es decir, con las placas de alimentación y el fotoperiodo constante en sus estanques de experimentación. Durante este proceso estuvieron monitorizadas 10 días, como se ha comentado anteriormente. El segundo tipo consistió en llevar cada uno de los tratamientos al pH objetivo. El ratio que se usó para ello fue de 0.1-0.15 unidades de pH máximo diario, por lo que se requirieron 4 días para alcanzar estas condiciones y contar como el inicio del experimento.

### Diseño experimental

Se usaron dos tratamientos y un control, uno de ellos a pH 7.8 o tratamiento 1 (TA1) simulando las condiciones que se esperan en 2100 (IPCC, 2000; Queirós *et al.*, 2015), el otro a pH 7.5 o tratamiento 2 (TA2) que son las predichas para el año 2200 (IPCC, 2000), y por último el control se mantuvo a pH 8.1.

Para cada uno de los tratamientos se dispusieron de 4 estanques-réplicas por lo que se contó con un total de 12 estanques experimentales (Figura 3, Figura 4).

De forma previa al comienzo del experimento se midieron todos los ejemplares. Los parámetros que se recogieron fueron longitud antero-posterior y lateral. Después se distribuyeron los individuos de forma aleatoria en cada uno de los estanques-réplicas. Finalmente, el número de individuos por estanque fue 5.

### Condiciones experimentales y medición de variables

En cuanto a las condiciones del experimento, se puede observar (Figura 3, Figura 4) la disposición de los estanques y a qué nivel se introduce el CO<sub>2</sub> puro por insuflación. El CO<sub>2</sub> fue introducido por pulsos proporcionales en un rango determinado, consiguiéndose de este modo un control exhaustivo del pH en cada uno de los tratamientos. El control del pH y la insuflación diferencial fueron realizados de forma automática y digital Signet 9900 junto con sus medidores



y controladores accesorios El programa de insuflación que se usó en el equipo estaba basado en pulsos de insuflación proporcional, es decir, conforme el valor del pH del tanque se elevaba con respecto al valor fijado, la frecuencia de pulsos de CO<sub>2</sub> aumentaba hasta que volviera a alcanzar el valor fijado.

A pesar del registro automático continuo del pH por parte del equipo citado, adicionalmente se registró de forma automática la temperatura y la luminosidad cada 30 minutos a lo largo de todo el experimento por medio de HOBOS<sup>®</sup> Data Loggers colocados en cada uno de los estanques-réplicas, y por otra parte también se registró diariamente el pH, la temperatura, la salinidad, la conductividad y también se calculó la alcalinidad total.

El pH se registró con Thermo scientific Orion Star<sup>™</sup> A221, aportando una resolución de milésimas de unidades de pH. Para asegurar que los valores obtenidos fueran fidedignos se realizó una calibración diaria previa experimentación. Este instrumento también midió temperatura, con una resolución de décimas de grado, lo que sirvió para verificar o corregir los valores de los HOBOS<sup>®</sup> Data Loggers.

Los datos de salinidad y de conductividad se obtuvieron mediante YSI pro30 que aportó también valores de temperatura con resolución de décimas de grado que sirvieron para revalidar los datos anteriores.

La alcalinidad, se midió de forma indirecta por el método desarrollado por Strickland & Parsons (1972), pero visto en Grasshoff *et al.* (1983); En este procedimiento se obtuvo el valor de alcalinidad para una muestra de agua de la con una balanza de precisión en la que se pesaron 25 gramos de ácido clorhídrico (HCl) a 0.0100 N, a lo que se añadieron 100 gramos de agua de muestra, obteniéndose un valor de pH, tras la mezcla, se le aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad total} = (2.5 - (1250 * \text{antilog}(\text{pH})) / fH) * 1000$$

Siendo fH el coeficiente de actividad, constante cuyo valor depende de la salinidad; en este caso el valor usado es 0.758.

El cálculo de los parámetros relacionados con el CO<sub>2</sub> se realizó mediante el programa CO2SYS v2.1 (Lewis y Wallace, 1998). El cual, a partir de dos parámetros conocidos relacionados con CO<sub>2</sub>, puede calcular los otros tres. Además el programa también calcula el estado de saturación y la concentración de distintas especies de carbono. Los parámetros seleccionados en el programas son los valores de K1 y K2 de Mehrbach *et al.*, (1973) reajustado por Dickson y Millero (1987), el cloruro de potasio se tomó el de Dickson, se seleccionó la escala de pH marina y el valor de [B] de Uppstrom, (1974).

En cuanto a las condiciones experimentales, el agua de mar filtrada (Figura 3) fue obtenida por depuración que se realizó de forma pasiva por un filtro de arena natural. El pozo está situado en la costa y el agua se introdujo al reservorio principal hasta llenarlo en cada marea alta ( $\pm 2$  horas) por medio de una bomba (Figura 2).

La alimentación de los individuos, está se realizó mediante la colocación en los estanques-réplicas de placas de PVC de 10x10 cm previamente marinizadas y sumergidas durante al menos 10 días (Figura 5), las placas se incluyeron a demanda.

Al terminar el experimento los individuos se relajaron (Geiger *et al.*, 2007; Abadia-Chanona, Avila-Poveda y Arellano Martinez, 2014), este procedimiento se fue realizando con la adición de pequeños volúmenes de agua dulce hasta sustituir gran parte del agua salada, después se repitió el mismo proceso pero añadiendo alcohol al 92% en vez de agua, a continuación se conservaron en alcohol al 96%. Para la extracción de las placas dorsales y rádulas se aplicaron técnicas descritas por otros autores (Geiger *et al.*, 2007; Avila-Poveda, 2013; Abadia-Chanona, Avila-poveda y Arellano Martinez, 2014) y el doctor Ávila-Poveda mostró personalmente la correcta realización de la disección.

Las placas se sometieron a diversas pruebas. Con el objetivo de averiguar si la fragilidad de las placas variaba con el tratamiento de acidificación se usó un probador de ensayos tensión-compresión (Laboratorio de Mecánica y Micromecánica de sólidos, Instituto de Investigación de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México). Para ello, una celda de carga ejercía una fuerza de 110 newtons a una velocidad de 0.16 mm/s sobre una de las placas hasta conseguir la rotura de la misma (Figura 6) tomándose datos del desplazamiento realizado y de la fuerza ejercida sobre la celda de carga.

Con anterioridad a la aplicación de los ensayos de tensión-compresión se midió el grosor por los dos extremos de la valva y la longitud de la misma mediante un Micrómetro Mitutoyo Absolute con resolución de 0.001 mm (Figura 7), y un calibre electrónico de la misma marca con resolución de 0.01 mm.

Los datos se pretrataron, trataron y analizaron. Así, se obtuvo finalmente la fuerza máxima ejercida para la rotura, término que denominaremos Fuerza (F), la plasticidad de la placa (P), esta última se ha calculado teniendo en cuenta la distancia recorrida con respecto a la fuerza relativizada al tamaño de la valva.

### **Análisis estadísticos**

Se han realizado comparaciones múltiples de variables de diversa índole en cuanto al tratamiento de acidificación; entre el tratamiento control y el tratamiento con pH a 7.8 (de aquí en adelante TA1), y entre esos dos y el tratamiento a pH 7.5 (de aquí en adelante TA2). A las

variables se les aplicó un Modelo Lineal Generalizado (MLG) univariado introduciendo como factor fijo el tratamiento de acidificación, y dependiendo de la homocedasticidad de los residuos de la variable dependiente se usó un test u otro; si no había homocedasticidad en la varianza residual se usó el test posthoc de Games-Howell, en caso contrario se usó el test de HSD de Tukey. Para todos los análisis el programa utilizado fue IBM SPSS Statistics v23.

## Resultados y discusión

Diversas variables fueron analizadas durante este estudio:

La primera variable que se fijó durante el experimento fue el pH, la cual se ha medido de dos formas: 1) Medición diaria con el pH-metro Thermo scientific Orion Star™ A221, y 2) Mediante la medición continua con Signet 9900 y sus accesorios, los tratamientos se acoplaron al diseño del experimento y fueron significativamente diferentes entre sí ( $p=0.000$ ) (Figura 8, Tabla 1).

Otra variable que estuvo sujeta a un registro continuo, fue la temperatura del agua (Tabla 2). Hubo diferencias significativas a lo largo de este experimento, pero como se expone (Figura 9) las diferencias fueron mínimas. Esto probablemente fue debido a la posición de cada tratamiento respecto al aire acondicionado del cuarto experimental. El control estaba en torno a 45° y de forma paralela al flujo de aire laminar, el TA1 estaba entre 30° y 45° con respecto a la máquina pero de forma perpendicular, y por último, el TA2 estaba a cubierto del flujo de aire por lo que la temperatura era más elevada. Los HOBO® Data Loggers refuerzan dicha hipótesis (Figura 10). Otra posible hipótesis a esta variación en la temperatura pudo ser por el tiempo de resiliencia del agua, es decir, mientras más tiempo estuviera el agua en el cuarto se alcanzaban temperaturas más bajas. Sin embargo, ello no debe haber afectado porque el flujo en cada acuario se reguló para que fuera lo más similar posible a los demás. Estos resultados nos proporcionan una información útil de la precisión de los datos que se han tomado pero en este caso, debido a las diferencias tan mínimas que se produjeron no debieron afectar a la experimentación. Otros estudios contemplaron la temperatura junto con la acidificación y sólo los tratamientos más dispares (10 °C de diferencia) obtuvieron diferencias significativas (Sigwart y Carey, 2014).

La salinidad fue otra variable registrada diariamente, en esta ocasión se dieron diferencias significativas entre TA1 y TA2, y entre control y TA2 pero no se dieron entre control y TA1 (Tabla 3), aunque, al igual que en el caso anterior, las diferencias fueron mínimas, sin alcanzar los 0.05 ppmv. En esta ocasión la causa de las diferencias es desconocida, pudo haberse provocado por alguna interacción de las sales con algún compuesto de carbono, o bien con la temperatura ya que sigue el mismo patrón y esta tiene una fuerte relación con la salinidad.

Las tres variables relacionadas con la química del carbono fueron la presión parcial de CO<sub>2</sub>, la concentración de iones bicarbonatos, y el estado de saturación para la aragonita.

La presión parcial de CO<sub>2</sub> (Tabla 4) aumentó de forma significativa a medida que se incrementó la acidificación. Estos resultados cumplen con las condiciones experimentales y corrobora otros estudios sobre acidificación oceánica (Fabry *et al.*, 2008).

Por otra parte, las concentraciones de iones carbonato tuvo una relación inversamente proporcional respecto a la acidificación, es decir, conforme la acidificación era mayor había menor concentración de iones carbonato (Tabla 5, Figura 11), pero lo importante es que este ion es vital para la acción de los calcificadores (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007).

Respecto a las variables dependientes de la química del carbono, el estado de saturación de la aragonita varió significativamente dependiendo del tratamiento, esta variable disminuyó conforme el pH también lo hacía. Cabe recordar dos apuntes sobre esta variable: 1) El agua obtenida de la simulación es agua a nivel superficial, y por eso es uno de los primeros escenarios en sufrir los efectos de la acidificación oceánica (Tabla 6, Figura 12); 2) Los valores por debajo de 1 indican una subsaturación de la aragonita.

En cuanto a la fuerza aplicada (F) para provocar la rotura de las placas, si se usan los datos brutos, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), pero esto no nos da una información útil ya que la fuerza de rotura va a depender de otros factores como la longitud y el grosor. Sin embargo, si realizamos un tratamiento estadístico de los datos elevándolo al cuadrado, obtenemos que a pesar de que no haya normalidad ni homocedasticidad de los datos en cuanto a la variable dependiente “Fuerza aplicada”; al aplicar el test (Tabla 7), se obtuvo que el tratamiento control difirió significativamente del TA1 ( $p = 0.013$ ), pero no con respecto al del TA2 ( $p = 0.112$ ). Entre los dos tratamientos de acidificación tampoco hubo diferencias significativas ( $p = 0.580$ ), lo que seguramente se debió a la dispersión que tiene el tratamiento control.

Para cumplir las premisas del experimento en cuanto a la aleatoriedad de la colocación de los quitones, se analizó también la longitud de las placas con respecto al tratamiento. Se colocó, en esta ocasión, como variable dependiente a la “longitud”; los datos de esta variable son normales y homocedásticos. Al enfrentar los tratamientos no se dieron diferencias significativa en ninguno de los casos ( $p > 0.8$ ) (Tabla 8).

Tras la toma de datos, con la intención de conseguir una variable que neutralice la relación entre longitud (L) y grosor medio (G) de la placa, se creó un variable  $LG = L/G$ , siendo esta una variable adimensional que no tiene normalidad pero sí homocedasticidad. A esta variable LG se le aplicó un HSD Tukey, en estas comparaciones no hubo diferencias significativas entre el

control y TA1 ( $p=0.997$ ), pero sí las hubo con respecto al TA2 ( $p=0.026$ ), por otra parte el test también arrojó diferencias significativas entre los tratamientos acidificados ( $p=0.038$ ) (Tabla 9).

Continuando con el análisis, a partir de la variable anterior y la variable “Fuerza aplicada”, se creó otra variable denominada  $FLG = F/(L/G)$ , que relaciona cada morfología de la placa a la fuerza aplicada para su rotura de forma individual. Esta variable no tiene distribución normal ni presenta homogeneidad en la varianza; a esta variable se le aplicó un MLG con un posthoc de Games-Howell, este test arrojó algunas diferencias marginales, es decir, no fueron significativas pero estuvieron próximas a serlo; una de esas diferencias fue entre el control y TA1 ( $p=0.060$ ), aunque menos también hubo diferencias marginales entre el control y TA2 ( $p=0.095$ ). Por último entre los tratamientos de acidificación no hubo diferencias significativas ( $p=1$ ) (Tabla 10).

Después, se realizó una transformación y se elevó al cuadrado la variable FLG, denominándose ahora FLG2, al aplicar el test de Games-Howell, este test arrojó diferencias significativas donde antes eran marginales, entre con control y TA1 ( $p=0.024$ ), también se dieron entre control y TA2 ( $p=0.045$ ), sin embargo, como en el caso anterior, no las hubo entre los tratamientos acidificados ( $p=0.959$ ) (Tabla 11).

Otra variable que se obtuvo fue la plasticidad (P), no en su definición física sino como un término que transmite una relación entre FLG y la distancia recorrida durante el proceso de rotura. Se calculó mediante la expresión  $(Fuerza / (Longitud/Grosor))/distancia$  (Tabla 12) y en este caso las diferencias se sucedieron igual que en el FLG2, el test arrojó diferencias significativas entre el control y TA1 ( $p=0.004$ ), e igual al compararlo con TA2 ( $p=0.045$ ), pero esas diferencias no se dieron entre los tratamientos acidificados ( $p=0.684$ ).

Por último, la supervivencia por tratamiento también fue diferente al realizar un análisis estadístico se dieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos acidificados, en el control la supervivencia media fue de  $0.95 \pm 0.1$ , de los 20 individuos del tratamiento solo se murió uno y fue en el último día, esto se pudo deber a una bajada de pH que se produjo en ese día por causas desconocidas, en TA1 la media de supervivencia fue de  $0.65 \pm 0.1$  y por último en el TA2 la supervivencia media fue de  $0.55 \pm 0.19$ ; entre estos dos últimos tratamientos no se obtuvieron diferencias significativas (Tabla 13, Figura 13).

Aunque no se realizó un estudio colorimétrico, se evidenció un cambio brusco en la coloración virando para blancuzco-grisáceo, esto puede evidenciar una pérdida de la capa superior de la concha (periostraco) de naturaleza proteica, dejando al descubierto la capa formada por carbonato cálcico (ostraco) (Figura 14, Figura 15).

Respecto a la mejora del diseño experimental, en estudios previos se observó que la rádula no se ve afectada por la acidificación y que no se observaron signos de disolución en las valvas (Sigwart y Carey, 2014), aunque hay que destacar algunas diferencias entre ambos experimentos, la primera de ellas es que el organismo de estudio en el caso del artículo es un quitón bentónico de relativa profundidad (30-40m), y que el número de especímenes por tratamiento fue, en el mejor de los casos, la mitad del número contemplado para el presente trabajo, este hecho quizás pudo enmascarar algunas diferencias que permanecieron encriptadas al análisis estadístico, además la especie estudiada en ese caso pertenece a la familia Leptochitonidae y en el que se presenta en este trabajo a la familia Chitonidae.

La principal debilidad de este tipo de experimentos de corta duración es no permitir conocer cómo va a afectar el fenómeno de acidificación oceánica realmente. El tipo de estudio que se ha realizado es un estudio comparativo que intenta dilucidar los efectos y consecuencias que van a tener en nuestras aguas este tipo de organismos, pero no se tiene en cuenta la posible adaptación que se pueda dar a lo largo de las generaciones.

Con el fin de mejorar el diseño experimental, se proponen dos protocolos experimentales nuevos: 1) Marcar de los ejemplares de forma individual para que sean reconocibles (e incluso videovigilados) con inclusión de las variables medidas antes y después del experimento; se debería estudiar el peso con una balanza de precisión, de forma que sepamos exactamente los cambios que han acontecido durante el experimento; 2) Estimar la tasa de calcificación sin tener en cuenta el efecto del metabolismo celular, es decir, mantener en los tratamientos no sólo los animales sino un peso dado en las valvas de los poliplacóforos, así como realizar las mediciones pertinentes antes y después del experimento.

Las pruebas que faltan para completar el experimento se pueden resumir en tres experimentos: el primero es estudiar mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) las valvas de los quitones, no sólo la zona alrededor de los aesthetes sino también los puntos de rotura que surgieron en el experimento de resistencia; el segundo trataría de realizar un estudio de las rádulas de forma exhaustiva al SEM; y por último, realizar un experimento de transcriptómica diferencial.

Con el estudio de transcriptómica se pretende cumplir tres objetivos fundamentales: 1) Identificar los genes que se activan y reprimen ante una situación estresante de acidificación de nivel moderado y fuerte; 2) Cuantificar la expresión de los mismos y realizar una comparativa con los controles; 3) Una vez identificados y cuantificados los genes alterados, agruparlos por las funciones que desempeñan en el organismo y deducir las consecuencias metabólicas y costes asociados.

## Conclusiones

Como conclusión general se han cumplido los objetivos del proyecto, ampliando el conocimiento científico sobre la acidificación oceánica, la afección a las estructuras calcáreas y el estudio en ambientes controlados. Además se proponen experimentos a realizar próximamente con la intención de generar más información vista a publicación en una revista indexada en la categoría Q1.

## Bibliografía

Abadía-Chanona, Q. Y. (2015) *Maduración gonádica, ciclo reproductivo y talla de madurez sexual del quiton Chiton articulatus (Mollusca: Polyplacophora) de la costa rocosa de Puerto Ángel, Oaxaca, México*. Instituto Politécnico Nacional.

Abadia-Chanona, Q. Y., Avila-poveda, O. H. and Arellano Martinez, M. (2014) ‘Protocol for relaxation, fixation and dissection of polyplacophora gonad for histological and morphological studies’, *Paper, Conference*. doi: 10.13140/2.1.5102.1765.

Abadía-Chanona, Q. Y., Avila-Poveda, O. H., Arellano Martinez, M. and Ceballos-Vázquez, B. P. (2016) ‘Observation and establishment of gonad development stages in polyplacophorans ( Mollusca ): Chiton ( Chiton ) articulatus a case study a case study’, *Acta Zoologica (Stockholm)*, 97, pp. 506–521. doi: 10.1111/azo.12165.

Avila-Poveda, O. H. (2013) ‘Annual Change in Morphometry and in Somatic and Reproductive Indices of Chiton articulatus Adults (Polyplacophora: Chitonidae) from Oaxaca, Mexican Pacific’, *American Malacological Bulletin*, 31(1), pp. 65–74. doi: 10.4003/006.031.0118.

Avila-poveda, O. H. and Abadía-Chanona, Q. Y. (2013) ‘Emergence , Development , and Maturity of the Gonad of Two Species of Chitons “ Sea Cockroach ” ( Mollusca : Polyplacophora ) through the Early Life Stages’, *PLoS ONE*, 8(8), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0069785.

Bates, N. R., Astor, Y. M., Church, M. J., Currie, K., Dore, J. E., González-Dávila, M., Lorenzoni, L., Muller-Karger, F., Olafsson, J. and Santana-Casiano, J. M. (2014) ‘A Time-Series View of Changing Ocean Chemistry Due to Ocean Uptake of Anthropogenic CO<sub>2</sub> and Ocean Acidification’, *Oceanography*, 27(1), pp. 126–141. doi: 10.5670/oceanog.2014.16.

Beniash, E., Ivanina, A., Lieb, N. S., Kurochkin, I. and Sokolova, I. M. (2010) ‘Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*’, *Marine Ecology Progress Series*, 419, pp. 95–108. doi: 10.3354/meps08841.

Bensoussan, N., Romano, J. C., Harmelin, J. G. and Garrabou, J. (2010) ‘High resolution characterization of northwest Mediterranean coastal waters thermal regimes: To better understand responses of benthic communities to climate change’, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*,

87(3), pp. 431–441. doi: 10.1016/j.ecss.2010.01.008.

Brooker, L. R., Lee, A. P., Macey, D. J., Bronswijk, W. Van and Webb, J. (2003) ‘Multiple-front iron-mineralisation in chiton teeth ( *Acanthopleura echinata*: Mollusca: Polyplacophora )’, *Marine Biology*, 142, pp. 447–454. doi: 10.1007/s00227-002-0957-8.

Burnell, O. W., Russell, B. D., Irving, A. D. and Connell, S. D. (2013) ‘Eutrophication offsets increased sea urchin grazing on seagrass caused by ocean warming and acidification’, *Marine Ecology Progress Series*, 485, pp. 37–46. doi: 10.3354/meps10323.

Caldeira, K. and Wickett, M. E. (2003) ‘Anthropogenic carbon and ocean pH’, *Nature*, 425, p. 1.

Caldeira, K. and Wickett, M. E. (2005) ‘Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean emissions to the atmosphere and ocean’, *Journal of Geophysical Research*, 110, pp. 1–12. doi: 10.1029/2004JC002671.

Comeau, S., Jeffree, R., Teyssié, J. L. and Gattuso, J. (2010) ‘Response of the Arctic Pteropod *Limacina helicina* to Projected Future Environmental Conditions’, *PLoS ONE*, 5(6), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0011362.

Connor, N. E. O., Bracken, M. E. S., Crowe, T. P. and Donohue, I. (2015) ‘Nutrient enrichment alters the consequences of species loss’, *Journal of Ecology*, 103, pp. 862–870. doi: 10.1111/1365-2745.12415.

Connors, M. J., Ehrlich, H., Hog, M., Godeffroy, C., Araya, S., Kallai, I., Gazit, D., Boyce, M. and Ortiz, C. (2012) ‘Three-dimensional structure of the shell plate assembly of the chiton *Tonicella marmorea* and its biomechanical consequences’, *Journal of Structural Biology*, 177(2), pp. 314–328. doi: 10.1016/j.jsb.2011.12.019.

Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A. and Townsend Peterson, A. (2000) ‘Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model’, *Nature*, 408, pp. 184–187.

Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. and Kleypas, J. A. (2009) ‘Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem’, *Annual Review of Marine Science*, 1(1), pp. 169–192. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163834.

Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. and Kleypas, J. A. (2009) ‘Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem’, *Annual Review of Marine Science*, 1(1), pp. 169–192. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163834.

Doney, S. C., Ruckelshaus, M., Duffy, J. E., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N. N., Sydeman,



- W. J. and Talley, L. D. (2012) 'Climate change impacts on marine ecosystems', *Annual Review of Marine Science*, 4, pp. 11–37. doi: 10.1146/annurev-marine-041911-111611.
- Dore, J. E., Lukas, R., Sadler, D. W., Church, M. J. and Karl, D. M. (2009) 'Physical and biogeochemical modulation of ocean acidification in the central North Pacific', *PNAS*, 106(30), pp. 12235–12240. doi: www.pnas.org/cgi/doi.10.1073/pnas.0906044106.
- Duarte, C. M., Hendriks, I. E., Moore, T. S., Olsen, Y. S., Steckbauer, A., Ramajo, L., Carstensen, J., Trotter, J. A. and McCulloch, M. (2013) 'Is Ocean Acidification an Open-Ocean Syndrome? Understanding Anthropogenic Impacts on Seawater pH', *Estuaries and Coasts*, 36, pp. 221–236. doi: 10.1007/s12237-013-9594-3.
- Fabry, V., Seibel, B., Feely, R. and Orr, J. (2008) 'Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes', *ICES Journal of Marine Science*, 65, pp. 414–432. doi: 10.1093/icesjms/fsn048.
- Feely, R. A., Doney, S. C. and Cooley, S. R. (2009) 'Ocean Acidification: Present Conditions and Future Changes in a High-CO<sub>2</sub> World', *Oceanography*, 22(4), pp. 36–47. doi: 10.5670/oceanog.2009.95.
- Feely, R. a, Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J. and Millero, F. J. (2004) 'Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans', *Science*, 305, pp. 362–366. doi: 10.1126/science.1097329.
- Ferreira, J. A. (1983) 'The Chiton Fauna of the Revillagigedo Archipelago, Mexico BY', *The Veliger*, 25(4), pp. 307–322.
- Floch, M. Le, Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K. and Stocker, T. F. (2008) 'High-resolution carbon dioxide concentration record', *Nature*, 453, pp. 379–382. doi: 10.1038/nature06949.
- Fortunato, H. (2015) 'Mollusks: Tools in Environmental and Climate Research Mollusks', *American Malacological Society*, 33(2), pp. 1–15. doi: 10.4003/006.033.0208.
- Gazeau, F., Gattuso, J., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., Heip, C. H. R., Umr, D. V., Cedex, V., Curie-paris, P. M. and Oc, O. (2010) 'Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*', *Biogeosciences*, 7, pp. 2051–2060. doi: 10.5194/bg-7-2051-2010.
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., P??rtner, H. O. and Ross, P. M. (2013) 'Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs', *Marine Biology*, 160(8), pp. 2207–2245. doi: 10.1007/s00227-013-2219-3.

Geiger, D. L., Marshall, B. A., Ponder, W. F., Sasaki, T. and Waren, A. (2007) 'Techniques for collecting, handling, preparing, storing and examining small molluscan specimens', *Molluscan Research*, 27(1), pp. 1–45.

Gordon, L. M. and Joester, D. (2011) 'Nanoscale chemical tomography of buried organic-inorganic interfaces in the chiton tooth.', *Nature*, 469, pp. 194–197. doi: 10.1038/nature09686.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. (1983) *Methods of Seawater Analysis*.

Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., S., S. R., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A. and Hatziolos, M. E. (2007) 'Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification', *Science*, 318, pp. 1737–1743.

IPCC (2000) *IPCC Special Report ,Summary for policymakers, Emissions Scenarios, Intergovernmental Panel on Climate Change*.

Kocot, K. M., Cannon, J. T., Todt, C., Citarella, M. R., Kohn, A. B., Meyer, A., Santos, S. R., Schander, C., Moroz, L. L., Lieb, B. and Halanych, K. M. (2011) 'Phylogenomics reveals deep molluscan relationships', *Nature*, 477, pp. 452–456. doi: 10.1038/nature10382.

Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajos, L., Singh, G. S., Duarte, C. M. and Gattuso, J. (2013) 'Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming', *Global Change Biology*, 19, pp. 1884–1896. doi: 10.1111/gcb.12179.

Lee, A. P., Brooker, L. R., Macey, D. J., Bronswijk, W. Van and Webb, J. (2000) 'Apatite Mineralization in Teeth of the Chiton *Acanthopleura echinata*', *Calcified Tissue International*, 67, pp. 408–415. doi: 10.1007/s002230001156.

Lewis, E. and Wallace, D. (1998) 'Program developed for CO<sub>2</sub> system calculations', *Carbon Dioxide Information Analysis Center - Oak Ridge National Laboratory*, pp. 1–21. doi: 4735.

Macey, D. J. and Brooker, L. R. (1996) 'The Junction Zone: Initial Site of Mineralization in Radula Teeth of the Chiton *Cryptoplax striata* ( Mollusca: Polyplacophora )', *Journal of morphology*, 42, pp. 33–42.

Marchant, H. K., Calosi, P. and Spicer, J. I. (2010) 'Short-term exposure to hypercapnia does not compromise feeding, acid-base balance or respiration of *Patella vulgata* but surprisingly is accompanied by radula damage', *Journal of Biological Association of the United Kingdom*, 90(7), pp. 1379–1384. doi: doi:10.1017/S0025315410000457.

Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y., Kerros, M., Oberhänsli,

- F., Teyssié, J., Jeffree, R. and Gattuso, J. (2011) 'Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO<sub>2</sub>-driven acidification', *The Journal of experimental biology*, 204, pp. 1357–1368. doi: 10.1242/jeb.051169.
- Millero, F. J. (2007) 'The Marine Inorganic Carbon Cycle', *Chemical Reviews*, 107, pp. 308–341.
- Morse, J. W., Arvidson, R. S. and Lüttge, A. (2007) 'Calcium carbonate formation and dissolution', *Chemical Reviews*, 107(2), pp. 342–381. doi: 10.1021/cr050358j.
- Mucci, A. (1983) 'The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure', *American Journal of Science*, 283, pp. 780–799. doi: 10.2475/ajs.283.7.780.
- Nienhuis, S., Palmer, A. R., Harley, C. D. G. and Tg, C. (2010) 'Elevated CO<sub>2</sub> affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail', *Proceedings of Royal Society Biological Sciences*, 277, pp. 2553–2558. doi: 10.1098/rspb.2010.0206.
- Okusu, A., Schwabe, E., Eernisse, D. J. and Giribet, G. (2003) 'Towards a phylogeny of chitons (Mollusca, Polyplacophora) based on combined analysis of five molecular loci', *Organisms Diversity & Evolution*, 3, pp. 281–302.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Feely, R. A., Doney, S. C., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G.-K., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y. and Yool, A. (2005) 'Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms', *Nature*, 437(29), pp. 681–686. doi: 10.1038/nature04095.
- Pearson, P. N. and Palmer, M. R. (2000) 'Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years', *Nature*, 406, pp. 695–699.
- Peng, T. (2005) 'Anthropogenic CO<sub>2</sub> in the ocean', *Scientia Marina*, 69, pp. 85–96.
- Puchalski, S. S., Eernisse, D. J. and Johnson, C. (2008) 'The effect of sampling bias on the fossil record of chitons (Mollusca, Polyplacophora)', *American Malacological Bulletin*, 25, pp. 87–95. doi: 10.4003/0740-2783-25.1.87.
- Queirós, A. M., Fernandes, J. A., Faulwetter, S., Nunes, J., Rastrick, S. P. S., Mieszkowska, N., Artioli, Y., Yool, A., Calosi, P., Arvanitidis, C., Findlay, H. S., Barange, M., Cheung, W. W. L. and Widdicombe, S. (2015) 'Scaling up experimental ocean acidification and warming research: From individuals to the ecosystem', *Global Change Biology*, 21(1), pp. 130–143. doi: 10.1111/gcb.12675.

- Ridgwell, A. and Schmidt, D. N. (2010) 'Past constraints on the vulnerability of marine calcifiers to massive carbon dioxide release Past constraints on the vulnerability of marine calcifiers to massive carbon dioxide release', *Nature geoscience*, pp. 1–5. doi: 10.1038/ngeo755.
- Ries, J. B., Cohen, A. L. and Mccorkle, D. C. (2009) 'Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification', *Geological Society of America*, 37(12), pp. 1131–1134. doi: 10.1130/G30210A.1.
- Rodolfo-Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F. P., Jeffree, R., Fine, M., Foggo, A., Gattuso, J. and Hall-Spencer, J. M. (2011) 'Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming', *Nature Climate Change*, 1(9), pp. 308–312. doi: 10.1038/nclimate1200.
- Rosenberg, G. (2014) 'A New Critical Estimate of Named Species- Level Diversity of the Recent Mollusca', *American Malacological Bulletin*, 32(2), pp. 308–322. doi: <http://dx.doi.org/10.4003/006.032.0204>.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C. S., Wallace, D. W. R., Tilbrook, B., Millero, F. J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T. and Rios, A. F. (2004) 'The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>.', *Science*, 305, pp. 367–371. doi: 10.1126/science.1097403.
- Shaw, J. A., Macey, D. J., Brooker, L. R. and Clode, P. L. (2010) 'Tooth Use and Wear in Three Iron-Biomineralizing Mollusc Species', *Biological Bulletin*, 218, pp. 132–144.
- Sigwart, J. D. and Carey, N. (2014) 'Grazing under experimental hypercapnia and elevated temperature does not affect the radula of a chiton (Mollusca, Polyplacophora, Lepidopleurida)', *Marine Environmental Research*, 102, pp. 73–77. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.05.004.
- Sigwart, J. D. and Sutton, M. D. (2007) 'Deep molluscan phylogeny: synthesis of palaeontological and neontological data', *Proceedings of Royal Society Biological Sciences*, 274, pp. 2413–2419. doi: 10.1098/rspb.2007.0701.
- Sirenko, B. (2006) 'New outlook on the system of chitons (Mollusca: Polyplacophora)', *Venus*, 65(1–2), pp. 27–49.
- Speiser, D. I., Eernisse, D. J. and Johnsen, S. (2011) 'A Chiton Uses Aragonite Lenses to Form Images', *Current Biology*, 21(8), pp. 665–670. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.033.
- Strickland, J. D. . and Parsons, T. . (1972) *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Journal Fisheries research board of Canada.
- Tejada-Martinez, D., López, D. N., Bonta, C. C., Sepúlveda, R. D. and Valdivia, N. (2016)

‘Positive and negative effects of mesograzers on early- colonizing species in an intertidal rocky-shore community’, *Ecology and Evolution*, 6(16), pp. 5761–5770. doi: 10.1002/ece3.2323.

Thomsen, J., Casties, I., Pansch, C., Körtzinger, A. and Melzner, F. (2013) ‘Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: laboratory and field experiments’, *Global Change Biology*, 19, pp. 1017–1027. doi: 10.1111/gcb.12109.

Vendrasco, M. J., Fernandez, C. Z., Eernisse, D. J. and Runnegar, B. (2008) ‘Aesthete canal morphology in the Mopaliidae ( Polyplacophora )’, *American Malacological Bulletin*, 25, pp. 51–69.

Wang, Q., Weaver, J., Wang, Q., Nemoto, M., Li, D., Weaver, J. C., Weden, B., Stegemeier, J., Bozhilov, K. N., Wood, L. R., Milliron, G. W., Kim, C. S., Dimasi, E. and Kisailus, D. (2013) ‘Phase Transformations and Structural Developments in the Radular Teeth of *Cryptochiton Stelleri*’, *Advanced Functional Materials*, pp. 1–10. doi: 10.1002/adfm.201202894.

## Material suplementario

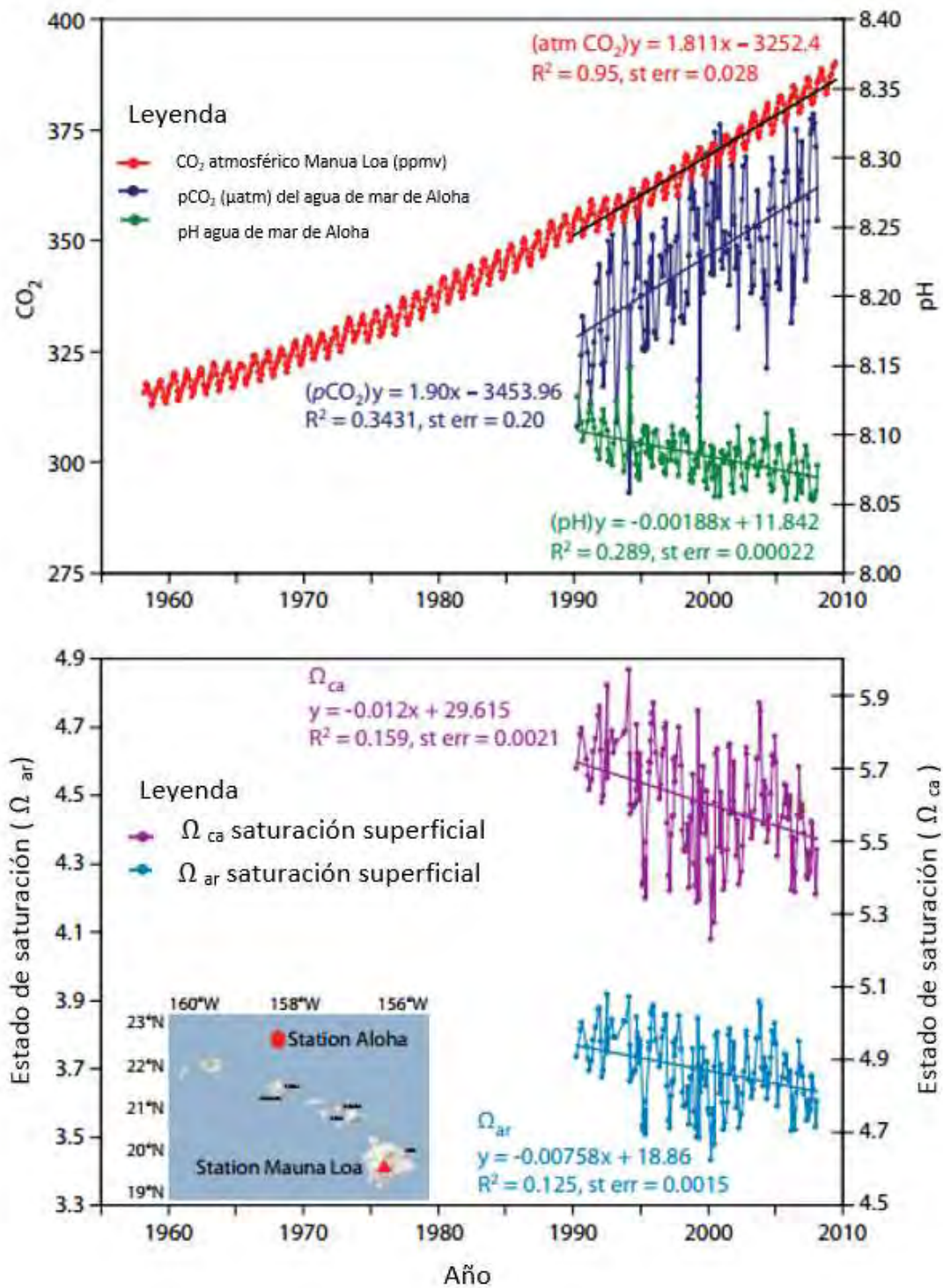


Figura 1: (Arriba) Serie temporal de Manua Loa(ppmv) y pH oceánico y presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) en la Estación Oceánica Aloha en el Norte del Océano Pacífico subtropical. Advertir que el incremento de CO<sub>2</sub> oceánico durante el periodo de observaciones es consistente con el incremento atmosférico en los límites estadísticos de las medidas. (Abajo) Datos de saturación de calcita y aragonita en aguas superficiales. Ver datos en <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Obtenido desde Feely et al. (2009), visto en Scott C. Doney et al. (2009) y en Dore et al. (2009).



Figura 2: Faro de Mazatlán, las marcas muestran el lugar de recolecta de los individuos, el laboratorio donde se realizaron los experimentos y la monitorización y el pozo del cual se tomó agua para el experimento.

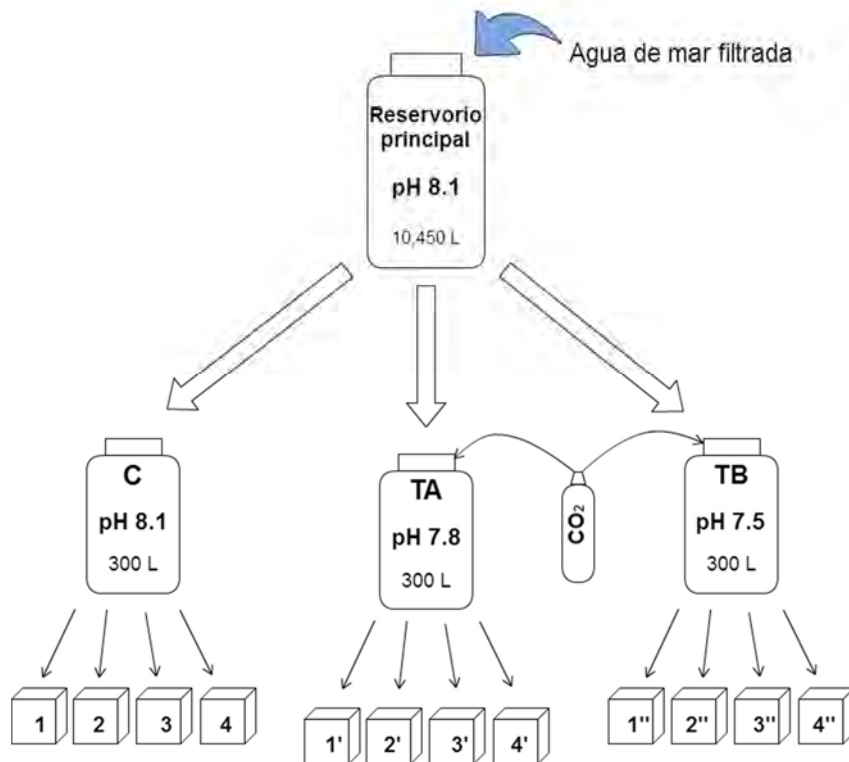


Figura 3: Diagrama del experimento. Control (C) a pH= 8.1, Tratamiento A (TA) con pH a 7.8 y Tratamiento B (TB) con pH a 7.5.

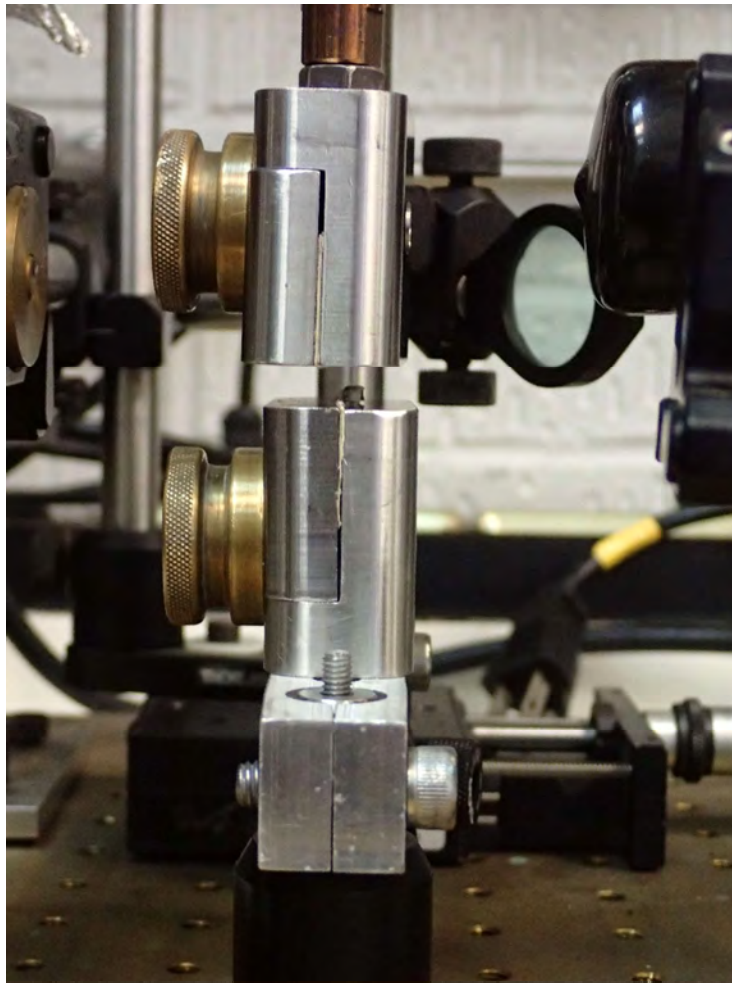


*Figura 4: Laboratorio de cambio climático del grupo de Ecología del Bentos, en la unidad académica Mazatlán perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,*



*Figura 5: Placas de PVC de 10x10cm para alimentación*





*Figura 6: Probador de ensayos tensión-compresión, en medio se visualiza una valva durante el proceso de rotura.*



*Figura 7: Micrómetro Mitutoyo Absolute con resolución de 0.001 mm*

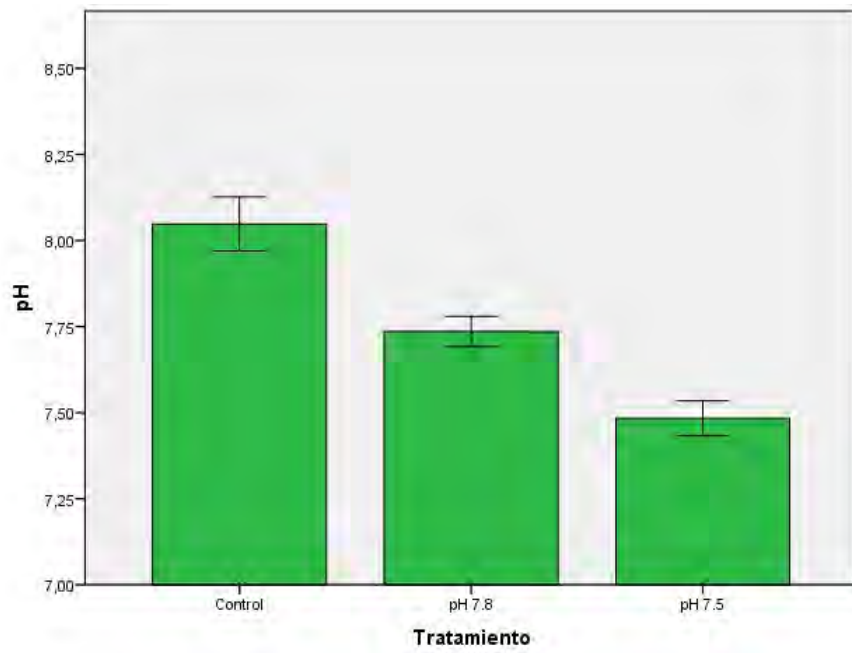


Figura 8: pH a lo largo de 23 días de experimento, media  $\pm$  desviación estándar (SD)

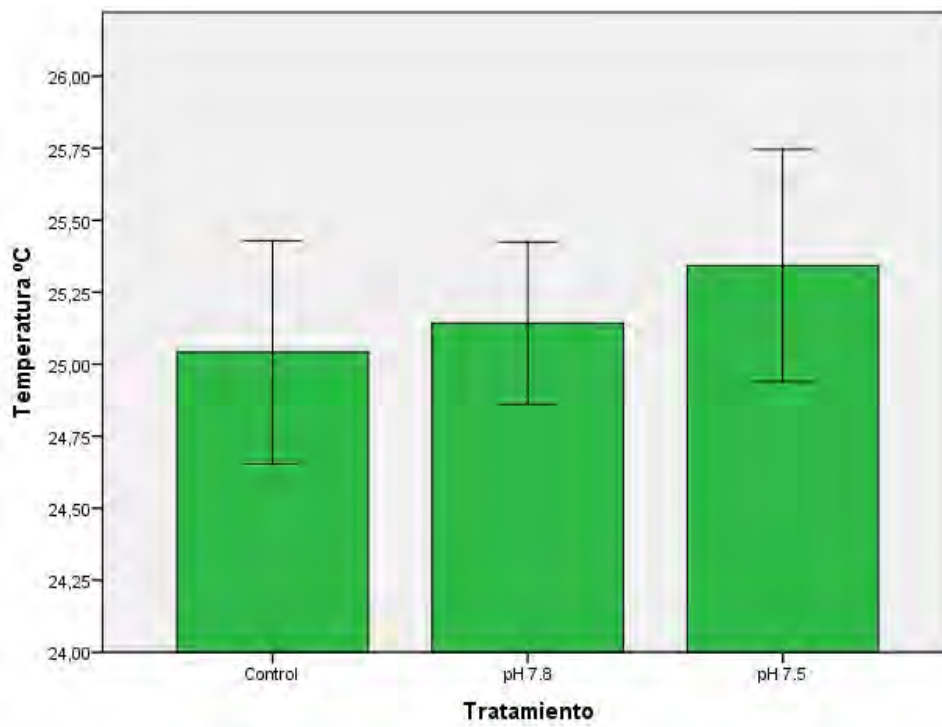


Figura 9: Temperatura (°C) a lo largo de 23 días de experimento por tratamiento, media  $\pm$  desviación estándar (SD)

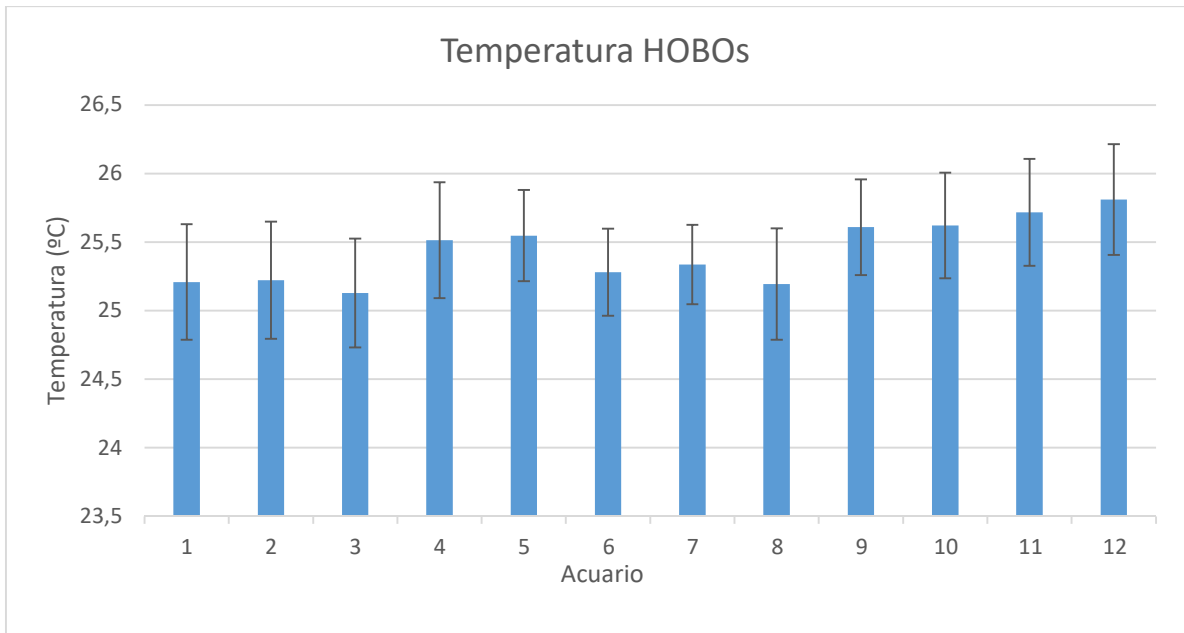


Figura 10: Temperatura (°C) a lo largo de 23 días de experimento por acuario, media  $\pm$  desviación estándar (SD)

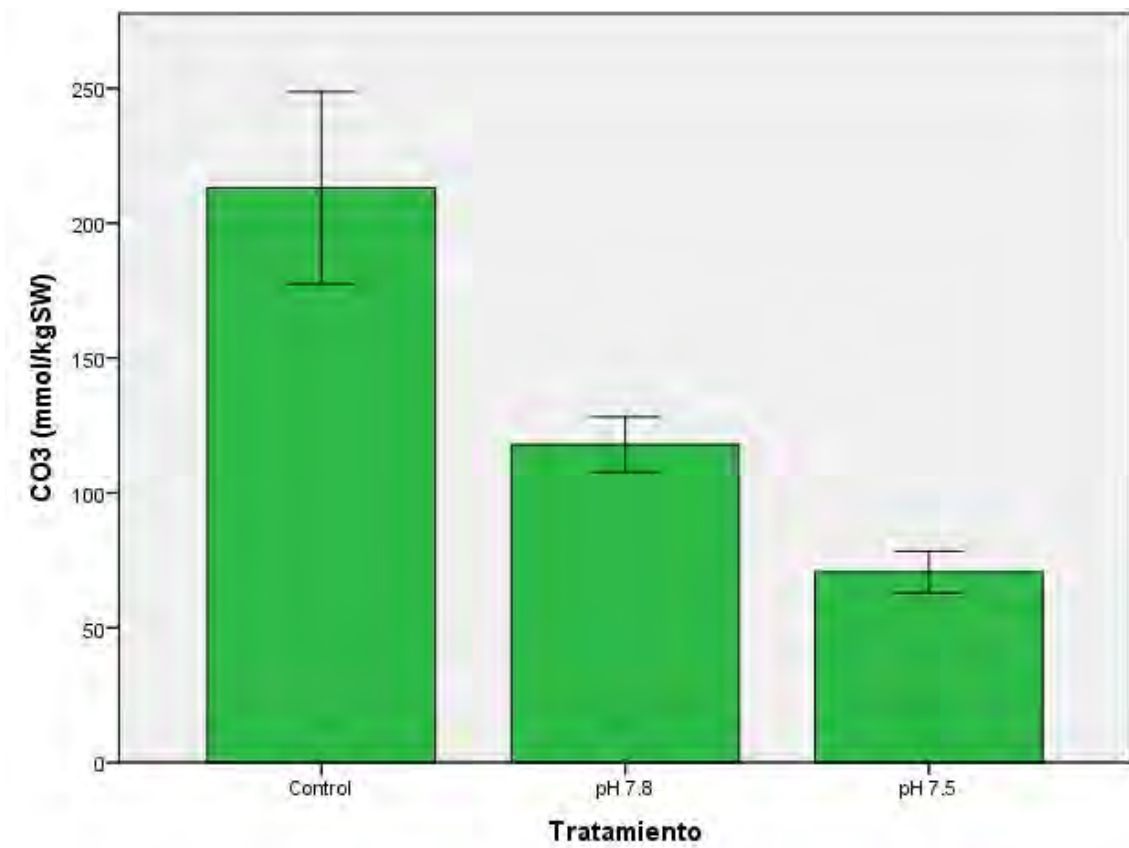


Figura 11: Concentración de iones carbonatos a lo largo de 23 días de experimento por tratamiento, media  $\pm$  desviación estándar (SD)

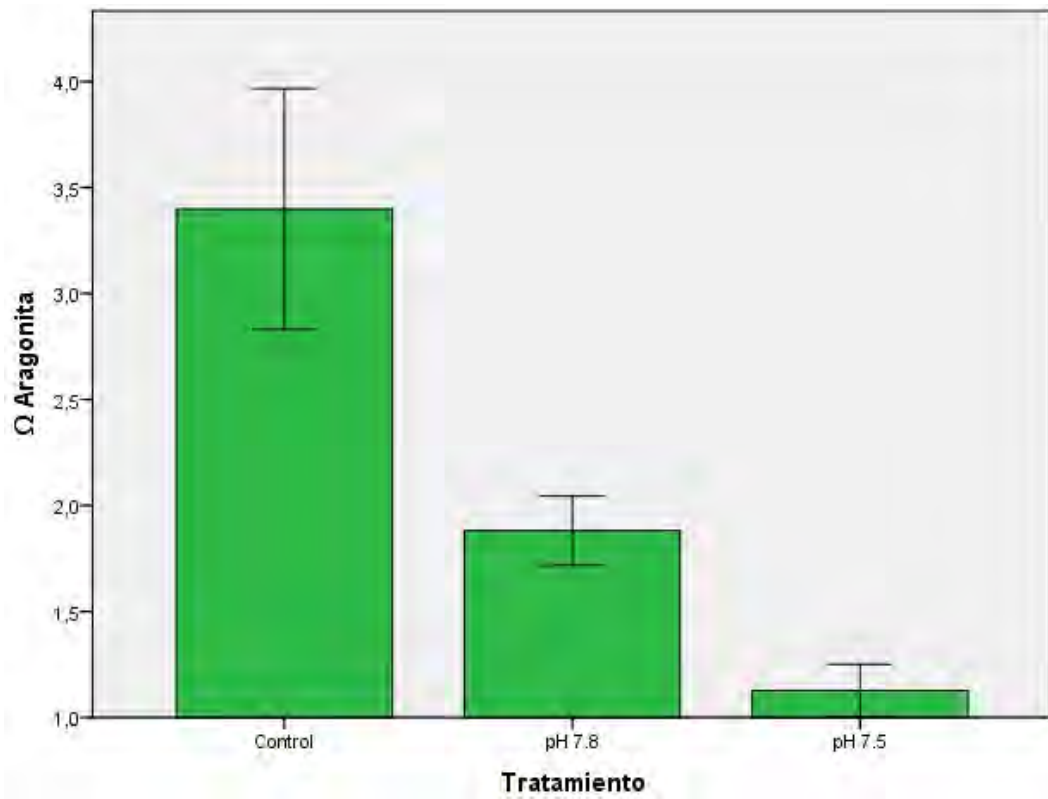


Figura 12: Estado de saturación de la aragonita a lo largo de 23 días de experimento por tratamiento, media  $\pm$  desviación estándar (SD)

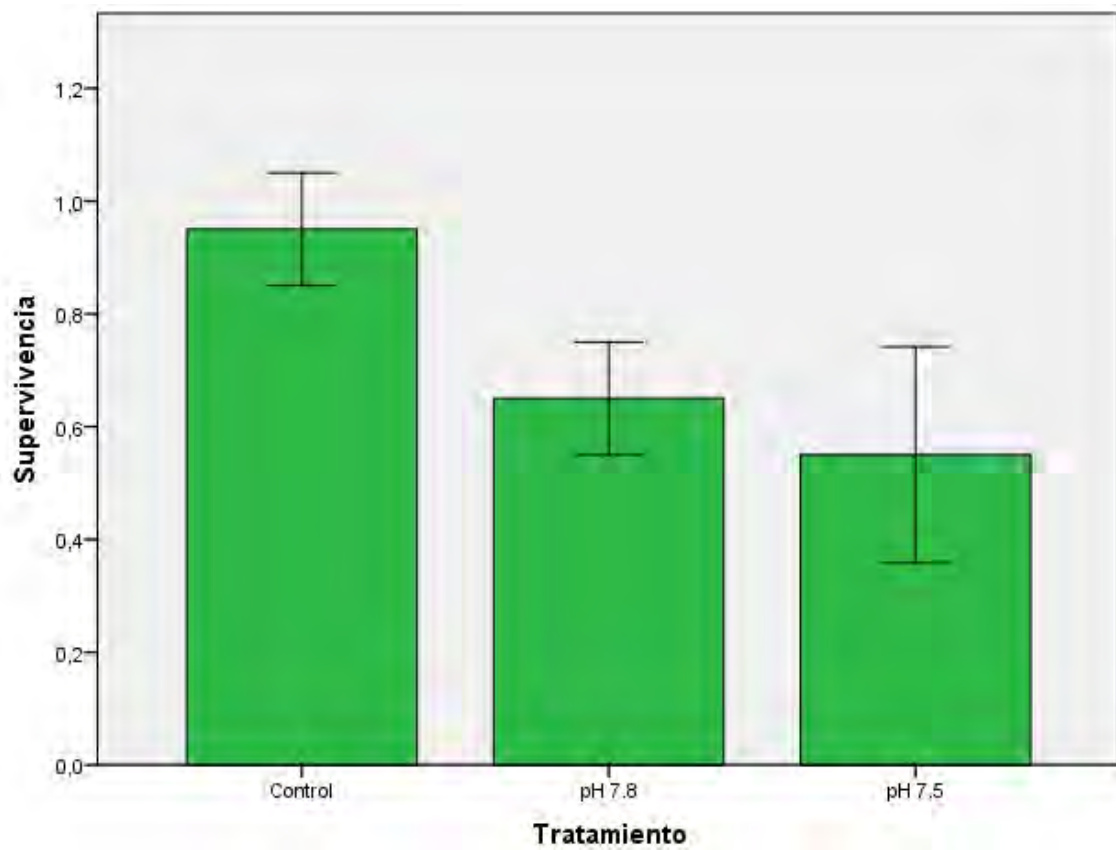
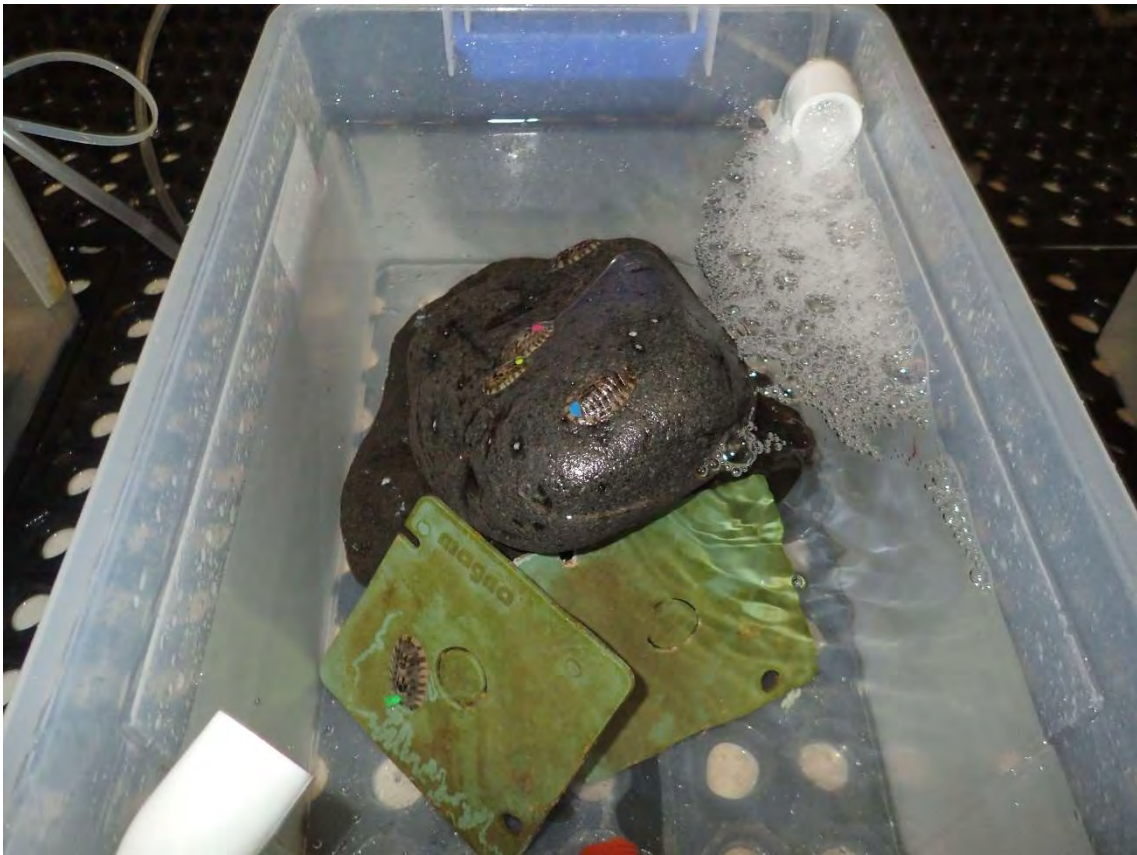


Figura 13: Supervivencia a lo largo de 23 días de experimento por tratamiento, media  $\pm$  desviación estándar (SD)



*Figura 14: Individuos de Chiton articulatus pertenecientes al tratamiento a pH 7.5 tras 23 días de experimentación*



*Figura 15: Estanque-réplica al comenzar el experimento, notar las marcas de ramoneo sobre las placas de PVC*

Tabla 1 : Comparación de los tratamientos con respecto al pH y su significación. El posthoc usado es HSD de Tukey con  $F=2105,031$  y  $p=0,000$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
pH	(1) Control	92	8,048 $\pm$ 0,079	$p=0,000$	$p=0,000$	$p=0,000$
	(2) pH 7,8	92	7,736 $\pm$ 0,044			
	(3) pH 7,5	92	7,484 $\pm$ 0,051			

Tabla 2: Comparación de los tratamientos con respecto a la temperatura y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=2063,600$  y  $p=0,000$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Temperatura(in situ)	(1) Control	100	25,030 $\pm$ 0,380	$p=0,041$	$p=0,000$	$p=0,000$
	(2) pH 7,8	100	25,144 $\pm$ 0,272			
	(3) pH 7,5	100	25,326 $\pm$ 0,380			

Tabla 3: Comparación de los tratamientos con respecto a la salinidad (ppm) y su significación. El posthoc usado es HSD de Tukey con  $F=4,644$  y  $p=0,010$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Salinidad (ppm)	(1) Control	92	34,238 $\pm$ 0,272	$p=0,871$	$p=0,050$	$p=0,013$
	(2) pH 7,8	92	34,260 $\pm$ 0,313			
	(3) pH 7,5	92	34,286 $\pm$ 0,298			

Tabla 4: Comparación de los tratamientos con respecto a la presión parcial de  $CO_2$  y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=2105,031$  y  $p=0,000$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
pCO <sub>2</sub> (ppm)	(1) Control	92	398,209 $\pm$ 66,130	$p=0,000$	$p=0,000$	$p=0,000$
	(2) pH 7,8	92	917,147 $\pm$ 108,767			
	(3) pH 7,5	92	1739,239 $\pm$ 209,161			

Tabla 5: Comparación de los tratamientos con respecto a los iones carbonatos (nmol/KgSW) y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=1012,480$  y  $p=0,000$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
CO <sub>3</sub> (mmol/kgSW)	(1) Control	92	213,117 $\pm$ 35,657	$p=0,000$	$p=0,000$	$p=0,000$
	(2) pH 7,8	92	117,902 $\pm$ 10,248			
	(3) pH 7,5	92	70,588 $\pm$ 7,752			

Tabla 6: Comparación de los tratamientos con respecto al estado de saturación de la aragonita y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=308,206$  y  $p=0,000$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
$\Omega$ Aragonita	(1) Control	92	3,468 $\pm$ 0,902	$p=0,000$	$p=0,000$	$p=0,000$
	(2) pH 7,8	92	1,865 $\pm$ 0,227			
	(3) pH 7,5	92	1,187 $\pm$ 0,604			

Tabla 7: Comparación de los tratamientos con respecto a la fuerza transformada (N) y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=5,031$  y  $p=0,008$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Fuerza transformada (N)	(1) Control	36	12,250 $\pm$ 4,680	$p=0,013$	$p=0,580$	$p=0,112$
	(2) pH 7,8	32	10,147 $\pm$ 2,284			
	(3) pH 7,5	33	10,643 $\pm$ 3,273			

Tabla 8: Comparación de los tratamientos con respecto a la longitud de las valvas y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=0,267$  y  $p=0,766$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Longitud valvas (mm)	(1) Control	36	11,310 $\pm$ 0,326	$p=0,810$	$p=1$	$p=0,801$
	(2) pH 7,8	32	11,016 $\pm$ 0,345			
	(3) pH 7,5	33	11,011 $\pm$ 0,340			

Tabla 9 Comparación de los tratamientos con respecto a la Longitud/Grosor medio y su significación. El posthoc usado es HSD de Tukey con  $F=4,378$  y  $p=0,15$

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
LG	(1) Control	36	15,085 $\pm$ 1,428	$p=0,997$	$p=0,038$	$p=0,026$
	(2) pH 7,8	32	15,105 $\pm$ 1,076			
	(3) pH 7,5	33	15,855 $\pm$ 1,067			

Tabla 10 Comparación de los tratamientos con respecto a la Fuerza/ (Longitud/grosor) (N) y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=3,935$  y  $p=0,023$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
FLG (N)	(1) Control	36	0,822 $\pm$ 0,337	$p=0,060$	$p=1$	$p=0,095$
	(2) pH 7,8	32	0,675 $\pm$ 0,161			
	(3) pH 7,5	33	0,675 $\pm$ 0,212			

Tabla 11: Comparación de los tratamientos con respecto a la Fuerza/ (Longitud/grosor) (N) pero con una transformación estadística y su significación. El posthoc usado es Games-Howell con  $F=5,467$  y  $p=0,006$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
FLG transformado(N)	(1) Control	36	0,886 $\pm$ 0,790	$p=0,024$	$p=0,959$	$p=0,045$
	(2) pH 7,8	32	0,644 $\pm$ 0,438			
	(3) pH 7,5	33	0,707 $\pm$ 0,547			

Tabla 12: Comparación de los tratamientos con respecto a la ((Fuerza/ (Longitud/grosor))/ distancia (N/mm) (Plasticidad) y su significación. El posthoc usado es HSD de Tukey con  $F=5,805$  y  $p=0,004$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Plasticidad (N/mm)	(1) Control	36	0,653 $\pm$ 0,173	$p=0,004$	$p=0,684$	$p=0,045$
	(2) pH 7,8	32	0,542 $\pm$ 0,108			
	(3) pH 7,5	33	0,571 $\pm$ 0,125			

Tabla 13: Comparación de los tratamientos con respecto a la supervivencia y su significación. El posthoc usado es HSD de Tukey con  $F=9,176$  y  $p=0,007$ .

Variable	Tratamientos	n	Media $\pm$ SD	(1)-(2)	(2)-(3)	(1)-(3)
Supervivencia	(1) Control	4	0,950 $\pm$ 0,100	$p=0,032$	$p=0,578$	$p=0,007$
	(2) pH 7,8	4	0,650 $\pm$ 0,100			
	(3) pH 7,5	4	0,550 $\pm$ 0,192			