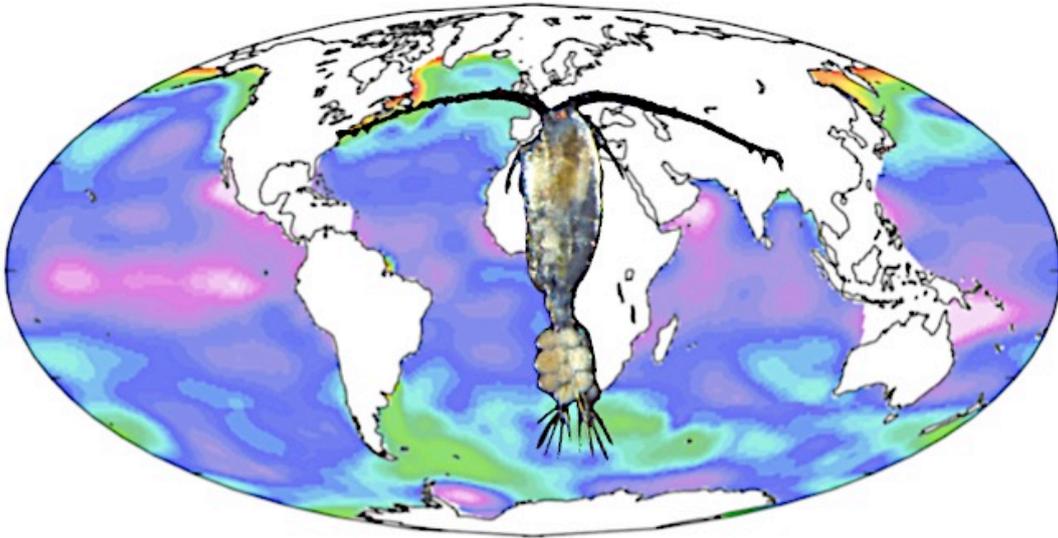




RESPUESTA TRANSGENERACIONAL A
LA ACIDIFICACIÓN MARINA DEL
COPÉPODO *ACARTIA TONSA* DANA, 1849



TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA

LAURA ANDRADES CARLES

Junio, 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores Mercedes Conradi Barrena y Khurshid Alam Bhuiyan por su tiempo, paciencia y ayuda durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por el cariño, cercanía y dedicación que he recibido.

Gracias al Departamento de Zoología de la Facultad de Biología por acogerme y enseñarme durante varios años.

Agradecer a toda mi familia y amigos, en especial a mis padres, mis tíos y mis abuelos, por creer siempre en mí y por disfrutar de mis logros como si fuesen vuestros. Gracias a vosotros soy quien soy, solo puedo expresar mi más sincero agradecimiento por apoyarme y ayudarme tanto en mi etapa académica como en mi vida.

RESPUESTA TRANSGENERACIONAL A LA ACIDIFICACIÓN MARINA DEL COPÉPODO *ACARTIA TONSA* DANA, 1849

RESUMEN

La acidificación oceánica producida por el aumento de la concentración de dióxido de carbono en el océano representa una amenaza para los ecosistemas marinos, porque provoca una disminución del pH y una alteración en la química del agua de mar. El copépodo calanoide marino *Acartia tonsa* Dana, 1849 es una especie ecológica y socioeconómicamente importante. Este trabajo se centra en cómo afecta el pH ácido al copépodo *A. tonsa*, determinando la tasa de supervivencia, reproducción y desarrollo a diferentes tratamientos de pH, e intenta averiguar si se produce una respuesta transgeneracional para contrarrestar los efectos de la acidificación oceánica.

Palabras clave: Acidificación oceánica, pH, copépodo, *Acartia tonsa*, respuesta transgeneracional.



Laura Andrades Carles
Departamento de Zoología

Facultad de Biología. Universidad de Sevilla
Avda. Reina Mercedes 6, 41012-Sevilla. España

ÍNDICE

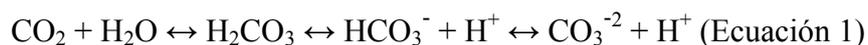
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Acidificación del océano (AO).....	3
1.2 Efectos transgeneracionales	5
1.3 Copépodos en el cambio climático.....	6
1.4 Ciclo de vida de <i>Acartia tonsa</i>	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Descripción del área de estudio.....	11
3.2 Muestreo	12
3.3 Tratamientos de la muestra en el laboratorio: aclimatación	13
3.4 Preparación de agua de mar artificial.....	13
3.5 Preparación de microalgas (alimento)	14
3.6 Preparación del sistema de CO ₂	14
3.7 Diseño experimental.....	15
3.7.1 Mediciones de parámetros biológicos	17
3.7.2 Mediciones de parámetros fisicoquímicos	17
3.8 Análisis de datos	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Parámetros fisicoquímicos del agua	18
4.2 Fecundación	19
4.3 Liberación de huevos al medio por parte de las hembras ovíferas.....	20
4.4 Éxito de eclosión de huevos y el número de nauplios por cada hembra	21
4.5 Tasa de supervivencia	22
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Acidificación del océano (AO)

El CO₂ se disuelve en los océanos a través del ciclo marino del carbono, que está impulsado por componentes tanto bióticos (fotosíntesis, respiración, formación de CaCO₃) como abióticos (disolución de CO₂, química de ácido/base). Las concentraciones más altas de CO₂ atmosférico se encuentran en la capa superficial del agua, debido a la difusión de CO₂ a través de la superficie del océano, se equilibra con rapidez en toda la capa superficial, y posteriormente es transportado hacia las profundidades del océano (Sabine et al., 2004). El pH y el estado de saturación de los minerales de carbonato de calcio (Ω_{CaCO_3}) son dos puntos principales del ciclo de carbono (Raven et al., 2005).

El ciclo marino del carbono comienza con la disolución del CO₂ en el agua de mar (hidratación), formándose ácido carbónico (H₂CO₃), un ácido débil. Este ácido en solución se disocia instantáneamente en bicarbonato (HCO₃⁻) y en menor proporción, en iones carbonato (CO₃⁻²) liberando dos protones (H⁺) (Ecuación 1) (Doney, 2006). Cuando en el agua marina aumenta la concentración de iones de hidrogeno (H⁺) formados en el ciclo del carbono se reduce el pH de la solución, causando lo que se conoce como acidificación de los océanos (AO) (McConville et al., 2013; Wang et al., 2017).



La AO se define como un cambio en la química del carbono y la disminución del pH oceánico, causado por el aumento del dióxido de carbono atmosférico (CO₂) que difunde en las aguas superficiales oceánicas (Pörtner et al., 2014; Wang et al., 2018). Esta acidificación está produciendo un cambio en los océanos de todo el mundo, presentando una constante amenaza para los organismos marinos, que se ven obligados a vivir en ambientes cada vez más ácidos (Weydmann et al., 2012), ya que las primeras etapas de vida de casi todas las especies marinas son especialmente sensibles a un pH ácido (Sindre et al., 2014).

Una presión parcial de CO₂ (pCO₂) elevada no solo disminuye el pH del agua del mar, sino que también puede influir en el pH interno del animal, ya que el CO₂ difunde fácilmente a través de la superficie animal equilibrando sus concentraciones entre el medio interno y

externo (Kurihara e Ishimatsu, 2008), esto afectará al pH de la sangre y disminuirá la afinidad de las proteínas respiratorias por el oxígeno (Zhang et al., 2016), del mismo modo puede alterar el transporte de iones, la actividad enzimática, la fotosíntesis (organismos fotosintéticos), etc. (Tixier et al., 2017). Estos procesos reguladores del equilibrio ácido-base que los organismos marinos utilizan para compensar el bajo pH extracelular son muy costosos, dejando menos energía para el crecimiento, desarrollo y reproducción (Oh et al., 2017; Tixier et al., 2017; Wang et al., 2017).

Desde la revolución industrial, últimos 250 años, la concentración de CO₂ atmosférico se incrementó en más de un 40%, desde 280 ppm (partes por millón) hasta el nivel de 394 ppm actual (NOAA, 2014; Oh et al., 2017; Pedersen et al., 2014). En abril de 2018, los niveles de CO₂ estaban en 410.31 ppm (CO2.earth, 2018). Como señala Raven et al. (2005) “a escala mundial, el aumento de las concentraciones atmosféricas de CO₂ está causando un aumento en la acidez media de la superficie marina”. El pH superficial del océano ha decrecido en 0.1 unidades en comparación con el promedio anterior a la revolución industrial (pH de 8.17) (Figura 1) (Pedersen et al., 2014; Pörtner et al., 2014; Wang et al., 2018). Y las zonas más vulnerables a la acidificación, son aquellas donde el agua marina se diluye con aguas continentales, los estuarios (Rojas-Higuera y Pabón-Caicedo, 2015). Indistintamente del estudio que elijamos para ver la proyección de los niveles de pH futuros en los océanos, la postura de los investigadores es clara: la acidificación de los océanos tendrán efectos perjudiciales y de gran alcance (IPCC, 2014).

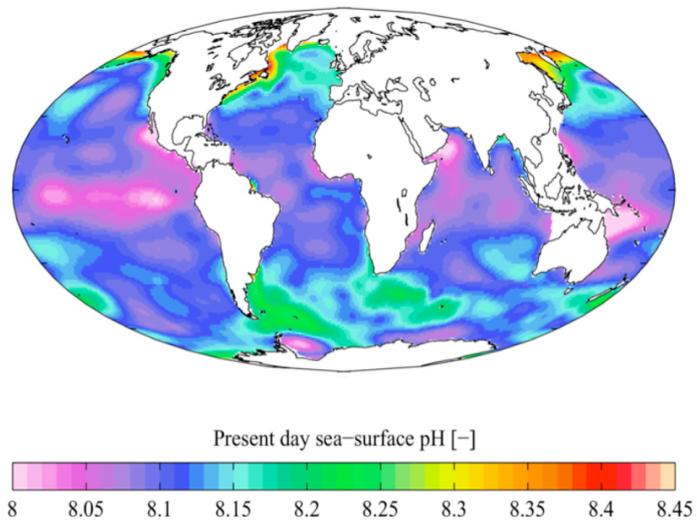


Figura 1. Distribución del pH superficial del agua marina
Fuente: Giménez, 2015.

Se prevé que el pH oceánico continúe disminuyendo, puesto que se ha pronosticado que para el año 2050 los niveles de CO₂ atmosférico aumentarán más del doble de los niveles preindustriales (Pörtner et al., 2014). De hecho, se cree que para el año 2100 el pH medio de

la superficie oceánica será 7.8, debido a que los niveles de CO₂ atmosféricos alcanzarán 788 ppm (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2016), otras predicciones, claramente más pesimistas, señalan que los niveles de CO₂ alcanzarán los 970 ppm, lo que tendría como consecuencia una bajada del pH más acentuada, de pH 8.2 (actual) a pH 7.6 para finales de siglo (McConville et al., 2013; Pedersen et al., 2014). También se ha demostrado que actualmente, en determinadas zonas costeras o estuarinas denominadas “puntos calientes” han experimentado, si bien de forma temporal, estos niveles de pH previstos para 2100 (Wang et al., 2017). Otros autores, incluso se atreven a predecir valores para el 2300, de niveles de 1900 ppm de CO₂ atmosférico (Oh et al., 2017; Pedersen et al., 2014), lo que conllevaría una reducción de 0.7 unidades en el pH (Weydmann et al., 2012).

1.2 Efectos transgeneracionales

Los cambios en los ecosistemas producidos por la AO influirán en la supervivencia de las especies actuales, determinando la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas en el futuro (Zervoudaki et al., 2014). Existen dos vías por la que los organismos pueden sobrevivir en un nuevo entorno: la aclimatación o la adaptación (Munday, 2014). La aclimatación implica la existencia de una plasticidad fenotípica (PP), gracias a la cual el organismo modifica su morfología, ciclo de vida, comportamiento o fisiología para sobrevivir a los cambios medioambientales que se han producido en su hábitat (Munday, 2014; Jesus et al., 2017; Visser, 2008). Por el contrario, la adaptación implica la selección, entre la variación genética existente, del fenotipo más adecuado para sobrevivir en ese nuevo ambiente (Gienapp et al., 2008; Visser, 2008). La mayoría de los estudios sobre la aclimatación implican PP a la variación ambiental dentro de una generación, sin embargo, algunos organismos también pueden aclimatar su morfología, fisiología, o ciclo de vida a través de generaciones, de forma que el rendimiento de una generación en un ambiente particular mejora cuando la generación anterior también experimentó (vivió) ese entorno. Esta "aclimatación transgeneracional" también se conoce como "plasticidad transgeneracional" (TGP), y se ha definido como la influencia que tiene el ambiente en el que ha vivido los padres sobre la capacidad de supervivencia de su descendencia, sin necesidad de cambios en la secuencia de ADN (Salinas y Munch, 2012). La TGP es un fenómeno que a menudo se atribuye a la herencia epigenética, y se encuentran en taxones tan diversos como plantas, insectos, invertebrados marinos, y vertebrados, incluyendo los seres humanos (Munday, 2014; Salinas y Munch, 2012).

Si bien la aclimatación de los organismos (PP y TGP) es un mecanismo muy importante para sobrevivir a los cambios rápidos que se producen en el medioambiente y, por tanto, una forma muy eficaz de paliar los efectos del pCO₂ (Dupont y Pörtner, 2013; Munday, 2014; Salinas y Munch, 2012), puede ser muy costosa energéticamente a medio o largo plazo (Seebacher et al., 2005), y no puede sostenerse en poblaciones cuyo medio ambiente está en continuo cambio, por lo que se requiere respuestas evolutivas (Phillimore et al., 2010). Según Calosi et al. (2013) la estrategia favorecida (aclimatación o adaptación) por los organismos frente al elevado pCO₂ dependerá del coste energético. Aun así, no está claro en qué medida los organismos evolucionan *in situ* para hacer frente al cambio climático (adaptación), o dependen de su PP para amortiguar las pérdidas de su condición física (salud) (aclimatación) (Merilä y Hendry, 2013), si bien la mayoría de los estudios realizados sugieren que la aclimatación (PP) prevalece sobre la adaptación (Gienapp et al., 2008; Merilä y Hendry, 2013). Por lo tanto, parece que tanto la plasticidad fenotípica como la adaptación pueden ser la clave para prevenir el riesgo de extinción de la especie debida a la acidificación de las aguas (Raven et al., 2005; Rodríguez-Romero et al., 2015; Basallote et al., 2012) y por lo tanto determinan en gran medida el destino de la biodiversidad marina.

1.3 Copépodos en el cambio climático

Los copépodos son crustáceos microscópicos (0.2-20 mm) que forman parte del mesozooplankton y, junto con los cladóceros, constituyen la mayor parte de la biomasa del zooplankton de las aguas costeras de Europa (Kurihara e Ishimatsu, 2008; Isari et al., 2015). Según Fitzer et al. (2012) “los copépodos son un grupo de organismos que son parte integral de la trofodinámica marina”, se encargan de transferir la biomasa desde los productores primarios a niveles tróficos superiores, creando así una conexión importante en el ecosistema planctónico y afectando los ciclos biogeoquímicos (Cripps et al., 2014a; Oh et al., 2017; Smith et al., 2017; Isari et al., 2015). Además, estos pequeños crustáceos son esenciales para la alimentación de muchas especies, como los peces, aves marinas y ballenas (Bailey et al., 2017), y su falta puede alterar las interacciones de la cadena trófica (Kurihara e Ishimatsu, 2008; Smith et al., 2017). Esta red trófica puede verse alterada por un efecto de cascada si los cambios en el pH oceánico afecta a una especie clave del ecosistema (Busch et al., 2013).

En la Península Ibérica, los copépodos calanoides como *Acartia sp.* constituyen el grupo del zooplankton más abundante. *Acartia sp.* (Figura 2) es una especie que comúnmente

se encuentra en aguas costeras, incluidos los estuarios salobres (Calliari et al., 2008; González, 2013), por lo que es posible encontrarlas en algunas zonas del río Guadalquivir. Si bien se piensa que debido a que su exoesqueleto no está calcificado, los copépodos van a ser uno de los grupos menos vulnerables al cambio del pH en los océanos (Pedersen et al., 2013; Smith et al., 2017), es fundamental conocer el alcance de su reacción ante cambios fisicoquímicos del mar dada su riqueza e importancia en los sistemas acuáticos del mundo (Smith et al., 2017).



Figura 2. Hembra ovígera de *Acartia tonsa* Dana 1849 del experimento. Foto tomada después de suministrar el alimento de algas liofilizadas preparadas en el laboratorio.

Pese a que los copépodos tienen gran importancia ecológica, los posibles efectos de la AO sobre ellos continúan sin determinarse. Algunas publicaciones previas señalan que la futura AO, con los niveles de pH previstos para finales de siglo (pH 7.6-7.8), no tendría un efecto directo significativo en las tasas reproductivas de los copépodos (como la tasa de producción de huevos y la viabilidad del huevo) (Kurihara e Ishimatsu, 2008; McConville et al., 2013; Wang et al., 2018; Zervoudaki et al., 2014). *Tigriopus japonicus* Mori, 1938, *Acartia tsuensis* Ito, 1956 (Cao et al., 2015) y *Acartia clausi* Giesbrecht, 1889 (Thor et al., 2016) son algunas de las especies que se muestran como “ganadores” en el marco futuro de AO. Es más, afirman que la capacidad reproductiva de los copépodos puede incluso aumentar en algunos casos cuando las incubaciones son a corto plazo, como ocurrió en el estudio de laboratorio de Engström-Öst et al. (2014), donde *Acartia bifilosa* (Giesbrecht, 1881) tuvo mayor rendimiento reproductivo como respuesta a un pH bajo (entre 7.15 y 7.6) respecto al control.

Sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de copépodos sufren efectos perjudiciales bajo el escenario de la AO futura. Según Thor et al. (2016) han demostrado que aumenta la tasa metabólica bajo condiciones más ácidas a las actuales (pH 7.83-7.66) en *Centropages tenuiremis* Thompson I.C. y Scott A., 1903, *Pseudocalanus acuspes* (Giesbrecht, 1889), *Calanus glacialis* Jaschnoc, 1955, y *Acartia grani* Sars G.O., 1904, siendo, en esta última, duplicada respecto al control. También, bajo condiciones de la AO, otras especies mostraron un retraso significativo en el desarrollo, como fue el caso de *Calanus finmarchicus* (Gunnerus, 1770) cuando se expuso a los niveles previstos para el 2300 (Bailey et al., 2017), además en el artículo de Cao et al. (2015), se afirma que esta especie experimentó un retraso en el desarrollo de la generación parental (F0), pero no ocurrió en la siguiente generación (F1) bajo las mismas condiciones, lo que sugiere que *C. finmarchicus* tiene respuesta transgeneracional hacia la AO (Cao et al., 2015). En el copépodo *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco, 1972, la AO tiene efectos sobre el desarrollo y la reproducción, cuando el pH es demasiado bajo los organismos de esta especie usan alrededor del 70% de la energía asimilada en el crecimiento somático, a expensas de la fecundidad, esto se debe a que *T. battagliai* tiene cierta plasticidad fenotípica, lo que aun no se sabe es cuando esta plasticidad progresará hacia la aclimatación y la adaptación (Fitzer et al., 2012; Thor et al., 2016). En otros artículos, se afirma que algunas especies de copépodos como *C. glacialis*, *A. grani*, *Labidocera sp.* y *C. finmarchicus* se ven afectadas en su tasa supervivencia, desarrollo y/o reproducción debido a que tienen una alta sensibilidad a altos niveles de pCO₂ y pH extremos (igual o inferior a 7), por lo tanto sus poblaciones se verían reducidas bajo el escenario de la AO, siendo las etapas más afectadas la eclosión del huevo y los nauplios (Cripps et al., 2014a; Isari et al., 2015; Oh et al., 2017; Pedersen et al., 2014; Smith et al., 2017).

Sea como fuere, aun no está establecido si estas variaciones en la respuesta de los copépodos a la AO dependen de la sensibilidad de la especie o de otros factores.

1.4 Ciclo de vida de *Acartia tonsa*

Acartia tonsa Dana 1849 es un copépodo calanoide que suele medir 1mm de largo, aunque puede llegar hasta 1,5 mm (Marcus y Wilcox, 2007) y por lo tanto, para identificarlos se requiere usar el microscopio. Esta especie característicamente tiene un cuerpo alargado, con un abdomen corto y ancho. Es, además, una especie eurihalina (tolerancia a la salinidad

de 1 ppt (partes por mil) a 38 ppt), y euritérmica (temperaturas de 0° C a 32° C), pudiendo sobrevivir a cambios repentinos de estas condiciones. Suelen encontrarse cerca de la costa, entre 0 y 20 metros (neríticas), aunque también ha sido encontrada, si bien en menor abundancia, hasta profundidades de 600 m (González, 2013; Marcus y Wilcox, 2007), además realiza migraciones verticales superficiales para evadir a los depredadores (Gómez-Aguirre, 2001; Thor y Dupont, 2015; Mayor et al., 2015). Se alimenta de fitoplancton (diatomeas, flagelados y nauplios de otros copépodos) (Jensen, 2010). Esta especie ha sido usada como organismo modelo en muchos experimentos de laboratorio sobre eutrofización, competencia, temperatura, pruebas de toxicidad, etc. (Jensen, 2010; Seebens et al., 2009).

El ciclo de vida de *A. tonsa* es el típico de la mayoría de los copépodos, con las hembras, por lo general más grandes que los machos (Figura 3). Las hembras pueden producir unos 700 huevos a lo largo de su vida, y los liberan después de ser fertilizados (González, 2013). Los huevos fecundados son esféricos, de unos 70-80 µm de diámetro, y se transforman en nauplios en unas 48 horas (a una temperatura de 25° C de media, si la temperatura es menor de 10° C entran en diapausa) (Mauchline et al., 1998).

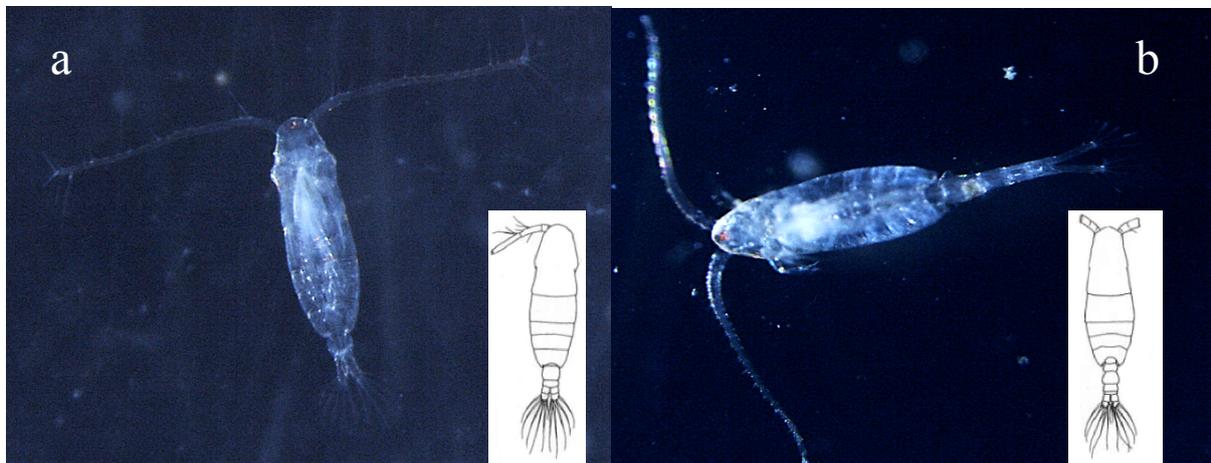


Figura 3. Fotos tomadas en el laboratorio de dos individuos *Acartia tonsa* recogidos en el muestreo. a) Hembra, b) Macho. Fuente de los esquemas: *Jensen, 2010*.

Los nauplios se desarrollan a través de seis etapas hasta convertirse en copépodos adultos, que luego progresan en seis etapas más hasta alcanzar el estado sexual maduro (Figura 4) (Baumgartner y Tarrant, 2017; Marcus y Wilcox, 2007; Seebens et al., 2009). La esperanza de vida de una generación suele ser de tres o cuatro semanas (siendo las hembras más longevas que los machos), si bien depende de la alimentación y otros factores estresantes (Calliari et al., 2008; González, 2013; Mauchline et al., 1998).

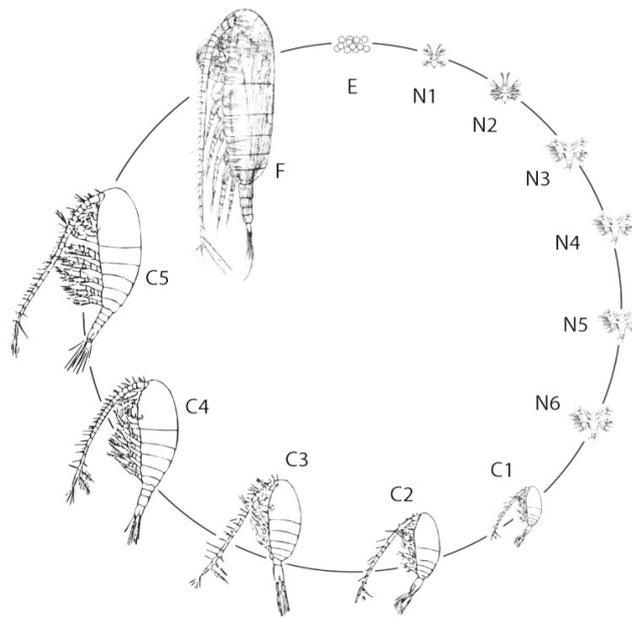


Figura 4. Ciclo de vida de un copépodo calanoide típico, que comprende una etapa de huevo (E), seis etapas de nauplio (N1-6) y seis etapas de copépodo (C1-5 y F). Fuente: Baumgartner y Tarrant, 2016.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar las respuestas del copépodo *A. tonsa*, una especie invasora del estuario del Guadalquivir desde 1998 (Gutiérrez, 2016), a las previsiones de AO en el futuro. Al ser esta una especie muy abundante en el zooplancton de dicho hábitat, tener una gran importancia ecológica (Jensen, 2010; Teixeira et al., 2010; Sabine et al., 2004) y ser relativamente fácil de cultivar (González, 2013), es una especie idónea para el estudio de su respuesta a la acidificación a lo largo de varias generaciones.

Partimos de la hipótesis de que la acidificación oceánica produciría efectos ecológicos negativos en la población de este copépodo. Si bien esperamos que los adultos sean relativamente resistentes a la acidificación del océano, hipotetizamos que la reproducción, la producción de huevos y el desarrollo de los nauplios se verán afectados, lo que a la larga disminuiría la densidad poblacional de esta especie en el zooplancton, y tendría graves consecuencias para la alimentación de la ictiofauna.

Además, procuraremos establecer una relación entre resultados obtenidos a lo largo de varias generaciones, con posibles efectos transgeneracionales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en las instalaciones que el laboratorio de Biología Marina tiene en el Departamento de Zoología de la Universidad de Sevilla. Para ello se recolectó una muestra de copépodos en el estuario del río Guadalquivir en el mes de diciembre de 2017, que luego fueron transferidos al laboratorio para evaluar el impacto del cambio del pH sobre esta especie.

Hemos estudiado la respuesta de la acidificación marina en tres generaciones de *A. tonsa*, F0 (hembras recolectadas), F1 y F2, con una duración total del experimento de 53 días.

3.1 Descripción del área de estudio

El Guadalquivir es el río más importante del sur de España, históricamente ha vertebrado el territorio en la actual Andalucía. Los asentamientos humanos desde la antigua Tartessos y las ciudades que se han desarrollado a lo largo de los siglos en su curso, son un exponente claro de su importancia. Esta zona ha enriquecido el contenido metálico de sus aguas y suelos debido al uso minero que ha tenido durante siglos (Cabrera et al., 1998).

El Guadalquivir fluye predominantemente en dirección oeste aunque esta tendencia varía a lo largo de su curso, su longitud es de 657 km, convirtiéndolo en uno de los ríos más largos de España. Naciendo a una altitud de 1.600 metros aproximadamente, en el sur de la Provincia de Jaén, en la Sierra de Cazorla y desemboca en el océano Atlántico en Sanlúcar de Barrameda, en el Golfo de Cádiz (Rodríguez, 2011). En cuanto a los datos fisicoquímicos, este río tiene una temperatura media anual superficial de 16.8° C, un pH de 8.17 en los 2.5 primeros metros de profundidad y una salinidad variable a lo largo de su curso, con una media de 5.1 ppt de sales en la superficie del río (Junta de Andalucía, 2014; Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, 2017).

La cuenca de drenaje del río Guadalquivir abarca uno de los mayores recursos florales de Europa, conteniendo especies representantes de prácticamente la mitad de las especies del continente, así como casi todos las del norte de África. Las especies arbóreas más predominantes en su discurrir hacia el océano, son los olivos, pinos y robles, siendo la vid y los cereales (trigo y cebada, y el arroz que se cultiva en sus últimos tramos) los cultivos más representativos de la agricultura tradicional, además del girasol, la remolacha y el algodón. La

fauna es tan rica y variada como la vida vegetal, con especies animales representativas de Europa y el norte de África destacando, gamos, ciervos, jabalíes entre otros. Sus aproximadamente 800 afluentes y los embalses a lo largo de su recorrido son el hábitat de peces, entre los que destacan las truchas y barbos. En su último tramo las marismas de Doñana, son el principal refugio de especies como el linco ibérico, así como una zona de nidificación y parada obligada de muchas aves en sus migraciones de África a Europa y viceversa (Rodríguez, 2011), siendo el Parque Natural más importante del sur de Europa.

3.2 Muestreo

Las muestras de copépodos se recolectaron aguas arriba del río Guadalquivir desde la ubicación $36^{\circ}57.715' N$, $06^{\circ}10.540' O$ (Figura 5). Se midieron tres veces los parámetros fisicoquímicos a lo largo de la zona del muestreo con la sonda Eureka Manta 2, los valores medios fueron los siguientes: pH 8.15, temperatura $15.07^{\circ} C$, salinidad 5.14 ± 0.01 , oxígeno disuelto (DO) 89.17 ± 0.06 y conductividad 9.18 ± 0.02 . Las muestras se recogieron usando una red Bongo con 40 cm de diámetro y $200 \mu m$ de tamaño de malla (Figura 6). La técnica utilizada para la recolección de muestras fue una técnica oblicua doble, es decir, de superficie a fondo y de fondo a superficie durante 5 minutos en total (la profundidad era de alrededor de 7 metros). Para subir y bajar de la red usamos una grúa, y la velocidad del bote rondaba los 2.0-2.5 nudos.

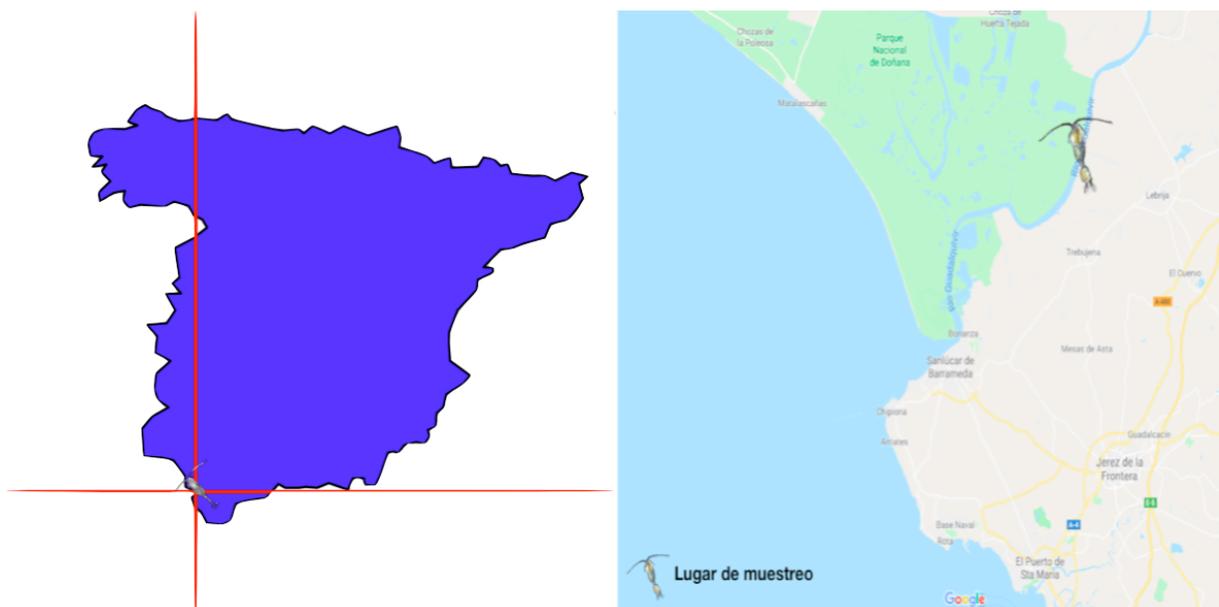


Figura 5. Mapa del área de estudio en el estuario del río Guadalquivir.



Figura 6. Recogida de la muestra de copépodos en el río Guadalquivir usando la red Bongo.

3.3 Tratamientos de la muestra en el laboratorio: aclimatación

Las muestras de copépodos vivos se llevaron al laboratorio con aireación continua gracias a un aireador portátil. Al llegar al laboratorio, los animales vivos fueron cuidadosamente transferidos a un acuario de 5 L previamente limpiado (20.32 cm x 35.56 cm). Solo los animales vivos fueron transferidos y los animales muertos fueron descartados. Estos se mantuvieron 12:12 h en condiciones de luz y oscuridad, a una temperatura constante de $15.50 \pm 0.04^\circ \text{C}$ y en agua de mar artificial filtrada (Pure Ocean[®] Expert Reef Salt), se permitió la aclimatación durante dos semanas con aireación continua. Durante el período de aclimatación, los copépodos fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de microalgas liofilizadas. El agua se cambió cada 3 días para mantener una calidad óptima. Después de dos semanas de aclimatación en el laboratorio con agua de mar artificial, se inició el experimento con las hembras ovígeras obtenidas en el tanque de aclimatación (un total de 60).

3.4 Preparación de agua de mar artificial

El agua de mar artificial (ASW) se preparó dos semanas antes de comenzar el experimento para mayor homogeneización de la sal. Para ello, se pesó 5 g de sal en un vaso de precipitado, al que se le añadió agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1000 L, posteriormente se agitó con una varilla de agitación hasta la total disolución de la sal. El pH

de esta solución se ajustó a 8.2, añadiendo hidróxido de sodio o ácido clorhídrico (0.1 N) si era necesario. La salinidad se verificó usando un refractómetro (RCYAGO Handheld RHS-10ATC). Finalmente, el agua se filtró conservándose (no más de una semana) en continua aireación hasta su uso.

3.5 Preparación de microalgas (alimento)

Los copépodos fueron alimentados con 500 $\mu\text{g C L}^{-1}$ al día de fitoplancton marino liofilizado, previamente hidratado, que contenía una mezcla de tres especies de microalgas *Phaeodactylum* (33.3%), *Nannochloropsis* (33.3%) y *Tetraselmis* (33.3%) (Easy Reefs[®]). Dicha cantidad representa una concentración de alimento suficiente para permitir que los copépodos crecieran y se desarrollaran, pero no excesivamente alta como para enmascarar los efectos energéticos del CO_2 elevado (Teixeira et al., 2010). La hidratación del preparado se hizo según las instrucciones de la marca, dejando de tiempo de hidratación 1 minuto antes de la licuación de la solución durante otro minuto. Dicha solución se distribuyó a los distintos acuarios experimentales recién preparada, y no se reutilizó ya que incluso en el frigorífico, pierde nutrientes debido a la oxidación (Easy Reefs[®]).

3.6 Preparación del sistema de CO_2

El sistema experimental de inyección de CO_2 (Sistema de AT Control de Aqua Medic) utilizado se encuentra en una habitación con temperatura controlada y ha sido descrito y usado previamente en los experimentos de Basallote et al. (2012) y Rodríguez-Romero et al. (2014) (Figura 7). Este sistema controla mediante ordenador las mediciones de los niveles de pH por vía electrónica en los diferentes acuarios pudiéndose modificar o mantener diferentes niveles de pH, de forma independiente, en varios tanques experimentales. El pH se monitoriza continuamente a través de los sensores de pH instalados en los acuarios y conectados al sistema, y los valores de pH se ajustan mediante la inyección de gas CO_2 puro a través de una válvula solenoide. La válvula aporta el gas en cada acuario cuando el pH sube por encima del valor de ajuste (0.05 unidades) hasta que se alcanza el valor de pH requerido. Previo al inicio de los experimentos se realizó un intercalibrado de los electrodos de pH para asegurar la fiabilidad de los datos.

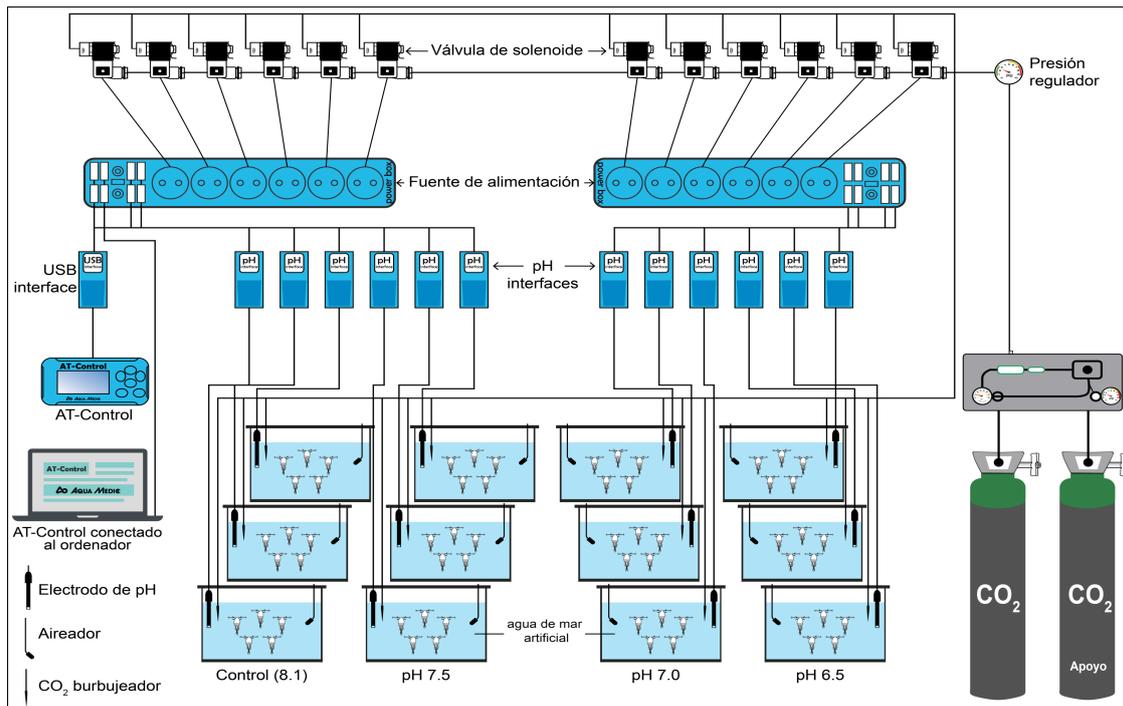


Figura 7. Esquema del sistema de inyección de CO₂.

3.7 Diseño experimental

Para el estudio multigeneracional de *A. tonsa* se utilizaron cuatro tratamientos de pH, incluido el control, con tres réplicas para cada tratamiento (es decir, control como pH 8.10, y los tratamientos de pH 7.5, 7.0 y 6.5) de acuerdo con los escenarios predichos de acidificación oceánica. Se recolectaron 60 hembras ovígeras del acuario de aclimatación, y se colocaron 5 hembras ovígeras en cada tanque experimental (15 hembras por tratamiento, Figuras 8 y 9). Cada tanque (excepto los controles) fue acidificado progresivamente 0.2 unidades de pH por día, hasta que se alcanzó el valor de pH de prueba. Las condiciones de temperatura y ciclo de luz, así como frecuencia y método de alimentación en los acuarios experimentales, fueron las mismas que las descritas para el período de aclimatación. Al comenzar una nueva generación, los nauplios se separaron de los adultos para evitar el efecto de la posible depredación de los adultos sobre éstos.



Figura 8. Configuración experimental del laboratorio.

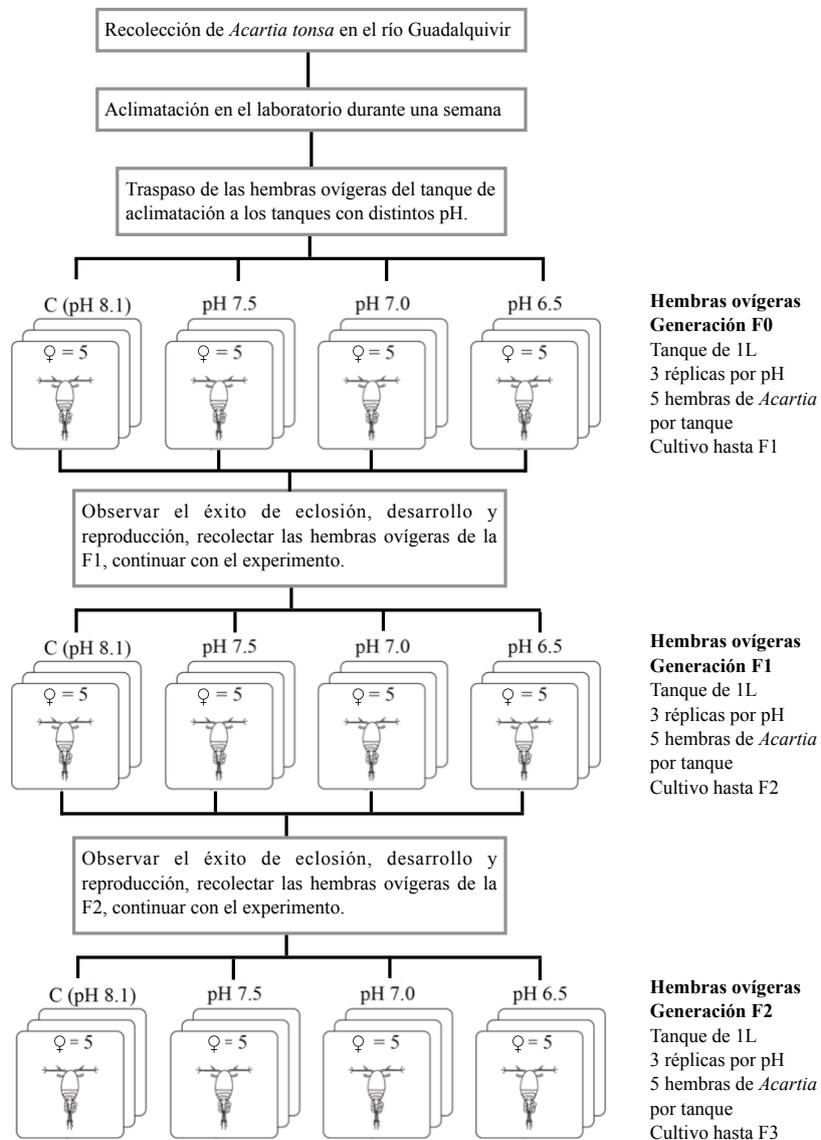


Figura 9. Diagrama esquemático del diseño experimental utilizado en el presente trabajo.

3.7.1 Mediciones de parámetros biológicos

Después del periodo de aclimatación se depositaron las hembras ovígeras de la generación parental (F0) en los tanques experimentales y se dejó que liberaran sus huevos. Cuando ya estaban desprovistas de huevos, se separaron de los nauplios para evitar el efecto de la posible depredación sobre estos y se congelaron (-80° C) para un posteriores análisis de estés oxidativo. De igual forma se hizo al comienzo de las generaciones posteriores (F1 y F2).

La fecundación se calculó semanalmente como el número de huevos por hembras ovígeras de cada una de las réplicas, al igual que la liberación de huevos al medio por parte de las hembras ovígeras. También se determinó el éxito de la eclosión de huevos como el número medio de huevos producidos entre el número de nauplios vivos obtenidos. Finalmente se consideró la tasa media de supervivencia desde el estado nauplio hasta el adulto de las mismas generaciones.

3.7.2 Mediciones de parámetros fisicoquímicos

Cada semana, se renovó parcialmente (50%) el agua de cada tanque y se restablecieron los niveles de pH. Se tomaron muestras de agua de cada tanque cada semana, antes de la renovación del agua, y se usó para medir los parámetros fisicoquímicos de cada tanque. Para la alcalinidad total (At) se utilizó el Mini Titulador Hanna edge® HI 84531, para determinar la salinidad se usó un refractómetro de mano (RHS-10ATC, 0-100 % salinidad), la temperatura fue medida con un termómetro portátil y automáticamente mediante un sensor de temperatura adjunto al sistema AT Control, por último, las mediciones de oxígeno, de pH (que también fue controlado en todo momento por el sistema AT Control) y de conductividad se realizaron con la sonda multi-parámetros Hanna edge® HI2020-01. Además, el DO (%) fue medido diariamente, para asegurar que la mortalidad no fuera causada por la deficiencia de oxígeno. De acuerdo con las directrices de la OCDE para la prueba de productos químicos, la concentración de oxígeno no debe ser inferior al 60% del valor de saturación del aire (Geiß et al., 2015).

3.8 Análisis de datos

Las diferencias significativas entre las características del ASW (pH, temperatura, oxígeno disuelto en el agua y salinidad) en los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo de exposición de los organismos se estudiaron con una ANOVA de dos vías, tras verificar la

normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Las comparaciones post hoc se realizaron con el test de Tukey. Las diferencias entre la supervivencia de los copépodos, la liberación de huevos al medio por parte de la hembra ovígera, la fecundación, el éxito de la eclosión de huevos y el desarrollo de éstos en adultos fueron analizadas con una ANOVA donde se consideraron las generaciones y los distintos niveles de pH como intersujetos, tras verificar la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Cuando se observaron interacciones entre los factores se establecieron las diferencias por comparaciones de pares (DHS Tukey).

4. RESULTADOS

4.1 Parámetros fisicoquímicos del agua

Como se muestra en la Tabla 1, los parámetros fisicoquímicos del agua de los tanques de aclimatación donde se mantuvieron los copépodos, fueron muy similares a los valores que se registraron en la recolección de muestras.

Tabla 1. Parámetros físicoquímicos (media \pm SD, n = 3) *in situ* durante la recolección de los copépodos y durante el período de aclimatación de éstos. A_T: alcalinidad total; DO: oxígeno disuelto.

Parámetros	Durante la recolección de muestras	Durante la aclimatación
pH	8.15 \pm 0.00	8.19 \pm 0.02
Temperatura (°C)	15.07 \pm 0.00	15.53 \pm 0.06
Salinidad (ppt)	5.14 \pm 0.01	5.18 \pm 0.03
DO (%)	89.17 \pm 0.06	86.37 \pm 1.03
Conductividad mS cm ⁻¹	9.18 \pm 0.02	9.18 \pm 0.13
A _T mg L ⁻¹	NM	152.97 \pm 7.84
A _T μ mol Kg ⁻¹	NM	1528.29 \pm 78.29

NM=No Medido

No hubo diferencias significativas de los distintos tratamientos de pH a lo largo del tiempo (p=0.103) siendo los valores medios recogidos a lo largo de la duración de experimento muy cercanos a los valores objeto de estudio (Tabla 2). Obviamente sí hubo diferencias significativas entre tratamientos (pH) (MS=12.91, F=4062.86, p<0.001), indicando el test de Tukey cada uno de los tratamientos considerados: ((control) 8.164; 7.527; 7.072; 6.534) pero no hubo interacción entre tiempo y pH (p=0.938). Respecto a la temperatura, tampoco se encontraron diferencias significativas ni entre tratamiento (p=0.629) ni a lo largo del tiempo (p=0.504), y por tanto no hubo interacción entre la temperatura y el

tiempo, demostrando que la temperatura fue constante a lo largo de todo el tiempo y que cualquier efecto observado en las poblaciones de *A. tonsa* de este experimento no fue debido a este factor. La salinidad no fue significativamente diferente ni entre los distintos tratamientos ($p=0.712$) ni a lo largo del tiempo ($p=0.199$), al igual que la concentración disuelta de oxígeno en el agua (tiempo: $p=0.844$; tratamiento $p=0.380$, tiempo x tratamiento: $p=0.994$) siendo ésta en todo momento superior a la requerida por la USEPA para considerar válido un test ecotoxicológico. En cuanto a los parámetros del sistema de carbonatos se aprecia como a medida que el agua de mar se acidifica, debido al aumento de la presión parcial de CO_2 en el sistema, se produce un aumento en la concentración de HCO_3^- ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) y, por tanto una disminución en la concentración de CO_3 ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos medidos (media \pm SD) o calculados (sistema carbonatos) durante el experimento. A_T : alcalinidad total; DO: oxígeno disuelto; $p\text{CO}_2$: presión parcial de CO_2 , HCO_3^- : concentración de bicarbonato, HCO_3^{2-} : concentración de ion carbonato; Ω_{ca} : saturación de calcita; Ω_{ar} : saturación de aragonita.

Parámetros	Control (8.1)	pH 7.5	pH 7.0	pH 6.5	
Medido	pH	8.16 \pm 0.03	7.53 \pm 0.02	7.07 \pm 0.04	6.53 \pm 0.02
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	15.51 \pm 0.03	15.49 \pm 0.03	15.49 \pm 0.03	15.50 \pm 0.04
	Salinidad (ppt)	5.27 \pm 0.07	5.29 \pm 0.05	5.29 \pm 0.08	5.24 \pm 0.06
	DO (%)	87.13 \pm 0.70	88.23 \pm 1.15	87.60 \pm 0.77	88.39 \pm 0.82
	A_T mg L^{-1}	233.89 \pm 2.49	235.53 \pm 2.56	237.53 \pm 4.27	244.78 \pm 7.19
	A_T $\mu\text{mol L}^{-1}$	2336.75 \pm 24.83	2353.14 \pm 25.55	2373.12 \pm 42.66	2445.60 \pm 71.87
	Calculado	$p\text{CO}_2$ (μatm)	655.50 \pm 51.73	3014.27 \pm 142.77	8772.54 \pm 856.02
HCO_3 ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)		2186.20 \pm 19.79	2316.26 \pm 24.28	2359.98 \pm 42.56	2441.96 \pm 71.78
CO_3 ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$)		71.74 \pm 5.62	17.58 \pm 1.15	6.30 \pm 0.53	1.87 \pm 0.12
Ω_{ar}		1.15 \pm 0.09	0.28 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00
Ω_{ca}		2.07 \pm 0.16	0.51 \pm 0.03	0.18 \pm 0.02	0.05 0.00

4.2 Fecundación

El número medio de huevos por cada hembra (Figura 10) se vio afectado tanto por el tratamiento de pH ($\text{MS}=102.675$, $F=26.191$, $p=0.0001$) como por las distintas generaciones ($\text{MS}=83.208$, $F=21.223$, $p=0.0001$) pero no hubo interacción entre estos dos factores ($p=0.63$). Según el test de Tukey hay tres grupos homogéneo el formado por el control, por el pH 7.5 y 7, y por el formado por pH 7 y 6.5. La media de la fecundidad de la F0 del control, 16.5 ± 0.6 , fue ligeramente superior a la registrada en los demás tratamientos de pH, si bien esta fecundación en el control de la F2 se redujo un 14.5%. Los copépodos cultivados a pH más ácidos, incluso aquéllos mantenidos a pH 7.5, fueron incapaces de alcanzar la segunda

generación. La reducción que sufrieron en la fecundidad en la F1 fue de 3.6% para los individuos a pH 7.5, 13.3% en aquéllos cultivados a pH 7.0 y 24.5% en los copépodos que vivían a pH 6.0. Las fotografías de la Figura 11, permiten comparar la producción de huevos de las hembras ovígeras del control, pH 7.5 y pH 7.0, en las que a simple vista se ve la reducción de la producción de huevos.

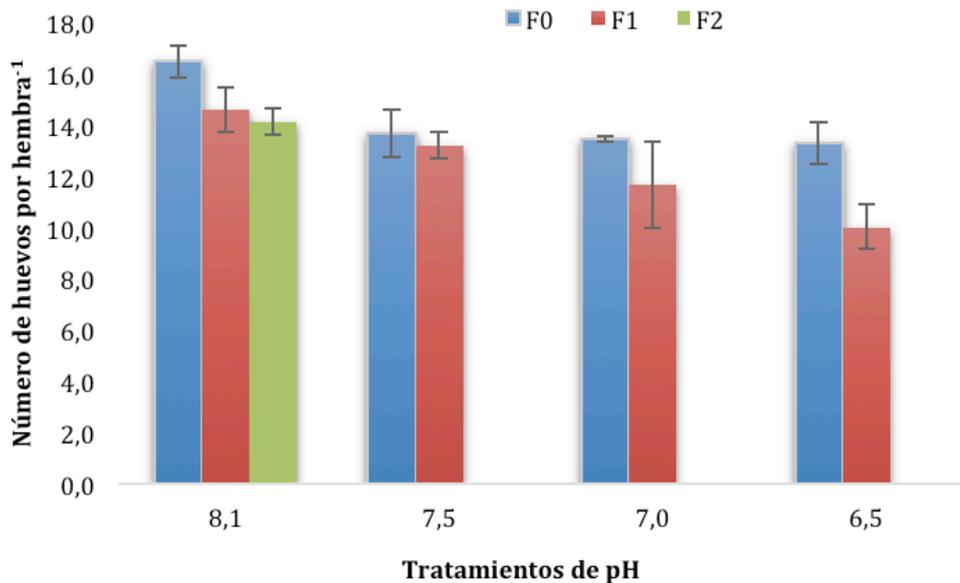


Figura 10. Número medio de huevos por cada hembra de *Acartia tonsa*, en el control y los tres tratamientos de pH. n = 5 (F0 y F1), n = 3 para F2, barra de error = SD.

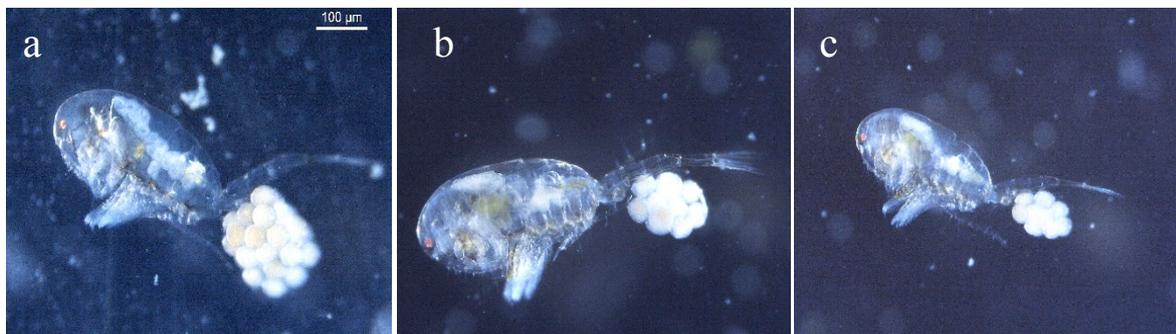


Figura 11. Hembras portadoras de huevos a de los tanques a diferentes pH, se puede ver que a menos pH hay una producción reducida de huevos a) pH 8.1, b) pH 7.5, c) pH 7.0.

4.3 Liberación de huevos al medio por parte de las hembras ovígeras

La liberación de huevos al medio por parte de las hembras ovígeras fue significativamente distinta tanto en los distintos tratamientos de pH (MS=3.15, F=37.83, p=0.0001) como en las distintas generaciones (MS=3.374, F=40.50, p=0.0001). Además hubo interacción significativa entre estos dos factores: generación y tratamiento de pH (MS=1.15, F=13.83, p=0.0001). Según las comparaciones múltiples, la fecundidad de todos los

tratamientos de pH fueron significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$), excepto en el pH 7 y 6.5 ($p = 0.752$). Excepto en los tanques control y aquellos a pH 7.5, a medida que pasaban las generaciones, el efecto negativo de la acidificación del agua aumentaba (Figura 12). Las hembras ovígeras de F0 tanto del control como las provenientes del pH menos ácido, 7.5, liberaron un 60% de sus huevos al medio mientras que aquéllos expuestos a pH más ácidos (pH 7.0, 6.5) solo liberaron un $53\% \pm 0.57$ y un $47\% \pm 0.57$ respectivamente (Figura 12). Este porcentaje se mantiene en el control y en el pH 7.5 en la F1 pero en los más ácidos disminuye al 20%. En la F2 solo los copépodos del control consiguieron reproducirse, con una liberación del 60%.

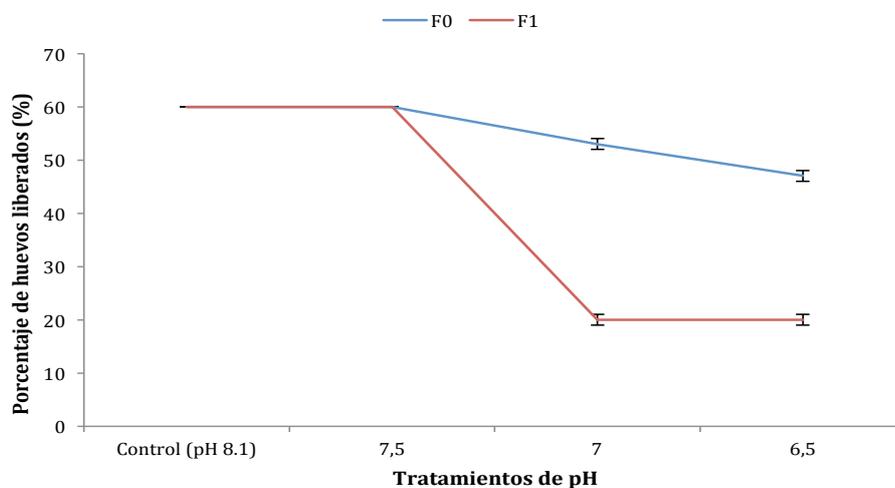


Figura 12. Porcentaje medio de huevos liberados por las hembras ovígeras cultivadas a distintos tratamientos de pH y a lo largo de dos generaciones. Barra de error = SD.

4.4 Éxito de eclosión de huevos y el número de nauplios por cada hembra

El éxito de eclosión, definido como el porcentaje de huevos que se desarrollan en nauplios, y el número de nauplios por cada hembra de *A. tonsa* también se vio afectado por la acidificación del agua ($MS = 239.26$, $F = 85.706$, $p = 0.0001$) a lo largo de las generaciones ($MS = 442.042$, $F = 138.343$, $p = 0.0001$) si bien no hubo interacción entre los dos factores. El éxito de eclosión provenientes de las hembras del control presentaron un valor medio muy similar a aquéllas mantenidas a pH 7.5 tanto en la F0 (34.56 ± 0.54 para control; 33.71 ± 1.26 para pH 7.5) como para la siguiente generación, F1 (27.13 ± 5.70 para control, 26.73 ± 1.28), si bien las hembras del control consiguieron alcanzar la F2 y las de pH 7.5, no. El éxito de eclosión de los huevos producidos por las hembras cultivadas tanto a pH 7 como pH 6.5 mostró una ligera reducción en la F0 (28.71 ± 2.34 para pH 7; 21.20 ± 2.62 para pH 6.5) que fue mucho más drástica en la F1 (9.97 ± 1.62 para pH 7; 12.16 ± 2.91 para pH 6.5) (Figura 13). En

la Figura 14 se muestra el número medio de nauplios nacidos por hembra ovígera en cada tratamiento en donde se señala con una letra diferente los grupos homogéneos formados por el test de Tukey ($p < 0.05$). En la generación F0 hay diferencias significativas entre el pH 8.1 (control) y el resto de los tratamientos. En la F1 hay diferencias significativas entre todos los tratamientos.

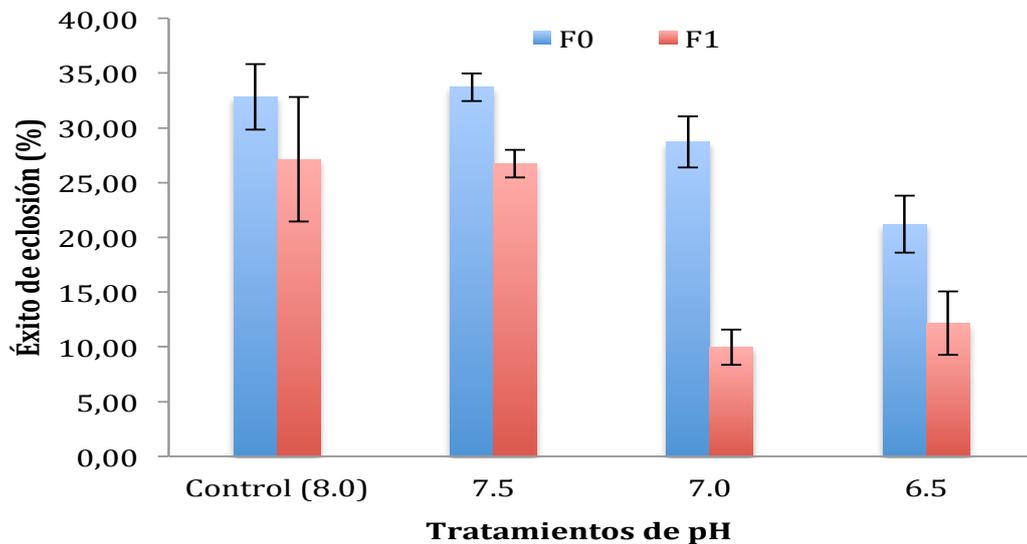


Figura 13. Porcentaje del éxito de eclosión de los huevos provenientes de las hembras cultivadas a distintos tratamientos de pH y a lo largo de dos generaciones. Barra de error = SD.

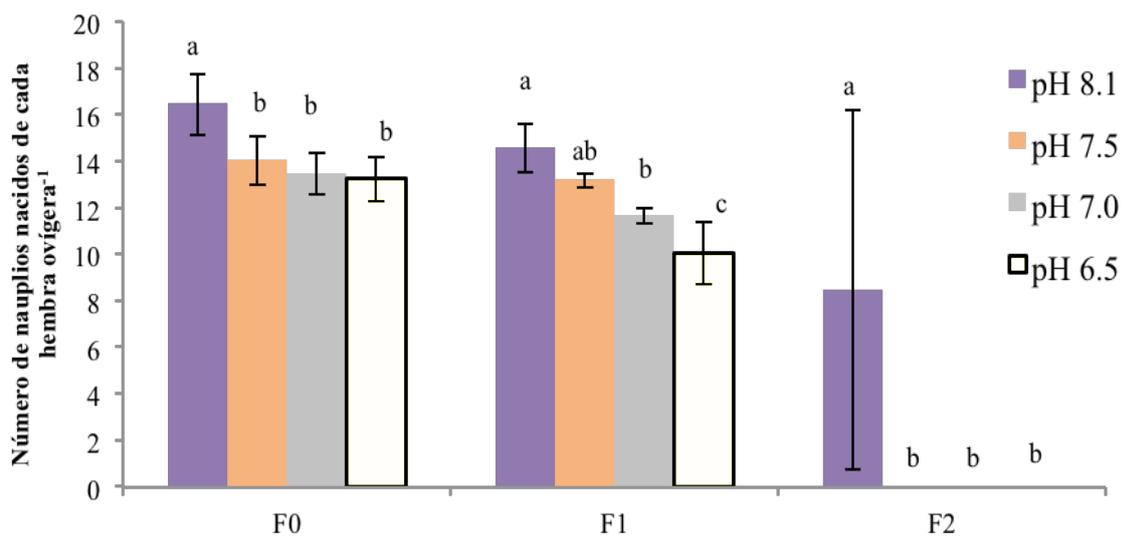


Figura 14. Número promedio de nauplios incubados por cada hembra ovígera de *A. tonsa* en cada tratamiento. Cada barra de error con letra diferente indica una diferencia significativa entre los tratamientos mediante el test de Tukey a $p \leq 0.05$ ($n = 5$). Barra de error = SD.

4.5 Tasa de supervivencia

La tasa media de supervivencia desde el estado nauplio hasta el adulto de *A. tonsa* se redujo significativamente tanto en los distintos tratamientos de pH estudiados (MS=238.944, F=110.28, p=0.0001) como en las generaciones (MS=726.0, F=335.1, p=0.0001) pero no hubo interacción entre estos dos factores (p=0.209). La tasa de supervivencia en la generación F2 disminuye respecto a la F1, y también a lo largo de los tratamientos de pH dentro de una misma generación (tanto en F1 como en F2), sin embargo cada generación se comporta de forma diferente en relación a los tratamientos de pH estudiados (Figura 15). En la F2 no sobrevivió ningún individuo en el tratamiento con pH 6.5. En la F0 el tiempo que tardaron los nauplios en convertirse en adultos fue de 16 días, mientras que para la F1 fue de 21 días.

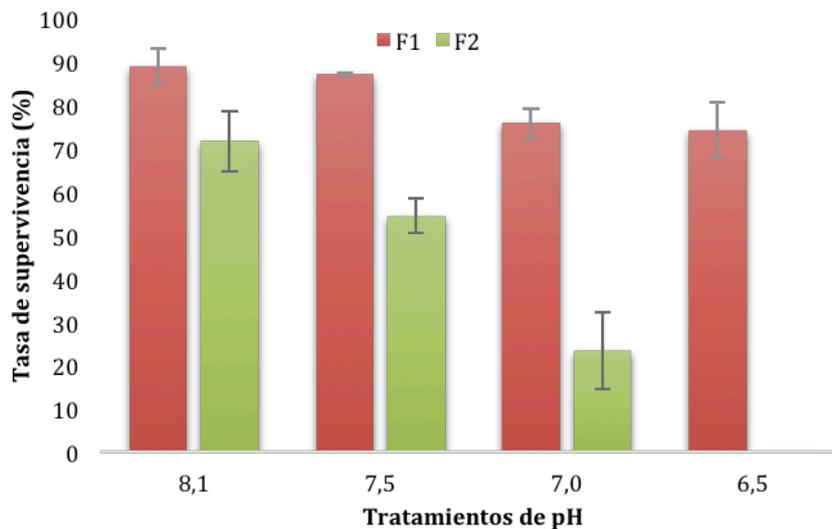


Figura 15. Tasa media de supervivencia (%) de *Acartia* desde Nauplio a Adulto en las generaciones F1 y F2, bajo el control y los tres tratamientos de pH. Barra de error = SD.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar cómo la AO afecta al éxito reproductivo de los copépodos a lo largo de varias generaciones (F0, F1 y F2), específicamente de *A. tonsa*.

Según los datos obtenidos *A. tonsa* sufrió una reducción significativa de la fecundidad, siendo en la generación F1 (respecto al control): un 3,6% menos en el tratamiento de pH 7.5, un 13,3% menos en el pH 7.0 y los copépodos del pH 6.0 redujeron su fertilidad en un 24,5%. De igual modo ocurrió con la fecundidad de *P. acuspes*, que se vio disminuida en un 29%, cuando se expuso a las condiciones de AO previstas para el año 2100 (pH 7.6) (Bailey et al.,

2017). También tuvieron un efecto negativo en su fecundidad los copépodos *T. battagliai*, *T. japonicus* (Wang et al., 2018) y *Centropages typicus* Krøyer, 1849 (McConville et al., 2013), cuando se expusieron a escenarios de AO futuros.

El éxito de eclosión se vio afectado significativamente por la acidificación del agua y a lo largo de las generaciones, el éxito de eclosión de los huevos producidos por las hembras de F0 que estuvieron expuestas a pH 7 se redujeron en un 28.71%±2.34 y las del pH 6.5 disminuyeron ligeramente en 12.16%±2.9, habiendo diferencias significativas entre el control y los demás tratamientos. Sin embargo, en la F1 la disminución en el éxito de eclosión fue más significativo en todos los tratamientos. En estudios previos como en el de Cripps et al. (2014b) el éxito de eclosión de los huevos de *A. tonsa* se redujeron en un 10% para los valores de pCO₂ previstos para el año 2100, y en más de un 90% para los tratamientos de pH más ácidos. En *C. glacialis* se redujo significativamente la tasa de eclosión cuando se expuso a pH 6.9 (Thor et al., 2016) y en el copépodo *C. finmarchicus* el éxito de eclosión fue del 45% cuando fueron cultivados al mismo pH (Mayor et al., 2007; Thor et al., 2018). En el artículo de Zhang et al. (2011), *Acartia spinicauda* Giesbrecht, 1889 tuvo un éxito de eclosión un poco menor al de nuestro experimento, siendo del 18,59% y 8,97% para los tratamientos con pH más ácidos (pH 7.0 y 6.6 respectivamente). El éxito de eclosión de *Acartia steueri* Smirnov, 1936 disminuyó, al igual que en nuestro caso, a lo largo de tres generaciones (Thor et al., 2018). Además, Mayor et al. (2015) confirman que los copépodos de la especie *Calanus* sp. redujeron el éxito de eclosión de sus huevos, al igual que las tasas de supervivencia y desarrollo, cuando se expusieron las condiciones de AO previstas para el futuro.

La tasa de supervivencia desde nauplio a adulto se ve afectada tanto en los distintos pH estudiados como a lo largo de las generaciones (F1 y F2), siendo los valores de la F2 los más desfavorables, ya que en el pH 6.5 no sobrevivió ningún individuo. Además, el tiempo que tardan los nauplios en convertirse en adultos en la F1 fue mayor (21 días), respecto a los 16 días que tardaron en madurar los de la F0. En el estudio de laboratorio de Smith et al. (2017) se produjo una disminución del 70% de supervivencia del copépodo *Labidocera* sp. en condiciones de pH ácido (entre 7.0 y 6.5). En la especie *T. japonicus* se redujo la tasa de supervivencia en más del 20% cuando estuvieron expuestos a pH 7.0 (Oh et al., 2017) y en *C. finmarchicus* disminuyó al 99,7% en el tratamiento con pH más bajo (Pedersen et al., 2013). El copépodo *C. glacialis* también presentó una mayor reducción de la supervivencia a pH 7.8 respecto al pH control (8.2) (Thor et al., 2016), y en el caso de *A. tsuensis* y *Acartia erythraea*

Giesbrecht, 1889 la supervivencia disminuyó hasta en un 60% cuando se expusieron a agua de mar con alto contenido en CO₂ (Kurihara e Ishimatsu, 2008; Wang et al., 2018). Lo que no podemos determinar es si la alta mortalidad fue causada por la acidificación, o por el cambio de la fuente alimentos endógenos a exógenos en los nauplios (Kurihara e Ishimatsu, 2008).

Lamentablemente, no se ha podido estudiar el efecto transgeneracional del copépodo *A. tonsa* a la acidificación futura, ya que ni si quiera el pH más alto testado (pH 7.5) logró alcanzar la segunda generación. Trabajos previos al presente han conseguido cultivar hasta cinco generaciones de la especie *Tigriopus californicus* (Baker, 1912) para observar si dicho copépodo podía adaptarse a diferentes factores estresantes (Kelly et al., 2016). Otros investigadores han realizado estudios intentando comprobar los efectos de la AO en el copépodo *A. tsuensis* al menos durante dos generaciones, pero no pudieron comprobar los efectos de la AO en la producción de huevos ni en el éxito de eclosión en ninguna generación en respuesta a una exposición a pCO₂ de 2380 µatm (pH 7.32) (Kurihara e Ishimatsu, 2008). Igualmente, el estudio multigeneracional del copépodo *T. japonicus* también reveló que un nivel de AO cercano al futuro (1000 µatm) no tuvo impactos negativos sobre el crecimiento o la reproducción de cuatro generaciones (Li et al., 2017; Wang et al., 2018). Por lo tanto, la robustez del copépodo al estrés de pCO₂ puede explicarse por la aclimatación fisiológica, o dicho de otra manera, por la plasticidad fenotípica (Kurihara e Ishimatsu, 2008; Li et al., 2017; Wang et al., 2018).

En algunos estudios se afirma que los copéodos que están expuestos a variaciones diarias de pH (migraciones verticales), pueden ser más robustas a los cambios en el CO₂ como ocurre como *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880), en el que la tasa de eclosión y supervivencia de los nauplios no se ve afectada por la concentración de CO₂ pronosticadas para el futuro (Almén et al., 2016; Lewis et al., 2013), sin embargo, a pesar de ser *A. tonsa* un copépodo con migración vertical, según los resultados de este estudio sí se ve afectado por las concentraciones de CO₂ futuras.

También se observó que las hembras ovígeras de nuestro experimento no han liberado sus huevos como se esperaba en esta especie (González, 2013), si no que los han mantenido unidos después de ser fertilizados, esto según Holm et al. (2018) puede ocurrir con algunas especies de copéodos cuando experimentan algún cambio brusco en las condiciones

ambientales. Estos huevos presentan un retraso en la liberación y pueden tener un menor éxito en la eclosión.

En definitiva, los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que la futura acidificación marina sí tiene efectos negativos relevantes en la supervivencia, reproducción y desarrollo en la población del copépodo marino *A. tonsa*. Por lo que se podría haber subestimado los efectos dañinos de la AO en copépodos y por consiguiente en toda la cadena trófica que éstos mantienen, por lo que este tema debe ser revisado.

6. CONCLUSIONES

1. Según nuestro experimento los copépodos de la especie *A. tonsa* recogidos en el río Guadalquivir sí se ven afectados por la acidificación del medio marino.
2. El éxito de eclosión, la tasa de liberación de huevos por las hembras ovígeras y la tasa de supervivencia se vieron afectadas significativamente por la acidificación del agua (tratamientos de pH) y a lo largo de las generaciones (F0, F1 y F2).
3. No se pudo determinar si hubo respuesta transgeneracional.
4. Hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de pH y generaciones.
5. La acidificación oceánica experimental llevó a la desaparición completa de la población en la F2, sometida a los pH más ácidos que el control.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Almén, A.K. et al. 2016. Negligible effects of ocean acidification on *Eurytemora affinis* (Copepoda) offspring production. *Biogeosciences*, 13, pp. 1037-1048.
- Bailey, A. et al. 2017. Early life stages of the Arctic copepod *Calanus glacialis* are unaffected by increased seawater pCO₂. *ICES Journal of Marine Science*, 74(4), pp.996-1004.
- Basallote, M.D. et al. 2012. Lethal effects on different marine organisms, associated with sediment-seawater acidification deriving from CO₂ leakage. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), pp.2550-2560.
- Baumgartner, M.F. y Tarrant, A.M. 2017. The Physiology and Ecology of Diapause in Marine Copepods. *Annual Review of Marine Science*, 9(1), pp.387-411.
- Busch, D.S. et al. 2013. Potential impacts of ocean acidification on the Puget Sound food web. *ICES Journal of Marine Science*, 70, pp.823-833.
- Cabrera, F. et al. 1998. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC)*.
- Calliari, D. et al. 2008. Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 362(1), pp.18-25.
- Calosi, P. et al. 2013. Adaptation and acclimatization to ocean acidification in marine ectotherms: an in situ transplant experiment with polychaetes at a shallow CO₂ vent system. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*.
- Cao, Z. et al. 2015. Influence of CO₂-induced seawater acidification on the development and lifetime reproduction of *Tigriopus japonicus* Mori, 1938. *Journal of Natural History*, 49(45-48), pp.2813-2826.
- CO₂.earth, 2018. CO₂.earth. Disponible en: <https://www.co2.earth/annual-co2> [Acceso mayo 21, 2018].
- Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, 2017. La Demarcación Hidrográfica del Guadalquivir. *Portal de Datos Abiertos del Gobierno de España (datos.gob.es)*. Disponible en: <http://www.chguadalquivir.es/la-demarcacion-hidrografica-del-guadalquivir> [Acceso abril 25, 2018].
- Cripps, G. et al. 2014a. Have we been underestimating the effects of ocean acidification in zooplankton? *Global Change Biology*, 20(11), pp.3377-3385.
- Cripps, G. et al. 2014b. Parental exposure to elevated pCO₂ influences the reproductive success of copepods. *Journal of Plankton Research*, 36(5), pp.1165-1174.
- Doney, S.C. 2006. The dangers of ocean acidification. *Scientific American*, 294(3), pp.58-65.
- Dupont, S. y Pörtner, H. 2013. Get ready for ocean acidification. *Nature*, 498(7455), p.429.
- Easy Reefs®, 2015. Liofilizados - Cómo se usa: Resuspensión de easy reefs ®. Disponible en: http://www.easyreefs.com/liofilizado_resuspension.html [Acceso mayo 28, 2018].
- Engström-Öst, J. et al. 2014. The effects of short-term pH decrease on the reproductive output of the copepod *Acartia bifilosa* - a laboratory study. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 47(3), pp.173-183.
- Fitzer, S.C. et al. 2012. Ocean acidification induces multi-generational decline in copepod naupliar production with possible conflict for reproductive resource allocation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 418-419, pp.30-36.
- Geiß, C. et al. 2015. Validation of reproduction tests with molluscs – Establishment of an OECD test guideline for the identification of endocrine and reproductive toxic effects in snails, p.223.
- Gienapp, P. et al. 2008. Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, 17(1), pp.167-178.

- Giménez, X. 2015. El mar es básico. *Investigación y Ciencia*. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/fisica-y-quimica/39/posts/el-mar-es-bsico-13433> [Acceso febrero 27, 2018].
- Gómez-Aguirre, S. 2001. Migración vertical de *Acartia tonsa* y *A. lilljeborgii* (Crustacea: Copepoda) durante un eclipse de sol. *Anales del Instituto de Biología, UAM, Serie Zoología*, 72(2), pp. 167-175.
- González, G. 2013. «*Acartia tonsa*» Online. *Animal Diversity Web*. Disponible en: http://animaldiversity.org/accounts/Acartia_tonsa/ [Acceso mayo 10, 2018].
- Gutiérrez, M. 2016. *Estudio de la comunidad de zooplancton en el estuario del Guadalquivir y su relación con las variables ambientales* (Tesis de Máster). Universidad de Cádiz
- Holm, M.W. et al. 2018. Resting eggs in free living marine and estuarine copepods. *Journal of Plankton Research*, 40(1), pp.2-15.
- IPCC, 2014. Cambio climático 2014. Impactos, adaptación y vulnerabilidad. *Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático*, p.34.
- Isari, S. et al. 2015. Copepod vital rates under CO₂-induced acidification: A calanoid species and a cyclopoid species under short-term exposures. *Journal of Plankton Research*, 37(5), pp.912-922.
- Jensen, 2010. NOBANIS -Invasive Alien Species -Fact Sheet - *Acartia Tonsa*. *Identification key to marine invasive species in Nordic waters – NOBANIS*.
- Jesus, T.F. et al. 2017. Protein analysis and gene expression indicate differential vulnerability of Iberian fish species under a climate change scenario. *PLoS ONE*, 12(7), pp.1-18.
- Junta de Andalucía, 2014. Calidad de las aguas superficiales. *Sistema de Indicadores Ambientales de la Red de Información Ambiental de Andalucía*. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/rediam/indicadores/2013/A_G04_2013.pdf [Acceso abril 25, 2018].
- Kelly, M.W. et al. 2016. Adaptation to climate change: trade-offs among responses to multiple stressors in an intertidal crustacean. *Evolutionary Applications*, 9(9), pp.1147-1155.
- Kurihara, H. e Ishimatsu, A. 2008. Effects of high CO₂ seawater on the copepod (*Acartia tonsa*) through all life stages and subsequent generations. *Marine Pollution Bulletin*, 56(6), pp.1086-1090.
- Lewis, C. N. et al. 2013. Sensitivity to ocean acidification parallels natural pCO₂ gradients experienced by Arctic copepods under winter sea ice. *PNAS Plus*, 110(51):E4960-7
- Li, Y. et al. 2017. Alleviation of mercury toxicity to a marine copepod under multigenerational exposure by ocean acidification. *Scientific Reports*, 7, 324.
- Marcus, N.H. y Wilcox, J.A. 2007. Guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*. Florida State University.
- Mauchline, J. et al. 1998. The biology of calanoid copepods. *Academic Press*.
- Mayor, D.J. et al. 2007. CO₂-induced acidification affects hatching success in *Calanus finmarchicus*. *Marine Ecology Progress Series*, 350, 91–97.
- Mayor, D.J. et al. 2015. The metabolic response of marine copepods to environmental warming and ocean acidification in the absence of food. *Scientific Reports*, 5:13690.
- McConville, K. et al. 2013. Effects of elevated CO₂ on the reproduction of two calanoid copepods. *Marine Pollution Bulletin*, 73(2), pp.428-434.
- Merilä, J. y Hendry, A.P. 2013. Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: The problem and the evidence. *Evolutionary Applications*, 7(1), pp.1-14.
- Munday, P.L. 2014. Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *Prime Reports*, 6 (November), pp.1-7.
- NOAA, 2014. NOAA Ocean Acidification Program. Disponible en: <http://oceanacidification.noaa.gov/> [Acceso mayo 15, 2018].

- Oh, J.H. et al. 2017. Effect of increased $p\text{CO}_2$ in seawater on survival rate of different developmental stages of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Animal Cells and Systems*, 21(3), pp.217-222.
- Pedersen, S.A. et al. 2014. Effects of elevated carbon dioxide (CO_2) concentrations on early developmental stages of the marine copepod *Calanus finmarchicus* gunnerus (Copepoda: Calanoidae). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 77(9-11), pp.535-549.
- Pedersen, S.A. et al. 2013. Medium-term exposure of the North Atlantic copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus, 1770) to CO_2 -acidified seawater: Effects on survival and development. *Biogeosciences*, 10(11), pp.7481-7491.
- Phillimore, A.B. et al. 2010. Differences in spawning date between populations of common frog reveal local adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), pp.8292-8297.
- Pörtner, H.O. et al. 2014. Ocean systems. *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation and Vulnerability: Part A: Global and Sectoral Aspects*, pp.411-484.
- Raven, J. et al. 2005. Ocean Acidification due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide. *The Royal Society*, (June), p.68.
- Rodríguez-Romero, A. et al. 2014. Simulation of CO_2 leakages during injection and storage in sub-seabed geological formations: Metal mobilization and biota effects. *Environment International*, 68, pp.105-117.
- Rodríguez-Romero, A. et al. 2015. Multi-generational responses of a marine polychaete to a rapid change in seawater $p\text{CO}_2$. *Evolutionary Applications*, 9(9), pp.1082-1095.
- Rodríguez, V. 2011. Guadalquivir River. *ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA*. Disponible en: <https://www.britannica.com/place/Guadalquivir-River> [Acceso marzo 23, 2018].
- Rojas-Higuera, P.J. y Pabón-Caicedo, D. 2015. Sobre el calentamiento y la acidificación del océano mundial y su posible expresión en el medio marino costero colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*, 39(151), pp.201-217.
- Sabine, C.L. et al. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO_2 . *Science*, 305(5682), pp.367-371.
- Salinas, S. y Munch, S.B. 2012. Thermal legacies: Transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate. *Ecology Letters*, 15(2), pp.159-163.
- Seebacher, F. et al. 2005. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. *The Royal Society*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1626235/>. [Acceso mayo 3, 2018].
- Seebens, H. et al. 2009. Copepod life cycle adaptations and success in response to phytoplankton spring bloom phenology. *Global Change Biology*, 15(6), pp.1394-1404.
- Smith, J.N. et al. 2017. Pontellid copepods, *Labidocera* spp., affected by ocean acidification: A field study at natural CO_2 seeps. *PLoS ONE*, 12(5), pp.1-19.
- Teixeira, P.F. et al. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(2), pp.333-339.
- Thor, P y Dupont, S. 2015. Transgenerational effects alleviate severe fecundity loss during ocean acidification in a ubiquitous planktonic copepod. *Global Change Biology*, 21, pp. 2261-2271.
- Thor, P. et al. 2016. Seawater pH predicted for the year 2100 affects the metabolic response to feeding in copepodites of the arctic copepod *Calanus glacialis*. *PLoS ONE*, 11(12), p.14.
- Thor, P. et al. 2018. No maternal or direct effects of ocean acidification on egg hatching in the Arctic copepod *Calanus glacialis*. *PloS ONE*, 13(2): e01922496
- Visser, M.E. 2008. Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *The Royal Society*. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2409451/> [Acceso abril 10, 2018].
- Wang, M. et al. 2018. Effects of ocean acidification on copepods. *Aquatic Toxicology*, 196(January), pp.17-24.
- Wang, M. et al. 2017. Global Proteome Profiling of a Marine Copepod and the Mitigating Effect of Ocean Acidification on Mercury Toxicity after Multigenerational Exposure. *Environmental Science and Technology*, 51(10), pp.5820-5831.
- Weydmann, A. et al. 2012. Influence of CO₂-induced acidification on the reproduction of a key Arctic copepod *Calanus glacialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 428, pp.39-42.
- Zervoudaki, S. et al. 2014. Effects of low pH and raised temperature on egg production, hatching and metabolic rates of a Mediterranean copepod species (*Acartia clausi*) under oligotrophic conditions. *Mediterranean Marine Science*, 15(1), pp.74-83.
- Zhang, D. et al. 2011. Impacts of CO₂-driven seawater acidification on survival, egg production rate and hatching success of four marine copepods. *Acta Oceanologica Sinica*, 30(6), pp.86-94.
- Zhang, D. et al. 2016. Response of antioxidant defense system in copepod *Calanus sinicus* Brodsky exposed to CO₂-acidified seawater. *Acta Oceanologica Sinica*, 35(8), pp.82-88.