



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS Y PESQUERÍAS
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

Contribución de especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos a
la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

Maestro en Ecología y Pesquerías

PRESENTA:

Biól. Carlos Francisco Rodríguez Gómez

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ

ABRIL 2013.



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS MARINAS Y PESQUERÍAS

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

Contribución de especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos a la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

Maestro en Ecología y Pesquerías

PRESENTA:

Biól. Carlos Francisco Rodríguez Gómez

COMITÉ TUTORAL:

Director de Tesis

Dr. José Antolín Aké Castillo

Asesores

Dr. Yury Okolodkov

Dr. Felipe Fernando Martínez Jerónimo

Dra. Nayeli Domínguez Castanedo

Dr. Horacio Pérez España

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ

ABRIL 2013.



Universidad Veracruzana

**Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías
Coordinación del Posgrado en Ecología y Pesquerías**

**C. BIOL. CARLOS FRANCISCO RODRIGUEZ GOMEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS
UNIVERSIDAD VERACRUZANA
P R E S E N T E**

Habiendo sido debidamente revisado y aceptado el trabajo escrito de su tesis denominada "Contribución de especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos a la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano" por los integrantes de su comité tutorial y estando todos ellos de acuerdo que tanto el contenido como el formato de este trabajo es satisfactorio como prueba escrita para sustentar su examen final de posgrado de la MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS se le autoriza a usted proceda a su impresión.

Sin otro particular, me es grato reiterarle la seguridad de mi más distinguida consideración.

ATENTAMENTE

"LIS DE VERACRUZ: ARTE, CIENCIA, LUZ"
Boca del Río, Ver. Abril 3 del 2013

Dra. María de Lourdes Jiménez Badillo
Directora

INSTITUTO DE
CIENCIAS MARINAS
Y PESQUERIAS
BOCA DEL RIO, VER.



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
COORDINACIÓN DEL
POSGRADO EN
ECOLOGÍA Y PESQUERÍAS

Calle
Independencia
No. 30
Pisos 1 y 2
Colonia Centro
CP 94290
Boca del Río,
Veracruz,
México

Teléfono
(229) 202 28 28

DEDICATORIA

A mi hija Karlita, tu sola existencia me hizo darme cuenta de lo verdaderamente importante en la vida. Tu sonrisa siempre fue el mejor remedio para cualquier complicación.

A mi esposa, por darme una hija hermosa y por su apoyo para cumplir con este objetivo de vida.

A mis padres, porque lo que hoy soy es enteramente debido a ustedes. Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A toda la plantilla docente y administrativa del Posgrado en Ecología y Pesquerías y el Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías de la Universidad Veracruzana por brindarme la oportunidad de cumplir una meta personal. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (número de becario 256834).

A mi Comité Tutorial, en especial agradezco a mi director de tesis, el Dr. José A. Aké Castillo por procurar mi crecimiento académico cuidando todos los aspectos necesarios para terminar en tiempo y forma esta tesis; por la amistad, el apoyo, las oportunidades y los consejos. Al Dr. Yury Okolodkov por sus recomendaciones y por la gran cantidad de literatura puesta a mi disposición. Al Dr. Fernando Martínez por la oportunidad de aprender en su laboratorio. A la Dra. Nayeli Domínguez y el Dr. Horacio Pérez España por sus comentarios para mejorar sustancialmente este escrito.

A la M.C. Sandra Guerra por su invaluable tiempo y ayuda con la implementación de los cultivos durante mi estancia en la ENCB. A la M.C. Guadalupe Campos y al Acuario de Veracruz por la facilidad para utilizar sus instalaciones durante mis primeros ensayos.

Al Dr. Gilberto Gaxiola Castro por las amables invitaciones al taller y curso de ciclos biogeoquímicos marinos en CICESE, sin duda me permitieron entender el contexto donde se enmarca mi trabajo.

A los técnicos del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales Dora A. Quintanilla-Huerta y Ana R. Cristóbal-Ramos del CINVESTAV-IPN Unidad Mérida por la toma de fotografías en microscopía electrónica.

A quiénes hicieron más amenas las salidas de campo. A mis compañeros de generación por las discusiones que enriquecieron este trabajo. A la familia Robles Jiménez por cuidar de mi esposa e hija durante mis periodos de ausencia. A todos los amigos, compañeros, colegas y demás personas que por cuestión de espacio no ven su nombre en este apartado, pero que sin duda fueron partícipes en mi formación.

Esta investigación se benefició del proyecto del programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) UV-PTC-415 asignado al Dr. José Aké y el proyecto PROMEP “Patrones de distribución de la diversidad y biomasa de grupos funcionales clave para el Sistema Arrecifal Veracruzano” para fortalecimiento de cuerpos académicos: Arrecifes Coralinos.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la contribución en la biomasa de distintas especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV), se evaluó la concentración de clorofila-a (Cl-a) por espectrofotometría (método tricromático) y el biovolumen (BV) de células fijadas y vivas en cuatro cultivos no axénicos de diatomeas. En muestras de campo se determinó la biomasa fitoplanctónica total y se caracterizó a la comunidad fitoplanctónica para identificar aquellas muestras donde las especies más abundantes fueron las especies aisladas: *Thalassiosira hispida*, *Cylindrotheca closterium*, *Skeletonema costatum* y *Pseudo-nitzschia* spp. La concentración celular de Cl-a calculada en los cultivos de diatomeas fue aplicada a las abundancias encontradas en el ambiente natural para conocer su aporte en el sistema. La biomasa estimada a partir de la concentración de Cl-a de *T. hispida* ($6.9784 \text{ pgCl-a/cel} = 109.46 \text{ pgC/cel}$), *Pseudo-nitzschia* spp. ($0.6968 \text{ pgCl-a/cel} = 10.9307 \text{ pgC/cel}$), *C. closterium* ($0.9445 \text{ pgCl-a/cel} = 14.8157 \text{ pgC/cel}$) y *S. costatum* ($1.13815 \text{ pgCl-a/cel} = 17.8523 \text{ pgC/cel}$) resultó menor que otras estimaciones a nivel mundial, lo que sugiere una influencia de la temperatura sobre la concentración de Cl-a. Las mediciones de BV indican que el Lugol-acetato modifica el tamaño de las células de manera significativa en *C. closterium* y *Pseudo-nitzschia* spp., no siendo así con *S. costatum* y *T. hispida*. Por esta razón, se presentan dos ecuaciones aplicables para diatomeas de la zona para cuantificar la biomasa a partir de mediciones morfométricas de las células vivas ($\text{pgC/cel} = -1.5567 + 0.1428(\text{BV})$) y fijadas con Lugol-acetato ($\text{pgC/cel} = -5.0126 + 0.1644(\text{BV})$). La contribución calculada a la biomasa fitoplanctónica total de las especies aisladas revelan que aunque dichas especies sean cuantitativamente dominantes dentro de la comunidad fitoplanctónica del PNSAV (en algunos casos mayor al 90%), no son las dominantes en términos de la biomasa total (<13%).

Palabras clave: mareas rojas, carbono, clorofila-a, cultivos de fitoplancton, biovolumen.

ABSTRACT

In order to determine the contribution of the biomass of different planktonic species forming harmful algal blooms in the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano (NPSAV), we assessed the concentration of chlorophyll-a (Chl-a) by spectrophotometry (trichromatic method) and biovolume (BV) of fixed and living cells in four non axenic cultures of diatoms. In field samples, we determined the total phytoplankton biomass and characterized the phytoplankton community to identify those samples where the most abundant was the isolated species: *Thalassiosira hispida*, *Cylindrotheca closterium*, *Skeletonema costatum* and *Pseudo-nitzschia* spp. The cellular concentration of Chl-a calculated in diatom cultures was applied to the abundances found in the natural environment to assess their contribution to the system. Biomass estimated from the concentration of Chl-a in *T. hispida* ($6.9784 \text{ pgChl-a/cell} = 109.46 \text{ pgC/cell}$), *Pseudo-nitzschia* spp. ($0.6968 \text{ pgChl-a/cell} = 10.9307 \text{ pgC/cell}$) *C. closterium* ($0.9445 \text{ pgChl-a/cell} = 14.8157 \text{ pgC/cell}$) and *S. costatum* ($1.13815 \text{ pgChl-a/cell} = 17.8523 \text{ pgC/cell}$) is low compared to other global estimates, suggesting an influence of temperature on Chl-a concentration. Biovolume measurements indicate that alkaline Lugol's solution significantly reduces the cell size of *C. closterium* and *Pseudo-nitzschia* spp. but not that of *S. costatum* and *T. hispida*. Therefore, two equations applicable to diatoms of the zone are presented to quantify the phytoplankton biomass from morphometric measurements of living cells ($\text{pgC/cell} = -1.5567 + 0.1428 (\text{BV})$) and from cells fixed with alkaline Lugol's ($\text{pgC/cell} = -5.0126 + 0.1644 (\text{BV})$). The calculated contribution of individual species to the total phytoplankton biomass revealed that although they are numerically dominant in the phytoplankton community of NPSAV (in some cases over 90%) is not dominant in terms of total biomass (<13 %).

Keywords: red tides, carbon, chlorophyll-a, phytoplankton cultures, biovolume.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. HIPÓTESIS.....	8
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 OBJETIVO GENERAL	8
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	9
5. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	9
5.2 MUESTREO.....	10
5.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	12
5.4 AISLAMIENTO CELULAR E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	13
5.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	15
5.6 DETERMINACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	16
5.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE BIOVOLUMEN	17
5.8 OBTENCIÓN DE ABUNDANCIAS RELATIVAS EN CAMPO Y APLICACIÓN DE BIOMASA OBTENIDA EN CULTIVO.....	18
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	19
6. RESULTADOS	20
6.1 TAXONOMÍA Y ESTADO DE LAS ESPECIES FITOPLANCTÓNICAS EN CULTIVO.	20
6.2 BIOMASA DE CÉLULAS FITOPLANCTÓNICAS.....	26
6.3 BIOVOLUMEN	26
6.4 RELACIÓN DE BIOMASA Y BIOVOLUMEN	28
6.5 ABUNDANCIA RELATIVA DE MUESTRAS DEL MEDIO NATURAL	29
7. DISCUSIÓN.....	33
8. CONCLUSIONES.....	50
9. LITERATURA CITADA	52

1. INTRODUCCIÓN

Los florecimientos algales nocivos (FANs) se pueden definir como eventos caracterizados por el incremento súbito de la población de fitoplancton, el cuál sin ser necesariamente tóxico, puede ser nocivo para el medio y los organismos que en él habitan (Ochoa *et al.*, 2003). Estos fenómenos aparentemente se han venido incrementando en cuanto a su aparición a nivel global, afectando a la salud humana, al turismo, a las pesquerías y a los ecosistemas en general (Hallegraeff, 1993; Anderson *et al.*, 2011).

La zona costera juega un papel importante debido al aporte de nutrientes y materia orgánica terrestre hacia el medio marino (Gattuso, 1998; Kon-Kee *et al.*, 2010). El incremento de elementos como nitrógeno, fósforo y sílice en estas áreas y su relación con las condiciones físicas propicia la formación de los FANs (Hodgkiss & Ho, 1997).

La mayoría de las investigaciones de FANs están enfocadas en especies tóxicas por su alta importancia en las pesquerías y los efectos que pueden causar en la salud humana debido a la producción de toxinas (Zaccaroni & Scaravelli, 2008). Sin embargo, estos eventos pueden prescindir de la generación de sustancias tóxicas y de cualquier manera causar efectos nocivos en el ambiente. El bloqueo de las branquias en peces, la disminución de la incidencia luminosa en zonas profundas o las condiciones de hipoxia características en zonas de marea roja son sólo algunas consecuencias nocivas para el medio marino y los organismos que lo habitan (Landsberg *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista ecológico, las especies formadoras de FANs no sólo ejercen un papel negativo en cuanto a sus consecuencias sobre otros organismos; también contribuyen a la biomasa de un sistema de manera significativa tanto en periodos de florecimientos como en periodos de no florecimiento (Burkholder *et al.*, 2006).

Incluso se ha observado que los FANs llegan a elevar la biomasa del sistema de dos a cinco veces más de su estado normal como consecuencia del agente causal (Vargo *et al.*, 1987), lo que indica un aporte de carbono significativo al medio. Estos florecimientos pueden ser causados por distintos grupos de microalgas; sin embargo, debido a su incidencia los principales son los dinoflagelados, las diatomeas, las cianobacterias y los

cocolitofóridos (Hallegraeff, 1993; Brown, 1995; Iglesias-Rodríguez *et al.*, 2002; Smayda, 2002; Anderson *et al.*, 2011).

La especie dominante durante un FAN es usualmente el mayor contribuyente a la biomasa del sistema en un momento dado. La biomasa como tal es una medición de la masa viva de un área o volumen y puede representarse como el peso seco de los compuestos orgánicos presentes, expresado en unidades de carbono. Es así como esta característica ecológica, producto de la fotosíntesis, sienta las bases para el inicio de todas las tramas tróficas en el medio acuático.

Por medio de sensores remotos, sabemos que en el ambiente marino se lleva a cabo casi la mitad de la síntesis de materia orgánica en el planeta debido a la fotosíntesis (Longhurst *et al.*, 1995; Field *et al.*, 1998), lo que se conoce como productividad primaria. La comunidad fitoplanctónica es quien contribuye mayormente a la generación de materia orgánica, siendo esta producción mayor en la zona costera que en mar abierto (Uitz *et al.*, 2010).

Todo el fitoplancton marino presenta pigmentos fotosintéticos, pero la clorofila-a (Cl-a) es el único que se presenta en todas las clases de algas, debido a esto tradicionalmente se ha utilizado como un indicador de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica. Sin embargo, la contribución en la biomasa de un sistema se da en distintas proporciones, debido a una variación entre los contenidos de clorofila-a de los diferentes taxa que lo componen (Reynolds, 2006). De este modo, por sí sola la cuantificación de la Cl-a no nos permite conocer la biomasa de una especie dentro de una comunidad.

La biomasa se cuantifica de manera rutinaria mediante las determinaciones de biovolumen y su equivalente en unidades de carbono (Menden-Deuer & Lessard, 2000; LeBlanc *et al.*, 2012). Mediante este método es posible cuantificar la biomasa de diferentes grupos dentro del fitoplancton, al asumir un valor de conversión para cada uno de ellos (Verity *et al.*, 1992; Menden-Deuer & Lessard, 2000). A pesar de su uso generalizado, este método presenta diversos inconvenientes si se quiere conocer a una escala fina la contribución de una especie en los flujos de carbono, ya que la concentración de Cl-a varía en función de la densidad poblacional.

Por ejemplo se sabe que a mayores volúmenes, menor es el contenido clorofílico y viceversa (Menden-Deuer & Lessard, 2000). Aunado a esto, las mediciones se realizan usualmente en muestras fijadas con Lugol, lo que provoca una disminución en las dimensiones celulares de los organismos fitoplanctónicos (Hawkins *et al.*, 2005; Zarauz & Irigoien, 2008). El método del biovolumen resulta entonces poco preciso, aunque es el más utilizado para análisis de la biomasa de especies obtenidas del medio natural.

En este sentido, los cultivos celulares de especies fitoplanctónicas pueden ayudar a la cuantificación de parámetros de una sola especie, ya que se tienen controlados los factores (temperatura, salinidad, irradiancia, entre otros) que influyen en los organismos, lo que permite hacer inferencias en su ecología (Subba Rao, 2006). La medición de la biomasa mediante la cuantificación de Cl-a de un cultivo monoespecífico resulta entonces importante, ya que son datos que pueden ser contrastados con los obtenidos en una comunidad fitoplanctónica regional. Más aún, si en lugar de estimar la biomasa mediante el biovolumen se cuantifica la Cl-a, estaríamos realizando una aproximación más cercana al valor real al poseer una muestra monoespecífica análoga de un FAN.

Teniendo en cuenta que el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) históricamente ha sido impactado por FANs (Cortes-Altamirano, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2011) resulta de interés conocer el aporte de carbono de las especies causantes de dichos fenómenos para entender los flujos de carbono en el ambiente marino. Aunado a esto, los valores de Cl-a de la zona son valores puntuales y datan de hace más de 40 años; sin embargo, en la actualidad se están realizando esfuerzos para contar con una caracterización de la biomasa fitoplanctónica de la zona (Aké-Castillo, com. pers).

Debido a la aparición e incidencia de algunas especies formadoras de FANs en el PNSAV que llegan a provocar perturbaciones con el medio y otros organismos, es necesario conocer la contribución de estas especies a la biomasa de la zona realizando una evaluación más precisa sobre dicho parámetro que tradicionalmente se obtiene de valores de volumen celular sin una relación apropiada con su equivalencia en carbono.

El presente estudio determinó la contribución en la biomasa de diferentes especies formadoras de FANs en el PNSAV. Para ello se evaluó la clorofila-a de cultivos

monoespecíficos de especies formadoras de FANs de la zona, validando estos valores con las abundancias relativas en el medio natural de las especies aisladas en el laboratorio. Asimismo, se obtuvo la biomasa mediante la evaluación de los biovolúmenes en los cultivos celulares para relacionarlos con los obtenidos mediante Cl-a y obtener una ecuación de corrección.

2. ANTECEDENTES

Los estudios destinados a determinar el contenido de carbono en células fitoplanctónicas se han enfocado en cultivos monoalgales. Chan (1978) encontró una variación entre las especies de acuerdo con la razón de carbono y clorofila-a. Esto indica que una generalización de los valores obtenidos en campo, pueden llevar a hacer inferencias incorrectas si nos referimos a especies en particular.

Hunter & Laws (1981) estimaron la biomasa en términos de carbono de las especies *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt, *Amphiprora paludosa* W. Smith y *Dunaliella tertiolecta* Butcher, esta vez incorporando la razón ATP (adenosin-trifosfato): Carbono a la relación ya estudiada de clorofila. Sin embargo, Cullen (1982) sugirió que la variabilidad de carbono con respecto a la clorofila-a en estudios de campo es muy grande, por lo que su uso debe ser moderado.

Con el isótopo C_{14} como instrumento para evaluar la tasa de crecimiento de fitoplancton y la biomasa, Redalje & Laws (1981) hicieron uso de las mediciones de clorofila-a obteniendo valores de producción primaria en cultivos de fitoplancton. Las estimaciones se realizaron sobre cultivos de la diatomea *Thalassiosira fluviatilis*, obteniendo valores de carbono confiables.

Hansen *et al.* (2000) realizaron cultivos de los dinoflagelados marinos *Fragilidium subglobosum* (von Stosch) Loeblich III y *Ceratium tripos* O.F. Müller. Con base en la Cl-a, determinaron el contenido de carbono de ambas especies, encontrando que presentan valores muy parecidos.

Le Floch *et al.* (2002) realizaron estimaciones de clorofila-a en cultivos fitoplanctónicos, implementaron un sistema automático de cultivo con el fin de determinar la absorción del espectro de adquisición de las especies en cuestión. Sus resultados indican que la limitación de nitrógeno ejerce un efecto sobre la concentración de la Cl-a.

Las cuantificaciones de la biomasa fitoplanctónica mediante el biovolumen se han llevado a cabo debido a la relación existente entre este último y el contenido de carbono celular. Uno de los primeros trabajos en abordar dicha relación fue el de Mullin *et al.* (1966), en donde además de exponer una fórmula para transformar valores de volumen a carbono, también se establece la relación con el área superficial.

Strathman (1967) propuso otra serie de ecuaciones para el contenido de carbono y el volumen celular, sugiere que el grupo de las diatomeas debido a su baja concentración de carbono por volumen celular debe ser tratado como un grupo aparte para los cálculos de biomasa, dado que se separa principalmente de los dinoflagelados. La inclusión de la vacuola celular como un factor de error en el cálculo del biovolumen es mencionado por Smayda (1978), donde también expone un número mínimo de individuos a ser medidos para mejores cálculos. Miyai *et al.* (1988) utilizan las ecuaciones de Strathman (1967) para convertir el BV a carbono y a su vez, lo correlaciona con el contenido de clorofila-a de aguas costeras en Japón.

El trabajo de Montagnes *et al.* (1994) aparte de ofrecer las proporciones del biovolumen con carbono, también lo hacen con el nitrógeno, proteínas y la clorofila-a. Estos autores obtienen un valor de conversión de las células fijadas con Lugol al 2%. Concluyen que las células se encogen 33% en promedio al contacto con esta sustancia en la comunidad fitoplanctónica. La magnitud de esta constricción fue confirmada por Hawkins *et al.* (2005), quienes obtuvieron valores entre 30 y 40%, aunque esta vez para cianobacterias.

Hasta el año de 1999, no había un documento dedicado exclusivamente a la estandarización de fórmulas geométricas para la obtención del volumen celular. Aunque ya se conocían algunas formas básicas, fue el catálogo de Hillebrand *et al.* (1999) el que se convirtió en un referente en la mayoría de las investigaciones subsecuentes. Este catálogo

inicial fue extendido por otros investigadores con nuevas fórmulas (Sun & Liu, 2003; Bryantseva *et al.*, 2005; Vadrucci *et al.*, 2007; Idino & Striquer, 2011).

Después de mediciones de carbono sobre dinoflagelados y una extensa revisión bibliográfica sobre el tema, Menden-Deuer & Lessard (2000) establecieron la relación de C:BV y N:BV para distintos grupos componentes del fitoplancton, como diatomeas, clorofitas y por primera vez, para dinoflagelados, los formadores de FANs más recurrentes.

Aunque las bases del BV y su conversión a carbono ya estaban sentadas, las modificaciones a las técnicas siguieron, como la propuesta de Lyakh (2007) que indica que la discrepancia entre las fórmulas estándar de las formas reales de las células es bastante marcada, por lo que sugiere el uso de modelos en 3-D en algunos casos. López-Fuerte *et al.* (2007) proponen el uso combinado de la abundancia total y el BV para mejorar la aproximación al aporte de la biomasa de cada taxón en una asociación.

Debido a la complejidad de las mediciones de BV, el esfuerzo implementado y la variación entre las proporciones de BV:C, la técnica de biovolumen para estimar la biomasa resulta, aunque útil, poco exitosa, debido a la limitación de la información existente (Rott *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que tanto Cullen (1982) como Menden-Deuer & Lessard (2000) concluyeron que el relacionar el carbono con otra variable, como el volumen o la clorofila-a, no es la mejor opción si se quiere trabajar a gran escala, debido al error acumulado en los datos. La mayoría de los trabajos anteriores estiman el contenido de carbono en las células, pero sus resultados no están enfocados hacia especies formadoras de FANs.

En el Golfo de México existen trabajos que presentan datos que permiten al menos tener una idea de la distribución y abundancia de la biomasa, ya sea como valor puntual, o como una tasa en función del tiempo sin caracterizar los valores por contribución de las especies (Steele, 1964; Malone, 1971; Vargo *et al.*, 1987; Signoret *et al.*, 1998, 2006; Aguirre-Gómez, 2002; Okolodkov, 2003; Hidalgo-González *et al.*, 2005; Hidalgo-González & Álvarez-Borrego, 2008).

En el PNSAV son escasos los registros sobre estudios de la biomasa fitoplanctónica. Suárez-Caabro (1965) estimó la clorofila-a en la zona adyacente al puerto de Veracruz; sin embargo, sus datos son puntuales y no siguieron un muestreo sistemático. Okolodkov *et al.* (2011) presentaron un ciclo anual en donde se observa que septiembre es el mes con mayor biomasa planctónica del año, del cual el fitoplancton es una parte considerable.

Rodríguez-Gómez *et al.* (2011) evaluaron la tasa de fijación de carbono en la zona norte del PNSAV, en donde la zona de playa norte resultó ser la más productiva con respecto a sitios alejados de la costa, posiblemente debido a las descargas de origen antropogénico. Aké-Castillo & Morales-Sánchez (2012) realizaron un estudio similar en la zona sur del PNSAV, con resultados que indican valores menores comparados con la zona norte, además de observar mayor fijación de carbono en los meses lluviosos.

A pesar de contar con datos escasos sobre la biomasa de fitoplancton, se han reportado diversos eventos con respecto a FANs, siendo el primer reporte de mortandad de peces en el año de 1797 con el dinoflagelado *Karenia brevis* (C.C. Davis) G. Hansen & Ø Moestrup como agente causal (Cortés-Altamirano, 1998). Posteriormente Ramírez-Granados (1963) describió un evento de marea roja en donde nuevamente *K. brevis* provocó mortandad de peces en el puerto de Veracruz.

En la zona conocida como “Club de Yates”, adyacente al polígono del PNSAV, se identificó al dinoflagelado no tóxico *Peridinium quinquecorne* Abé como causante de un evento de FAN (Barón-Campis *et al.*, 2005), e incluso hoy se sabe que forma mareas rojas recurrentes en esta zona, sumando más de 50 entre los años 2003 a 2009 (Campos-Bautista *et al.*, 2009).

Durante 2007 y 2008 Aké-Castillo & Okolodkov (2009) registraron la presencia de *Pseudo-nitzschia subcurvata* (G.R. Hasle) G.A. Fryxell en el PNSAV, una especie típica de mares fríos. Aké-Castillo (2011) reportó a la cianobacteria *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg en abundancias relativamente altas, lo que indica una abundante entrada de carbono y nitrógeno al final de la temporada de lluvias; en las muestras analizadas también encontraron dos complejos de la diatomea tóxica *Pseudo-nitzschia* spp. productora de ácido domoico. A inicios de 2010, Aké-Castillo *et al.*, (2010) identificaron a *Karenia* sp.

“Mexican hat” por primera vez en costas mexicanas, este evento de FAN provocó la muerte de peces en la zona norte del PNSAV.

Los trabajos realizados hasta ahora caracterizan de manera general la zona con respecto a la biomasa y la productividad, por lo que son necesarios los estudios más particulares para entender las relaciones ecológicas entre las especies y sus contribuciones en los flujos de carbono. Además, la instauración de un cepario con células fitoplanctónicas nativas de la zona ayudará a conocer datos de la autoecología de las especies (Band-Schmidt *et al.*, 2011). Aunado a lo anterior, las especies de interés que forman florecimientos algales nocivos que incluyen a *Peridinium quinquecorne*, *Trichodesmium* spp., *Thalassiosira* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Chaetoceros* spp., *Skeletonema costatum*, *Karenia brevis*, *Karenia* sp. “Mexican hat” y *Pseudo-nitzschia* spp. han sido identificadas en el PNSAV y en ocasiones con apariciones recurrentes.

3. HIPÓTESIS

Si una especie fitoplanctónica provoca un FAN debido a su alta abundancia celular, entonces su contribución a la biomasa del sistema será mayor que el de las otras especies presentes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la contribución a la biomasa fitoplanctónica total de distintas especies formadoras de florecimientos algales nocivos del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estimar la biomasa de cada una de las especies fitoplanctónicas aisladas y de las muestras tomadas en campo.
2. Caracterizar a la comunidad fitoplanctónica de diferentes muestras del PNSAV para encontrar aquellas donde las especies en cultivo hayan sido las cuantitativamente dominantes o hayan formado un FAN.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

El PNSAV se encuentra en el suroeste del Golfo de México, en la parte central del Estado de Veracruz (Fig. 1). Fue declarado Parque Marino Nacional en el año de 1992 con 23 arrecifes coralinos (D.O.F., 1992) y de acuerdo a la modificación realizada a dicho decreto, actualmente tiene una extensión de 65 516 ha reconociéndose 28 formaciones arrecifales frente a las costas de los municipios de Veracruz, Antón Lizardo y Alvarado (D.O.F., 2012). El conjunto de arrecifes coralinos está dividido de manera natural por la desembocadura del Río Jamapa, limitados al norte por el río La Antigua y al sur por el río Papaloapan (Lara *et al.*, 1992).

El Río Jamapa es una fuente de sedimentos al sistema, que junto con un par de giros ciclónicos y anticiclónicos inhiben la formación de arrecifes coralinos en dicha zona (Salas-Monreal *et al.*, 2009). La biomasa planctónica anual muestra una tasa homogénea de distribución espacial, con picos máximos de producción entre septiembre y octubre al final de la temporada de lluvias cuando las corrientes cambian de dirección (Okolodkov *et al.*, 2011). El promedio anual de la temperatura es de 26°C con un mínimo de 18°C entre enero y febrero (Salas-Pérez & Granados-Barba, 2008). En la parte central del Golfo de México la media de precipitación es de 1558 mm al año (CNA, 2012).

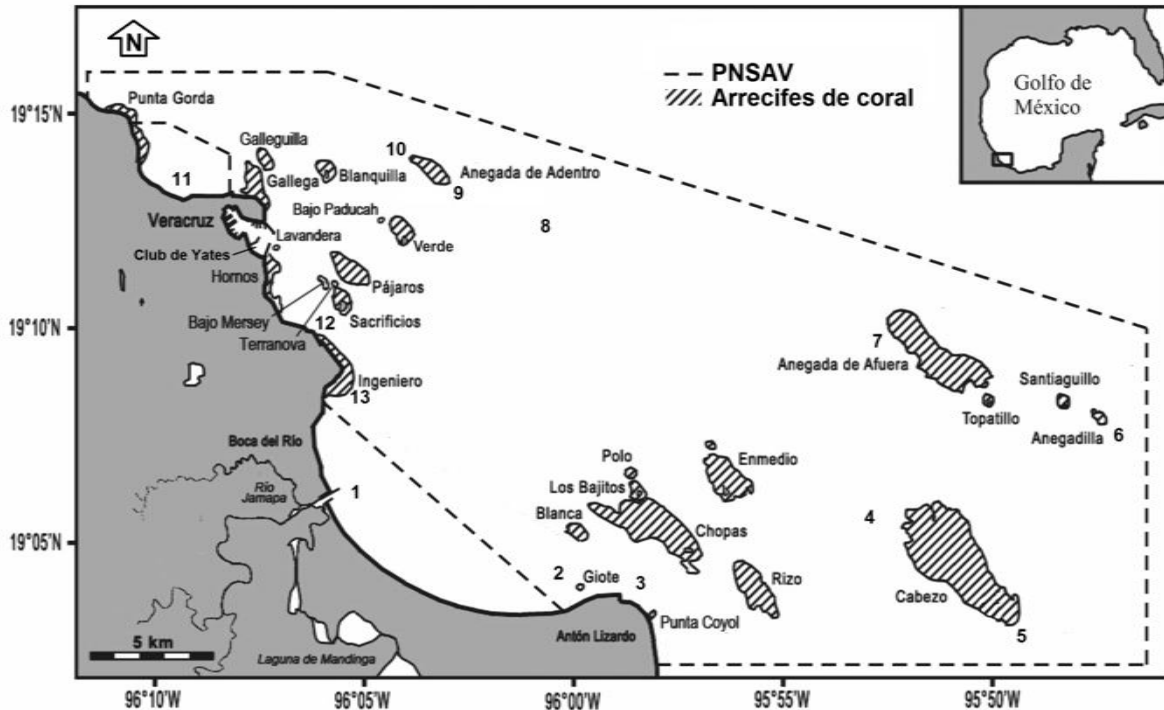


Figura 1. Sitios de muestreo en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. Las cifras indican los números de las estaciones (ver Tabla 1). Modificado de Okolodkov *et al.* (2007).

5.2 MUESTREO

Se realizaron muestreos mensuales de marzo de 2011 a febrero de 2012 a bordo de la embarcación CEPIA en 13 puntos preestablecidos a lo largo del polígono del PNSAV, donde se recolectaron muestras de agua para el aislamiento celular de fitoplancton. Los sitios y las coordenadas de los puntos de muestreo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas de ubicación de los sitios de muestreo en el PNSAV.

Sitio	Estación	Latitud Norte (N)	Longitud Oeste (O)
Río Jamapa	1	19° 05' 58.4''	96° 05' 42.8''
Antón Lizardo oeste	2	19° 04' 21.6''	96° 00' 32.0''
Antón Lizardo este	3	19° 04' 06.7''	95° 58' 52.5''
Cabezo oeste	4	19° 05' 36.8''	95° 53' 02.3''
Cabezo este	5	19° 02' 58.5''	95° 49' 29.4''
Anegadilla	6	19° 07' 47.5''	95° 47' 39.5''
Anegada de Afuera	7	19° 08' 52.0''	95° 52' 39.8''
Zona central	8	19° 11' 27.2''	96° 00' 05.0''
Anegada de Adentro este	9	19° 12' 41.0''	96° 02' 52.8''
Anegada de Adentro oeste	10	19° 13' 51.6''	96° 04' 20.9''
Playa Norte	11	19° 13' 51.8''	96° 10' 03.2''
Ingenieros norte	12	19° 10' 24.2''	96° 06' 53.5''
Ingenieros sur	13	19° 07' 56.8''	96° 05' 52.7''

En los sitios 11 y 13 cercanos a la costa se recolectaron muestras de agua superficial en botellas ámbar de 125 ml de capacidad con el fin de ser preservadas para su posterior caracterización y conteo. La fijación de las células se realizó incluyendo 12 gotas de una solución de Lugol ácido a las muestras (Thronsen, 1978).

El material vivo para ser aislado se obtuvo mediante recipientes de plástico de un litro de capacidad en diferentes sitios del PNSAV. Para la cuantificación de la biomasa fitoplanctónica del sistema, se recolectó agua en recipientes de un litro de capacidad para su posterior tratamiento de acuerdo al tratamiento tricromático descrito por Aminot & Rey (2000). Adicionalmente al muestreo mensual, se recolectaron muestras de agua en una botella de un litro de capacidad desde el borde del muelle en la zona conocida como “Club de Yates” en el puerto de Veracruz en febrero de 2012. Todas las muestras recolectadas fueron superficiales con un máximo de 20 cm de profundidad. Los valores de temperatura fueron obtenidos con un termómetro de 0.1°C de precisión y la salinidad con un refractómetro de campo de 1 UPS de precisión. Estos datos se utilizaron como antecedentes de las condiciones en las que se encontraban las muestras vivas, para tratar de reproducirlas en un ambiente controlado, dentro de una cámara de cultivo con regulador de temperatura y fotoperiodo.

5.3 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó el medio de cultivo *f/2* (Guillard & Ryther, 1962) que consiste en agua de mar enriquecida con distintos compuestos, una solución de metales traza y una solución de vitaminas. Previo a la incursión de compuestos y soluciones, el agua de mar obtenida en el PNSAV fue filtrada utilizando membranas Millipore tipo HA de 0.45 μm de apertura de poro. A 980 ml de agua de mar filtrada y esterilizada se le añadieron 20 ml de una solución comercial constituida por diferentes compuestos en cantidades variables (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Composición general del medio *f/2*

Cantidad	Compuesto	Fórmula	Solución stock
1 ml	Nitrato de sodio	NaNO_3	75 g/L de agua destilada
1 ml	Fosfato monosódico	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g/L de agua destilada
1 ml	Solución de metales traza	Ver Tabla 3	Ver Tabla 3

Tabla 3. Composición de la solución de metales traza para el medio *f/2*

Cantidad	Compuesto	Fórmula	Solución stock
3.15 g	Cloruro férrico hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	--
4.36 g	EDTA sal de sodio	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	--
1 ml	Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.8 g/L de agua destilada
1 ml	Molibdato de sodio pentahidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.3 g/L de agua destilada
1 ml	Sulfito de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22 g/L de agua destilada
1 ml	Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 g/L de agua destilada
1 ml	Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180 g/L de agua destilada

Posteriormente se añadieron unas gotas de HCl al 10% hasta que el medio de cultivo tuviera un pH de 7.5. Al medio utilizado para diatomeas, adicionalmente se le agregó 1 ml de una solución stock de metasilicato de sodio (4g/100 ml). El medio fue filtrado nuevamente con membranas Millipore tipo HA de 0.45 μm de apertura de poro. En una autoclave se esterilizó a 15 lb/pulgada² de presión durante 10 min. Después de que el

medio se encontró a temperatura ambiente, se le incluyó 1 ml de la solución stock de vitaminas por cada litro de medio de cultivo.

En cuanto a la solución de vitaminas, se utilizaron 950 ml de agua destilada y se agregó una ampolleta de una solución comercial con diferentes sustancias (Tabla 4). La solución stock se almacenó en refrigeración en botellas ámbar.

Tabla 4. Composición de la solución de vitaminas para el medio de cultivo.

Cantidad	Compuesto
100 mg	Vitamina B ₁ (Clorhidrato de tiamina)
50 mg	Vitamina B ₆ (Clorhidrato de piridoxina)
10 447 mg	Vitamina B ₁₂ (Acetato de hidroxicobalamina)

5.4 AISLAMIENTO CELULAR E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Una vez en el laboratorio las muestras vivas fueron observadas mediante un microscopio invertido Carl Zeiss-AXIO para identificar las especies presentes. Se determinaron las especies de interés para ser aisladas por su capacidad para formar FANs y se procedió a su cultivo. Para el aislamiento de las células fitoplanctónicas se utilizaron diferentes técnicas de acuerdo con el organismo de interés. A continuación se describe el proceso de aislamiento para cada taxón.

Pseudo-nitzschia H. Peragallo spp.: la muestra fue recolectada del sitio 5, al oeste del arrecife Cabezo el 12 de enero de 2012. En una cámara de pozos con medio *f/2* con silicatos se colocaron unas gotas de la muestra. Mediante el método de la pipeta adelgazada se eliminaron los organismos depredadores, como copépodos y otros zooplanctones (Andersen & Kawachi, 2005). Con otra pipeta adelgazada se retiraron las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* y se inocularon en otra cámara de pozos. Diariamente se realizó este proceso hasta que se logró depurar este cultivo.

Thalassiosira hispida Syvertsen: la especie procede del sitio “Club de Yates” del día 13 de febrero de 2012. Se concentró la biomasa en un matraz con medio de cultivo *f/2* con silicatos, y expuesta a aireación y luz constante las 24 horas del día. Cuando se alcanzó una alta densidad expresada por el cambio de color en el agua y después de una revisión al microscopio, se realizó un inóculo en una cámara de pozos. Con ayuda de una pipeta Pasteur adelgazada (Andersen & Kawachi, 2005) se manipuló a la especie de interés para ser aislada en otro pozo de la cámara. Posteriormente se realizó una resiembra en un matraz con medio *f/2* con silicatos donde se definió su aislamiento. Esta especie fue aislada en las instalaciones del Laboratorio de Hidrobiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). Para la identificación de esta especie se realizó una limpieza de diatomeas siguiendo la metodología de Hasle (1978) con el fin de apreciar a detalle su estructura, tanto en microscopía de luz, como en microscopía electrónica de barrido.

Cylindrotheca closterium Ehrenberg (= *Ceratoneis closterium*): esta muestra fue tomada en el sitio 9, al este del arrecife Anegada de Adentro el día 13 de febrero de 2012. En un matraz de 125 ml se incluyeron 75 ml de medio de cultivo *f/2* con silicatos. Se realizó un inóculo de la muestra original tomada del mar, después se colocó en aireación y luz constante por 24 horas, durante ocho días seguidos. Posteriormente se le retiró la aireación y la exposición a la luz y se introdujo en un refrigerador a 4°C para disminuir su crecimiento, ya que presentaba una coloración café, típica de la fase exponencial. Dos días después se tomaron unas gotas de esta muestra y se realizó un inóculo en un pozo de una cámara de pozos, a la que previamente se le había incluido 2 ml de medio *f/2* con silicatos. Después se realizó una dilución con 0.5 ml del primer pozo y se inoculó en otro pozo con 2 ml de medio de cultivo. Hasta este punto, el trabajo se realizó en la ENCB. Posteriormente en el laboratorio de ecología experimental del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías y después de transcurridos 10 días se tomó una muestra del último pozo y se inoculó en un matraz con medio de cultivo *f/2* con silicatos, esta vez expuesto a un periodo de luz-oscuridad de 14:10 horas y a 25°C dentro de una cámara de cultivo.

Skeletonema costatum (Greville) Cleve: la muestra original es del sitio de muestreo número 11, en Playa Norte del día 13 de febrero de 2012. Se concentró la biomasa en un matraz con medio de cultivo *f/2* con silicatos expuesto a luz y aireación constante. Cuando

se alcanzó una alta densidad y después de una revisión al microscopio, se realizó un inóculo en una cámara de pozos. Con ayuda de una pipeta Pasteur adelgazada se manipuló a la especie de interés para ser aislada en otro pozo de la cámara. Posteriormente se realizó una resiembra en un matraz donde también se mantuvo en crecimiento.

La identificación taxonómica de los organismos aislados se realizó al observar su forma, la presencia y ubicación de cloroplastos y la ornamentación de las frústulas; asimismo, se midieron las dimensiones celulares tales como el eje apical y transapical. Para dicho fin se observaron por lo menos 40 especímenes de cada cultivo, mismos que fueron fotografiados y registrados. La terminología utilizada para la morfología de diatomeas está basada en Round *et al.* (1990) y Navarro (2009). Para cotejar las especies se utilizó literatura especializada (Cupp, 1943; Syvertsen, 1986; Moreno *et al.*, 1995; Hasle & Syvertsen, 1997; Parsons *et al.*, 2012).

5.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

En el caso de *T. hispida*, *C. closterium* y *S. costatum* las cepas aisladas se colocaron en matraces de 125 ml de capacidad con 100 ml de medio *f/2* con silicatos. Se colocaron dentro de una cámara ambiental Scorpion Scientific a 25°C y con un fotoperiodo de luz: oscuridad de 14:10 horas. Adicionalmente, se les proporcionó aireación constante. Con *Pseudo-nitzschia* spp. el procedimiento fue muy parecido, sólo que aquí se eliminó la aireación y se le aplicó una agitación manual diaria para resuspender las células y los nutrientes. Las pruebas previas con *Pseudo-nitzschia* spp. indicaron que la aireación no permiten un óptimo crecimiento.

Con todos los taxones en cultivo se realizó una resiembra, colocándolos nuevamente en matraces de 125 ml con nuevo medio *f/2* con silicatos y con las condiciones particulares de mantenimiento de cada organismo. La resiembra se realizó cada diez días. Aunque los cultivos se mantuvieron en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Experimental del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías hasta noviembre de 2012, por cuestiones de logística se enviaron réplicas para su mantenimiento al laboratorio de alimento vivo del

Acuario de Veracruz A.C. y al Laboratorio de Hidrobiología Experimental de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional, donde actualmente se resguardan.

5.6 DETERMINACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

De los cultivos obtenidos se obtuvo una muestra que fue fijada con Lugol ácido y utilizada para el conteo de células del cultivo unialgal, del cual, 1 ml se incluyó en una cámara Sedgwick-Rafter para contar todas las células de cada organismo identificado siguiendo el método descrito por la A.P.H.A. (1998). Se estimó el número de células por mililitro de cada taxón mediante un microscopio invertido Carl Zeiss-AXIO y un contador de laboratorio Clay Adams; estos resultados se incluyeron en una base de datos.

Al mismo tiempo se obtuvieron dos réplicas de 50 ml cada una, previa homogeneización de la muestra, que se utilizaron para la extracción y determinación de clorofila-a mediante métodos espectrofotométricos (Contreras-Espinosa, 1994; Aminot & Rey, 2000). Este valor se utilizó como un indicador de la biomasa en términos de carbono por unidad de volumen. Para lograr esto, las replicas fueron filtradas con membranas Millipore de 0.45 μm de abertura de poro. Posteriormente se retiró la membrana con ayuda de pinzas de punta delgada cuidando de no tocar la zona de concentración de pigmentos.

La membrana se incluyó en un tubo de ensayo con 10 ml de acetona al 90% para la extracción de clorofilas. La muestra fue homogenizada con un Vortex Mixer type 16700 para desintegrar la membrana. Posteriormente la muestra se guardó en refrigeración a 4°C durante 24 h. La muestra extraída se colocó en tubos de centrífuga y se colocaron en una centrífuga SOLBAT durante 15 min a 4000 rpm. El sobrenadante fue retirado con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en una celda de cuarzo para ser leída en un espectrofotómetro Genesys 10 UV.

Las lecturas fueron realizadas a 750 nm de longitud de onda para correcciones por errores de turbidez y a 664, 647 y 630 nm que son las máximas absorbancias de las clorofilas a, b y c, respectivamente. Adicionalmente se realizó la lectura a 430 nm para

cuantificar los carotenoides y poder obtener el Índice de pigmentos de Margalef (430 nm/664 nm).

Para obtener el valor de clorofila-a, se utilizó la fórmula descrita por Aminot & Rey (2000), basada en el trabajo de Jeffrey & Humphrey (1975) como parte del método tricromático. La fórmula es la siguiente:

$$\text{Clorofila-a} = ((11.85 * (E_{664} - E_{750}) - 1.54 * (E_{647} - E_{750}) - 0.08 (E_{630} - E_{750})) * V_e) / (L * V_f)$$

Donde E es la absorbancia a la longitud de onda indicada (750, 664, 647 y 630 nm), V_e es el volumen de extracción, expresado en ml; L es la longitud de la celda de cuarzo en centímetros y V_f es el volumen filtrado expresado en litros. El valor resultante de clorofila-a se expresó en mg/m^3 .

La transformación de clorofila-a a carbono se realizó mediante la ecuación $C:Cl-a = 43.4 - 1.14T + 1.85Ie^{-0.126T}$ generalizada para todos los grupos de fitoplancton, donde C es carbono, Cl-a es clorofila-a, T es temperatura en grados centígrados, I es la irradiancia en fotones $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ y e es la base del logaritmo natural, igual a 2.718 (Thompson, 2006). La irradiancia fue medida con un sensor LI-COR siendo igual a $9.923 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ dentro de la cámara de cultivo a una temperatura de 25°C , de modo tal que la razón C:Cl-a fue igual a 15.686.

5.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA MEDIANTE BIOVOLUMEN

Para obtener la biomasa mediante biovolumen, se tomaron dos muestras de cada cultivo, previa homogenización por agitación. Estas muestras se tomaron del mismo recipiente y al mismo tiempo que las muestras para la obtención de los datos espectrofotométricos.

La primera de ellas fue observada de inmediato para realizar las mediciones en un microscopio óptico Motic BA-300 con contraste de fases y con reglilla graduada en uno de los oculares. El microscopio contó con una cámara fotográfica digital Leica D-Lux 3 para capturar las imágenes de la mayoría de las células analizadas. Se midieron al menos 40

células, ya que Smayda (1978) menciona un mínimo de 25 para tener una muestra representativa.

Para estimar el biovolumen real de las células vivas se utilizaron ecuaciones para cuerpos geométricos conocidos; en el caso de *Thalassiosira hispida* y *Skeletonema costatum*, la fórmula utilizada fue la de un cilindro, y para *Pseudo-nitzschia* spp. la de un prisma sobre un paralelogramo (Hillebrand *et al.*, 1999). Con *Cylindrotheca closterium* se ocupó la forma geométrica combinada de un esferoide más dos cilindros (Vadrucci *et al.*, 2007).

A la segunda muestra se le agregó una solución fijadora de Lugol ácido, posteriormente se realizaron las mediciones como en la primera muestra y se obtuvo el biovolumen de las células fijadas. La transformación de los valores de biovolumen a carbono por célula (pgC/cel) se realizó con la fórmula $\text{pgC/cel} = 0.288 [\text{BV } (\mu\text{m}^3)]^{0.811}$ propuesta por Menden-Deuer & Lessard (2000), donde el BV utilizado fue el promedio de todas las mediciones para cada uno de los tratamientos. La ecuación de Menden-Deuer & Lessard (2000) fue elegida entre otras fórmulas disponibles debido a que es el producto de la compilación de la literatura de biovolumen en diatomeas.

5.8 OBTENCIÓN DE ABUNDANCIAS RELATIVAS EN CAMPO Y APLICACIÓN DE BIOMASA OBTENIDA EN CULTIVO

En todos los lugares donde se obtuvieron muestras vivas para su posterior aislamiento también se recolectaron muestras para conteo. Se utilizaron botellas ámbar de 125 ml de capacidad que fueron fijadas con una solución de Lugol ácido. Estas muestras fueron observadas al microscopio invertido y contadas con una cámara de sedimentación de 20 ml de acuerdo con las indicaciones de Edler & Elbrächter (2010) para obtener la abundancia relativa en el medio de cada una de las especies en cultivo y de los demás integrantes de la comunidad fitoplanctónica. La identificación de los organismos de la comunidad fitoplanctónica se realizó utilizando literatura especializada para diatomeas

(Cupp, 1943; Moreno *et al.*, 1995; Hasle & Syvertsen, 1997; Parsons *et al.*, 2012) y dinoflagelados (Licea *et al.*, 1995; Okolodkov, 2008, 2010).

Los valores calculados de la concentración de Cl-a por célula en las especies aisladas fueron multiplicados por las abundancias relativas en el medio natural de cada una de las especies mantenidas en cultivo. Esto permitió conocer la contribución de dichas especies a la biomasa y abundancia fitoplanctónica total del sistema.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron pruebas de t para observar si existían diferencias significativas entre los estados de las células de las diferentes especies, es decir, entre las células vivas o fijadas. Para probar la homocedasticidad de varianzas en los datos de BV, se aplicó la prueba de Levene (Zar, 2010). Se obtuvo el promedio de los datos de BV tanto en el estado de las células vivas como fijadas y se estimó el coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las especies.

Con el fin de obtener una serie de ecuaciones para estimar la biomasa a partir de mediciones de biovolumen con las especies de la zona, se realizó una correlación y regresión lineal simple entre el promedio de BV y el valor de pgC/cel de las células vivas y fijadas. Se utilizó al contenido de carbono como variable independiente. La significancia de las regresiones se comprobó utilizando el estadístico F. Dichas ecuaciones presentan la corrección para las especies de la zona de estudio. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica 7.1 (StatSoft, 2005).

6. RESULTADOS

6.1 TAXONOMÍA Y ESTADO DE LAS ESPECIES FITOPLANCTÓNICAS EN CULTIVO.

Se aislaron cuatro diatomeas planctónicas formadoras de FANs: *Thalassiosira hispida*, *Cylindrotheca closterium*, *Pseudo-nitzschia* spp. y *Skeletonema costatum*.

Thalassiosira hispida: se observó tanto en células solitarias como en cadena, con alto contenido clorofílico en ambos casos (Fig. 2). Los cloroplastos parecen adherirse en el interior de la célula en el área del cingulo, dejando libre la parte central. En algunos casos fue posible visualizar la unión de las cadenas debido al mucilago secretado por la fultopórtula central de cada una de las células (Fig. 2B).

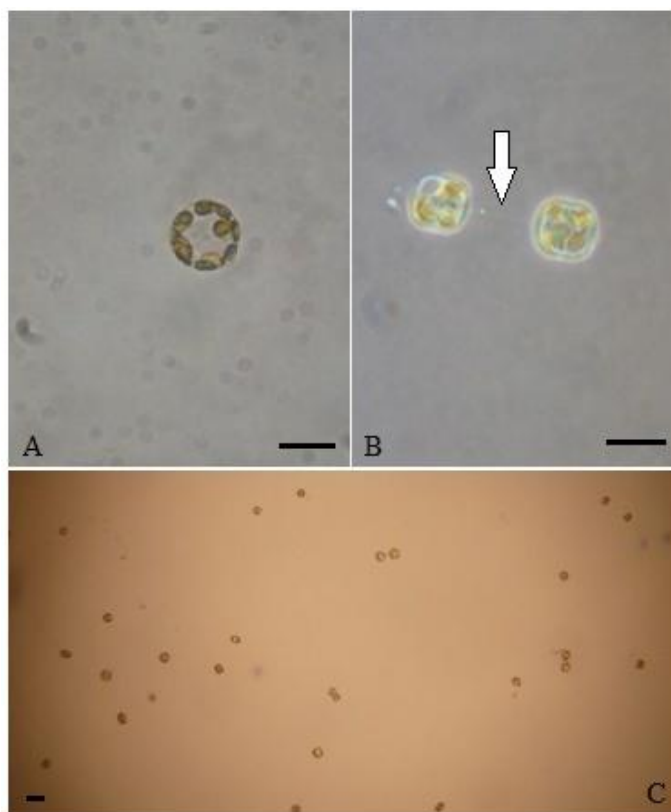


Figura 2. *Thalassiosira hispida* en microscopía de luz. A, vista valvar de una célula libre; B, vista cingular de una cadena de dos células, la flecha indica la unión de las rimopórtulas centrales; C, muestra del cultivo celular. Escala: A,B – 10 μ m; C – 20 μ m.

En microscopía de luz se observan células rectangulares a cuadradas en vista cingular, en ocasiones presenta una ligera apariencia octagonal. En vista valvar exhibe una sutil concavidad en la parte central. Se observaron tanto células solitarias como en cadena de hasta cuatro organismos; en éstas últimas la distancia entre unas y otras es la equivalente de 2 a 3 células. Su eje apical varía de 6.65 a 15.2 μm y su eje pervalvar está entre los 6.65 y 14.25 μm . En microscopía electrónica de barrido se observó que el arreglo de sus areolas sigue un patrón de radial a fasciculado. Son aparentemente circulares, en cara valvar se observan 30 en 10 μm , mientras que en su margen presenta 40 en 10 μm , al igual que en el manto (Fig. 3A). Entre la cara valvar y el manto presenta un anillo de procesos reforzados o fultopórtulas, a razón de 7-8 en 10 μm , separados por 4-5 areolas marginales (Fig. 3B). Las fultopórtulas presentan de dos a tres estructuras de soporte pegadas a la base sobre la valva, tienen la apariencia de costillas diagonales con respecto a la valva y sólo se desarrollan hacia el manto (Fig. 3C). La parte apical de las fultopórtulas puede tener forma tubular y cilíndrica o bien, con un anillo con pequeñas elevaciones puntiagudas. Posee un proceso labiado o rimopórtula ubicado en la periferia del anillo marginal de fultopórtulas. Puede estar justo entre dos o ligeramente más cercano a una de ellas, pero siempre un poco más hacia el centro de la valva, por lo que no ocupa el lugar de un proceso reforzado. Tiene una fultopórtula central que puede estar ligeramente fuera del centro de la valva. Como rasgo característico está cubierto por pequeñas estructuras silíceas, como si fueran “pelos” sobre toda la valva, incluso sobre la parte basal de las fultopórtulas y rimopórtula, que en las areolas suelen ordenarse hacia el centro, y con una longitud aproximada de 0.1 μm (Fig. 3D y 3E). El manto tiene una altura equivalente a cuatro areolas (Fig. 3F).

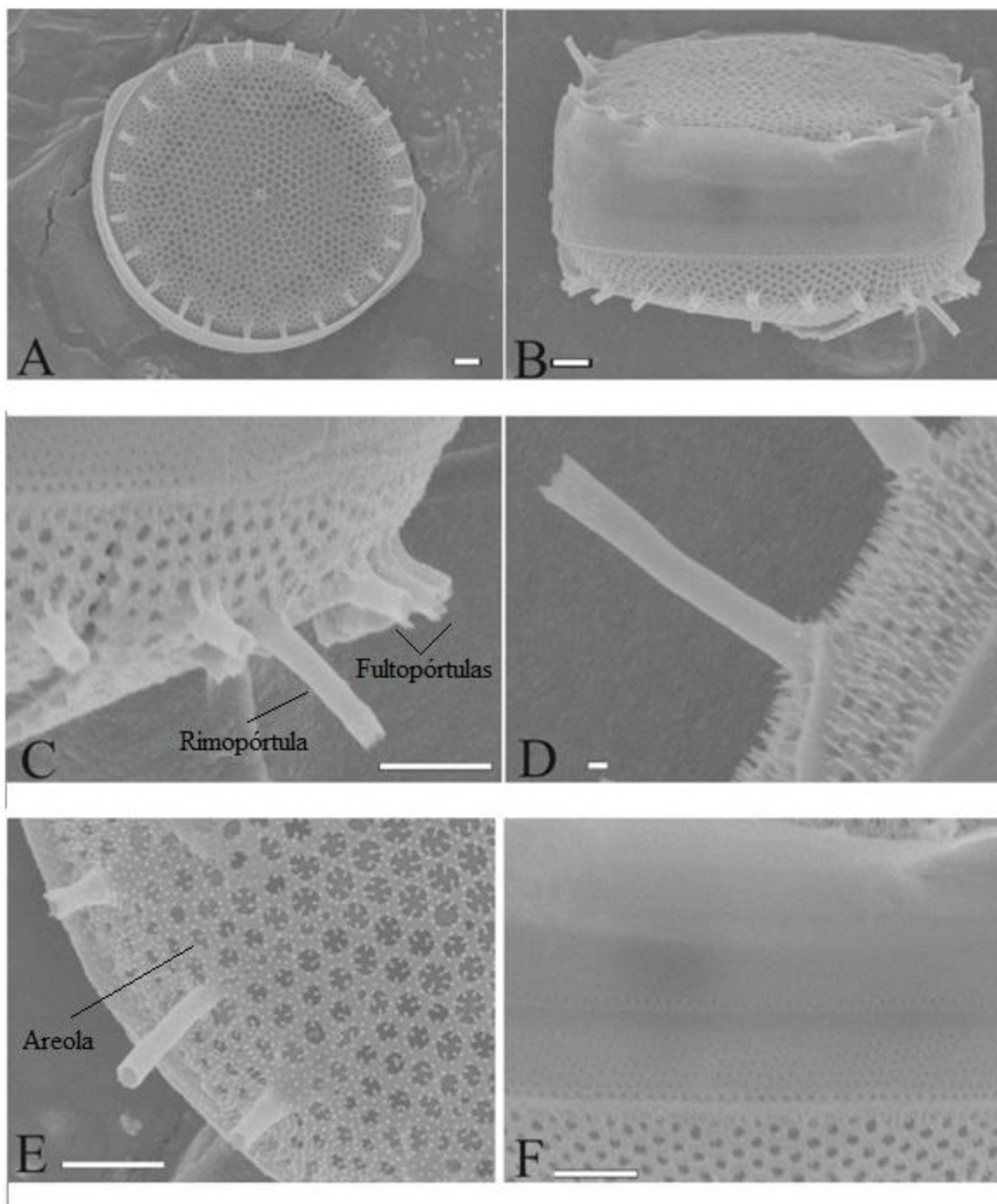


Figura 3. *Thalassiosira hispida* en microscopio electrónico de barrido. A, vista valvar; B, vista cingular; C, estructuras en la base de las fultopórtulas; D, detalle de pequeñas estructuras silíceas (pelos); E, detalle de las areolas; F, detalle del manto. Escala: A, B, C, E, F - 1 μ m; D - 100 nm.

Cylindrotheca closterium: de manera invariable se presentó como células solitarias sin formar cadenas, presentando una clara diferenciación de sus cloroplastos. La zona más estrecha de su valva fue variable, presentando algunos individuos con forma recta, y otros con ligeras curvaturas. (Fig. 4).

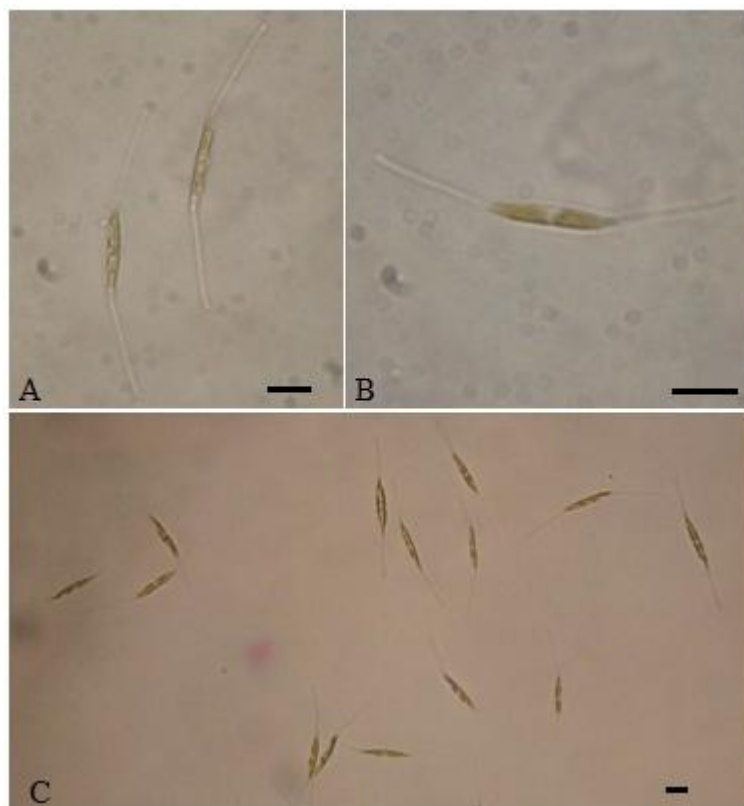


Figura 4. *Cylindrotheca closterium*. A, dos células libres en vista valvar; B, vista valvar de una célula donde se aprecia la separación de los dos cloroplastos; C, muestra del cultivo celular. Escala: 10 μm .

En microscopía de luz se observaron como células lanceoladas, más anchas en el centro y con sus extremos más estrechos, mismos que son móviles y dificultan su medición. El eje apical de la células se situó entre 56.05 y 62.7 μm , mientras que el eje transapical en su parte central está entre 2.85 y 3.8 μm . Los ápices de la célula varían en longitud, ubicándose entre 17.1 y 20.95 μm , mientras que su grosor de 0.95 μm es invariable. Se puede dividir longitudinalmente a la célula en tres partes casi iguales, su centro más ancho y sus dos ápices. Se observó también la presencia de dos cloroplastos separados, cada uno en los extremos de la porción central de la valva.

Pseudo-nitzschia spp.: el cultivo está constituido por diferentes especies del género, pertenecientes a complejos distintos. Las formas libres fueron las dominantes, aunque también se identificaron algunas cadenas. En vista cingular, la mayoría de las células tienen forma rectangular, mientras que en vista valvar tiene forma de un rombo estrecho y alargado. Es en esta última vista, en la que se observan los cloroplastos parietales. Como rasgo característico de este género, la unión de las células consiste en un traslape en su parte apical que puede ser en distintas proporciones (Fig. 5).

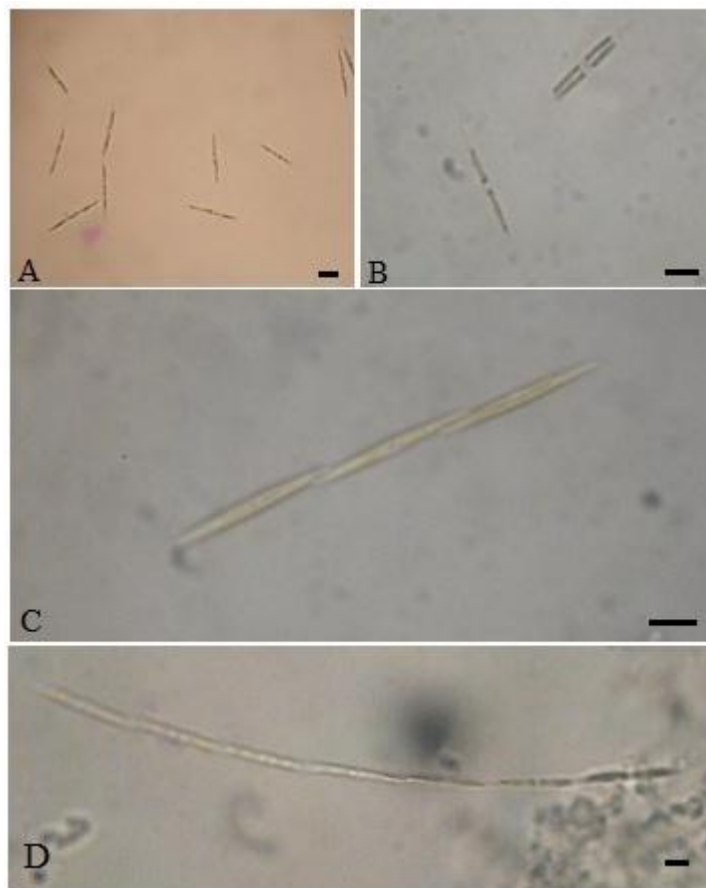


Figura 5. *Pseudo-nitzschia* sp. A, muestra del cultivo celular; B, dos células libres, a la izquierda en vista cingular y la derecha en vista valvar; C, cadena formada por tres células; D, *Pseudo-nitzschia* cf. *subcurvata*. Escala: 10 μ m.

El eje apical de los individuos observados se ubicó entre 24.7 y 34.2 μ m, mientras que su eje transapical se estimó entre 1.9 y 4.75 μ m. El eje perivalvar o alto de la célula se

situó entre 1.9 y 2.85 μm . Dentro del cultivo, también se encontraron organismos en cadena con formación circular. La forma del ápice en las distintas células fue variable, teniendo desde formas redondeadas, hasta cuadradas. El cultivo de *Pseudo-nitzschia* spp. incluye a diferentes especies, sin que se pueda hablar incluso de un solo complejo del género.

Skeletonema costatum se organizó en cadenas celulares, aunque las células solitarias fueron las más abundantes. Su pequeño tamaño dificultó la toma de las fotografías; sin embargo, en algunos casos fue posible ver la unión de las células. La posición cingular fue la forma en que se pudo observar a esta especie (Fig. 6).

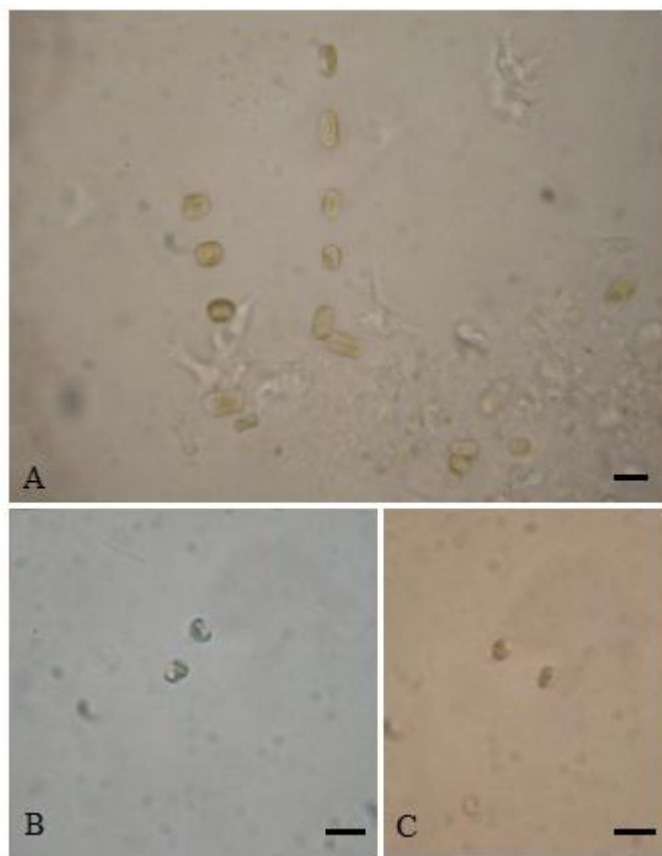


Figura 6. *Skeletonema costatum*. A, muestra del cultivo celular; B, cadena de dos células; C, cadena de dos organismos en vista cingular donde se aprecia la unión celular. Escala: 10 μm .

Las células tenían forma cilíndrica con ápices ligeramente redondeados. El eje apical se observó entre 2.85 y 8.55 μm , mientras que el eje perivalvar se ubicó entre 2.85 y 5.7 μm . En microscopía de luz se observó un anillo de fultopórtulas cerca del manto que

unía a células adyacentes, formando así cadenas. En muchas de las ocasiones, el espacio entre células en cadena fue mayor que la longitud de las células individuales.

6.2 BIOMASA DE CÉLULAS FITOPLANCTÓNICAS.

El contenido celular de clorofila-a en las distintas especies varió entre 0.6436 pgCl-a/cel hasta 6.9808 pgCl-a/cel, mientras que el contenido celular de carbono osciló entre 10.096 y 109.5 pgC/cel. La especie con mayor biomasa estimada fue *Thalassiosira hispida*, seguida de *Skeletonema costatum*, *Cylindrotheca closterium* y *Pseudo-nitzschia* spp. Con respecto al índice de pigmentos (430/664), los valores se situaron entre 2.065 y 2.79, relacionados a *Skeletonema costatum* y *Pseudo-nitzschia* spp., respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Clorofila-a, índice de pigmentos (430/664) y carbono en las especies aisladas. Los números indican el promedio de las dos réplicas de cada cultivo, dentro del paréntesis se expresa el intervalo. Razón C:Cl-a=15.686 (Ver Material y Métodos).

	pgCl-a/cel	pgC/cel	Índice (430/664)
<i>Thalassiosira hispida</i>	6.9784 (±0.024)	109.46 (±0.04)	2.66 (±0.015)
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	0.6968 (±0.05)	10.9307 (±0.80)	2.79 (±0.01)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	0.9445 (±0.08)	14.8157 (±1.25)	2.675 (±0.45)
<i>Skeletonema costatum</i>	1.13815 (±0.05)	17.8523 (±0.80)	2.065 (±0.025)

6.3 BIOVOLUMEN

Los valores de BV variaron entre 24.24 μm^3 y 1551.11 μm^3 entre todos los individuos analizados. Los promedios de BV por especie, se ubicaron entre 83.73 y 775.81 μm^3 para *S. costatum* y *T. hispida*, respectivamente. En *T. hispida* y *C. closterium* las muestras vivas resultaron ser más grandes que las células fijadas con Lugol ácido, no siendo así con *Pseudo-nitzschia* spp. y *S. costatum*, donde el promedio de BV fue mayor en las células fijadas. La tabla 6 muestra los datos mínimos, máximos y promedios de BV de

las cuatro especies en cultivo, tanto en células vivas como fijadas, así como sus equivalencias en carbono.

Los coeficientes de variación (C.V.) del BV entre las especies fueron considerables, desde 16.8 hasta 46.96 μm^3 . Sin embargo, dentro de cada especie, en las células vivas y fijadas la diferencia no fue tan pronunciada, con un máximo entre los tratamientos de 5.37 μm^3 . La especie con menor C.V. fue *C. closterium*, seguida de *Pseudo-nitzschia* sp., *T. hispida* y *S. costatum*.

Tabla 6. Valores de biovolumen (BV, μm^3) y biomasa (pgC/cel) de las especies aisladas. V=células vivas, F= células fijadas con Lugol ácido

Especie	Trat.	n	BV mínimo	BV máximo	BV promedio	C.V.	Biomasa
<i>Thalassiosira hispida</i>	V	45	301.67	1515.11	775.81	40.05	63.53
<i>Thalassiosira hispida</i>	F	45	230.97	1551.47	690.37	45.42	57.79
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	V	40	51.44	135.03	93.46	23.09	11.41
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	F	40	89.16	231.49	150.28	20.08	16.78
<i>Cylindrotheca closterium</i>	V	45	109.08	200.66	169.98	16.8	18.54
<i>Cylindrotheca closterium</i>	F	45	103.7	205.15	126.66	21.94	14.6
<i>Skeletonema costatum</i>	V	40	24.24	193.93	83.73	46.76	10.44
<i>Skeletonema costatum</i>	F	40	24.24	193.93	85.88	46.96	10.66

La prueba de *t* entre el BV de las células fijadas y vivas no mostró diferencia significativa en *T. hispida* ($t=1.298$, $p>0.05$, g.l.= 88) y *S. costatum* ($t=-0.113$, $p>0.05$, g.l.=78). A pesar de esto, en *T. hispida* se observó que de acuerdo con los promedios de BV, la inclusión de Lugol ácido sobre las células vivas, disminuye un 11% su volumen celular. Con *S. costatum* ocurrió lo contrario, ya que la fijación provocó un aumento de 2.56%. En *C. closterium* ($t=7.288$, $p=0$, g.l.=88) y *Pseudo-nitzschia* sp. ($t=-9.721$, $p=0$, g.l.=79) la diferencia encontrada entre las células vivas y fijadas sí fue significativa. En el primer caso, la fijación celular disminuye su BV un 25.49%, y en el segundo caso el BV aumenta 60.79%.

Las transformaciones de BV a carbono al depender de la misma fórmula, presentan la misma proporción de cambio que los cálculos de BV.

6.4 RELACIÓN DE BIOMASA Y BIOVOLUMEN

La Figura 7 muestra una comparación de los dos métodos utilizados para la estimación de biomasa en unidades carbono, es decir el cálculo de BV de células vivas y la cuantificación de clorofila-a. Se observa que en *Pseudo-nitzschia spp.* existe poca diferencia entre la biomasa obtenida por los dos métodos, por lo que son muy cercanos. Sin embargo en *T. hispida*, *Cylindrotheca closterium* y *Skeletonema costatum* sucede lo contrario, ya que aquí los valores entre las dos técnicas resultan claramente diferentes. Con *T. hispida* y *S. costatum* el BV subestima el valor de la biomasa de los organismos, mientras que en *C. closterium* el contenido de carbono se sobreestima.

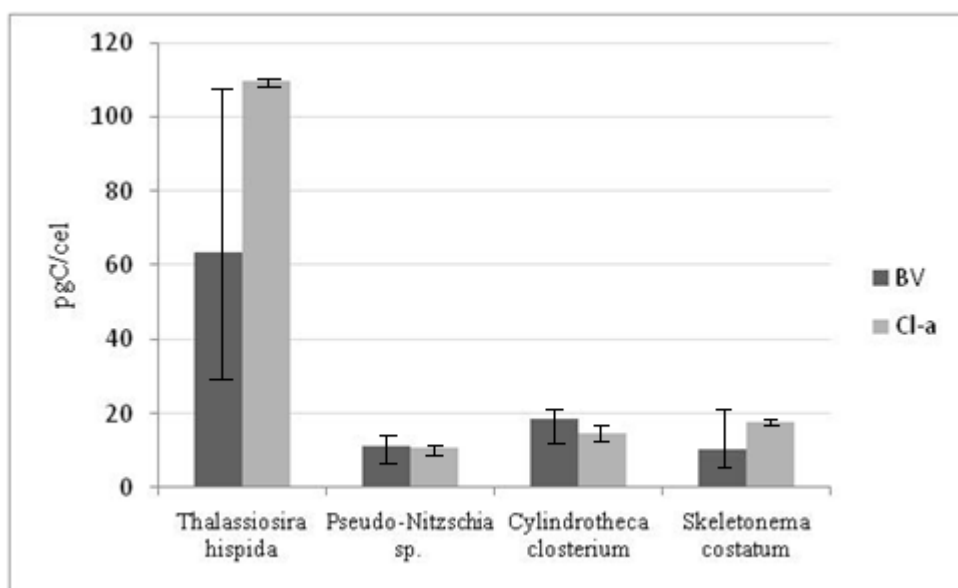


Figura 7. Comparación entre los métodos de estimación de biomasa. El BV se obtuvo midiendo células vivas y transformando a unidades de carbono de acuerdo con Menden-Deuer & Lessard (2000), la clorofila-a se cuantificó de acuerdo al método tricromático. Los bigotes indican el error.

Al realizar una correlación simple entre el promedio de BV de células vivas y el valor de pgC/cel obtenido por clorofila-a, se obtuvo un coeficiente de correlación de $R=0.9913$ ($p<0.05$). Con las células fijadas, el valor de $R=0.9884$ ($p<0.05$). En ambos casos, se observa una buena correlación entre estas dos variables.

Una regresión lineal simple utilizando al BV como variable dependiente arrojó la ecuación $\text{pgC/cel} = -1.5567 + 0.1428(\text{BV})$ para células vivas, y $\text{pgC/cel} = -5.0126 + 0.1644(\text{BV})$ para células fijadas. Ambas regresiones fueron significativas con un valor de $R=0.9913$ ($F_{0.05(1,2)}=112.8073$, $p<0.05$) y $R=0.98849$ ($F_{0.05(1,2)}=85.39162$, $p<0.05$), respectivamente.

6.5 ABUNDANCIA RELATIVA DE MUESTRAS DEL MEDIO NATURAL

Muestra 1

El 9 de agosto de 2011 en el sitio de muestreo 11 se detectó un FAN causado por la diatomea *Pseudo-nitzschia* spp. La densidad de *Pseudo-nitzschia* spp. fue de 765 745 cel/L, equivalente al 91% de la comunidad fitoplanctónica. La biomasa estimada de esta especie fue de 0.5335 mg/m³ de clorofila-a, igual al 12.69% de la concentración de clorofila-a obtenida en campo para toda la comunidad fitoplanctónica, estimada en 4.204 mg/m³ (Fig. 8).

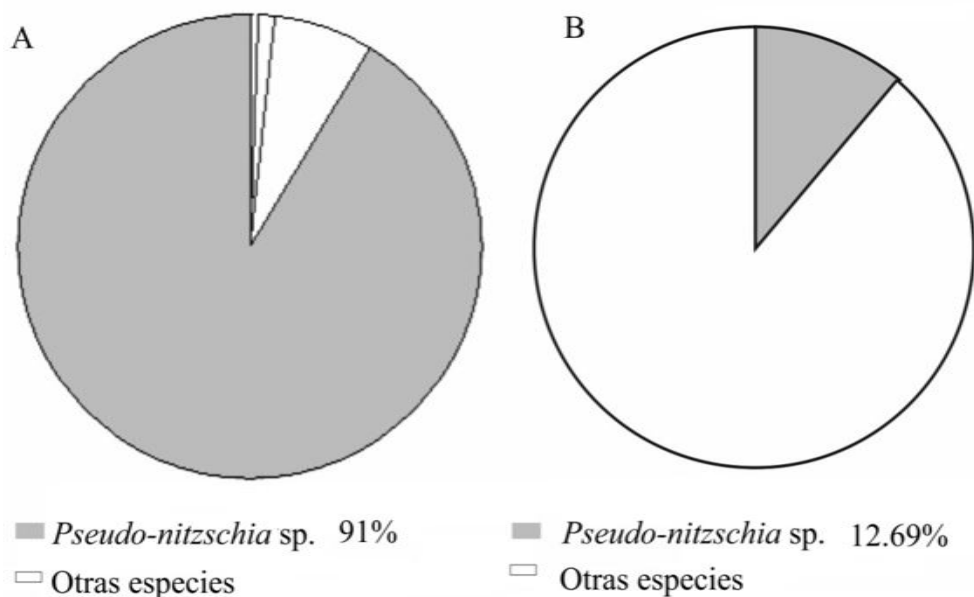


Figura 8. Dominancia de la muestra 1 (9 de agosto de 2011) en términos de abundancia (A) y de biomasa (B).

Muestra 2

El 27 de octubre de 2011 en el sitio 9, Playa Norte, se observó dominancia en términos de abundancia de dos especies de interés: *Skeletonema costatum* y *Cylindrotheca closterium*; la primera de ellas con 28 086 cel/L y la segunda con 16 049 cel/L, equivalentes al 45 y 26%, respectivamente.

En términos de biomasa *Skeletonema costatum* aportó 0.03196 mg/m³ y *Cylindrotheca closterium* 0.01515 mg/m³ de Cl-a. Si el total de la biomasa en el sistema fue de 11.45 mg/m³ de Cl-a, significa que *Skeletonema costatum* aportó el 0.27% y *Cylindrotheca closterium* el 0.13% (Fig. 9).

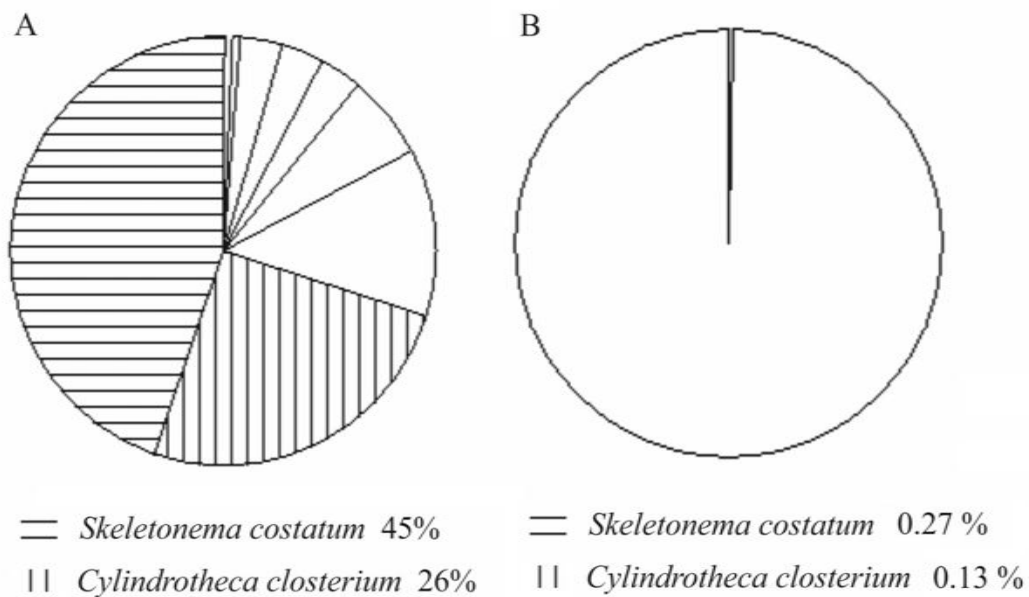


Figura 9. Dominancia de la muestra 2 (27 de octubre de 2011) en términos de abundancia (A) y de biomasa (B).

Muestra 3

En febrero de 2012 en el mismo sitio 9, Playa Norte, se detectaron tres especies dominantes de las aisladas en cultivo: *Thalassiosira hispida*, *Pseudo-nitzschia* spp. y *Skeletonema costatum*. Estas fueron las que presentaron mayor abundancia con 30 401

cel/L (21%), 24 701 cel/L (17%) y 22 801 cel/L (16%), respectivamente. Aplicando el valor obtenido en laboratorio, se estima que *Thalassiosira hispida* aportó 0.21215033 mg/m³ de clorofila-a. *Pseudo-nitzschia* spp. contribuyó con 0.01721 mg/m³ y *Skeletonema costatum* con 0.02595 mg/m³.

El total de Cl-a estimado para la biocenosis fitoplanctónica fue de 3.16 mg/m³, por lo que *Thalassiosira hispida* contribuyó con 6.7136% a la biomasa del sistema, *Pseudo-nitzschia* spp. aportó el 0.5446% y *Skeletonema costatum* el 0.8212 % (Fig. 10).

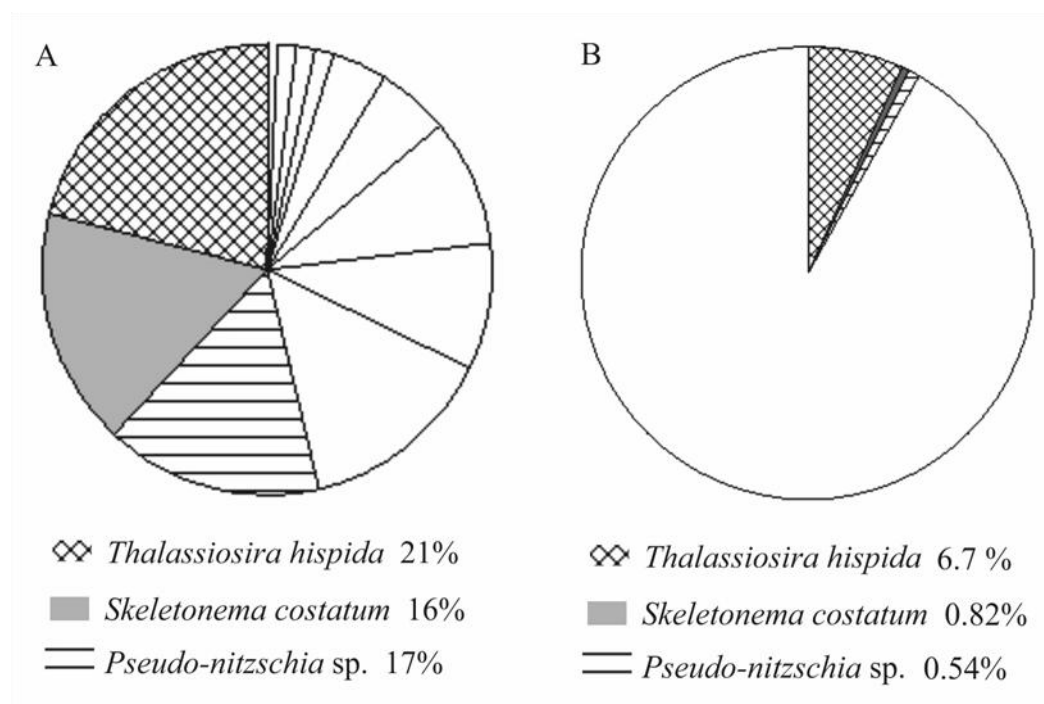


Figura 10. Dominancia de la muestra 3 (febrero de 2012) en términos de abundancia (A) y de biomasa (B).

En cuanto a la comunidad fitoplanctónica que se encontró en las muestras revisadas, se identificaron 26 taxones (pertenecientes a 21 géneros) entre los cuales se incluyen a las cuatro especies en cultivo. De estas, 18 fueron diatomeas y ocho dinoflagelados (Tabla 7).

La muestra 1 presentó un total de nueve especies con una clara dominancia de *Pseudo-nitzschia* sp. sobre los demás taxones. Sin embargo; aparte de *Coscinodiscus* sp., todos los demás organismos fueron dinoflagelados. En la muestra 2 se identificaron 12 especies con dominancia de diatomeas, sólo dos fueron dinoflagelados: *Gyrodinium* sp. y

Prorocentrum gracile. En la muestra 3 se cuantificaron 16 especies, por lo que fue la muestra con mayor diversidad, de estas 13 fueron diatomeas y tres dinoflagelados: *Karenia brevis*, *Ceratium furca* y *Prorocentrum gracile*. Esta última especie, fue la única presente en las tres muestras.

Tabla 7. Abundancia (cel/L) de especies fitoplanctónicas registradas en tres muestras del PNSAV. En negrita se resaltan las especies aisladas y de las cuales se conoce su biomasa). El asterisco indica los organismos pertenecientes a los dinoflagelados, los restantes son diatomeas. Los números entre paréntesis indican la biomasa expresada en mg/m³ de Cl-a.

Especie	Muestra 1 (4.204)	Muestra 2 (11.450)	Muestra 3 (3.160)
<i>Asterionellopsis glacialis</i>		8024	20901
<i>Chaetoceros</i> spp.		2006	
<i>Cocconeis</i> sp.		2006	1900
<i>Coscinodiscus</i> sp.1 (113 µm diám.)		355	58
<i>Coscinodiscus</i> sp.2 (68 µm diám.)	1871		350
<i>Cylindrotheca closterium</i>		16049 (0.015)	
<i>Dinophysis caudata</i> *	9473		
<i>Gyrodinium</i> sp.*	234	118	
<i>Karenia brevis</i> *			5700
<i>Lithodesmium undulatum</i>			7600
<i>Navicula</i> sp.1 (30 µm)		4012	13300
<i>Navicula</i> sp.2 (46 µm)			1900
<i>Ceratium furca</i> *	701		58
<i>Odontella sinensis</i>		118	
<i>Peridinium quinquecorne</i> *	58903		
<i>Pyrophacus</i> sp.*	117		
<i>Prorocentrum gracile</i> *	117	59	1900
<i>Protoperdinium</i> sp.*	117		
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	765745 (0.5335)		24701 (0.017)
<i>Rhizosolenia</i> sp.1 (260 µm long.)			58
<i>Rhizosolenia</i> sp. 2 (450 µm long.)			350
<i>Rhizosolenia clevei</i>		59	
<i>Rhizosolenia setigera</i>		2006	
<i>Skeletonema costatum</i>		28086 (0.031)	22801 (0.025)
<i>Thalassionema nitzschioides</i>			13300
<i>Thalassiosira hispida</i>			30401 (0.212)

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir de las especies mantenidas en laboratorio indican que aunque en el medio natural existe una dominancia numérica en cuestión de abundancia celular, ésta no se refleja en una dominancia en la biomasa fitoplanctónica total. Los motivos pueden ser varios, y se abordan en el desarrollo de esta discusión; sin embargo, es importante dejar claro el proceder para llegar a tal conjetura a partir de la extrapolación de datos de laboratorio.

Los resultados para cumplir con el objetivo general de este trabajo están basados en la utilización de los resultados de laboratorio, mismos que fueron aplicados a los datos de las muestras del medio natural (Tabla 7). Esto históricamente ha sido un punto de discusión para confiar en todas las inferencias que de ello se derivan. Las posturas en cuanto a este proceder son variadas; por un lado está la afirmación de Redfield (1960) quien menciona que las extrapolaciones ecológicas de los resultados de laboratorio llevadas a las poblaciones naturales son inadecuadas. En contraparte, Braarud (1961) resalta la importancia de la experimentación y el estudio de la autoecología de las especies para explicar diversos procesos de las poblaciones en la naturaleza.

Aunque el debate Redfield-Braarud existe debido a que cada idea es extrema en cuanto a su posición, es posible encontrar puntos de conciliación entre ambas corrientes. Smayda (2006) sostiene que estas posturas no deben ser abordadas por separado, y que la ecología marina debe ser respondida atendiendo a ambas ideas, es decir, tomando mediciones *in situ* para conocer las condiciones del medio natural y a su vez, establecer los experimentos en laboratorio que ayuden a validar dichas observaciones.

Esto es precisamente lo que esta tesis expone, primeramente se obtuvieron las mediciones de la biomasa en el medio natural, y posteriormente, esta variable fue medida en las especies aisladas de estos sitios (Tabla 5). El método para dichas estimaciones fue incluso el mismo, la cuantificación de Cl-a por medio de espectrofotometría. Este proceso es el que otorga validez y confiabilidad a los resultados aquí expuestos. Los cultivos

celulares obtenidos se convierten entonces en una herramienta para explicar el inicio de los flujos tróficos en el sistema estudiado, al ser análogos del medio natural.

El cultivo celular de las especies fitoplanctónicas presentadas en este trabajo (*Thalassiosira hispida*, *Cylindrotheca closterium*, *Skeletonema costatum* y *Pseudo-nitzschia* spp.) constituyen los primeros de los que se tengan registro en la zona de estudio. Aunque Lundholm *et al.* (2003) mencionan la existencia de una cepa aislada cerca de Tuxpam correspondiente a *Pseudo-nitzschia pungens*, los cultivos realizados en este trabajo son los únicos con especies nativas del PNSAV mantenidos de forma continua.

El medio en el que se embebieron las células para su cultivo fue el medio *f/2*, comprobando así su amplio espectro para soportar las condiciones idóneas de diversos organismos, como las diatomeas de la región. Prueba de ello es el propio aislamiento de las cuatro especies trabajadas. Se puede entonces sugerir el utilizar al medio *f/2* para futuras investigaciones que pretendan aislar diatomeas marinas nativas de la región. Sin embargo; en el caso de dinoflagelados como *Peridinium quinquecorne* (el principal formador de FANs en la zona), los intentos para su aislamiento con este medio fueron poco fructíferos por lo que sería deseable utilizar otros medios como el L1 o el L1SE (Rodríguez-Palacio, 2006). En este sentido, la literatura describe por lo menos una docena de medios de cultivo de amplio uso alrededor del mundo (Harrison & Berges, 2005), por lo que los ensayos de viabilidad deben ser una prioridad en materia de cultivos celulares, siendo algo que ya se inició como parte de este trabajo.

Se observó que tres de los cultivos contenían individuos de una sola especie, por lo tanto eran monoespecíficos o unialgales; sin embargo, en el caso de *Pseudo-nitzschia* spp. los especímenes pertenecían a diferentes especies e incluso a varios complejos. El género *Pseudo-nitzschia* tiene la particularidad de ser virtualmente no distinguible a nivel de especie en microscopía de luz, por lo que se han agrupado en complejos con características de fácil observación. De acuerdo con el ancho de las valvas, si poseen menos de 3 µm pertenecen al complejo *delicatissima*, en caso de ser mayor a esta medida se enmarcan dentro del complejo *seriata* (Hasle & Syvertsen, 1997). Las células en los cultivos están en un rango en donde se pueden incluir en cualquiera de estos dos complejos. En estudios más recientes se han instaurado dos nuevos complejos, el complejo

pseudodelicatissima/cuspidata y el complejo *americana*; este último con ápices redondeados y una longitud menor a 65 μm , de manera tal que las mediciones en el eje apical de las células en cultivo también encajan dentro de esta descripción.

A pesar de que en el cultivo se puede observar la presencia de tres de los cuatro complejos del género, en el área de estudio se han identificado siete especies, de las cuáles cinco son potencialmente tóxicas por su capacidad para producir ácido domoico (Parsons *et al.*, 2012). Si se compara la longitud, grosor y forma de las células en cultivo con el trabajo anteriormente citado, podemos llegar a la conclusión de que en el cultivo están presentes por lo menos *Pseudo-nitzschia brasiliiana* y *Pseudo-nitzschia* cf. *subcurvata*, ninguna de ellas tóxica. Sin embargo, el ancho de las células permite pensar que hay más especies en el cultivo, por lo tanto, existirían más especies de las que reportan Parsons *et al.* (2012) para el PNSAV. Lundholm *et al.* (2003) indican la presencia de *Pseudo-nitzschia caciaantha* y *Pseudo-nitzschia galaxiae* en Tuxpam, un sitio cercano al área de estudio, lo que puede significar que aunque estas especies no han sido reportadas en el PNSAV, si puedan estar presentes en esta zona y por lo tanto en el cultivo obtenido. Cabe destacar que *Pseudo-nitzschia galaxiae* es tóxica.

Con respecto a las estimaciones de biomasa de las especies trabajadas, en el ambiente natural sus valores siempre se mantuvieron por debajo del 13% de la biomasa fitoplanctónica total. Con referencia a esta variable, las estimaciones usualmente están en función del total de la comunidad dejando de lado el aporte relativo de cada especie a esa biomasa, aún cuando estas especies puedan ser las dominantes durante eventos de FANs. Es por ello que el aislamiento celular de fitoplancton marino y su consecuente cultivo es una actividad que aunque compleja, permitió estimar variables que en el ambiente natural resultarían de difícil obtención, principalmente por las relaciones que hay con otros organismos de la comunidad (Subba-Rao, 2006).

Los valores de biomasa de los cuatro diferentes cultivos presentaron diferencias a pesar de tener tamaños relativamente similares, un comportamiento que era esperable. Estas diferencias se explican por diversos motivos, teniendo como base que la biomasa del fitoplancton marino es el producto del proceso de fotosíntesis. Al existir diferentes tasas de eficiencia fotosintética entre los diferentes taxones, los contenidos de clorofila-a también

varían y no necesariamente están relacionados de manera directa y lineal con el tamaño de los organismos (Menden-Deuer & Lessard, 2000). La concentración de carbono, como estimador de la biomasa, está entonces determinada por los mecanismos que cada grupo algal ha desarrollado y en el caso de las diatomeas es una combinación del mecanismo de las plantas CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) y las plantas C₄, lo que implica la fijación simultánea de HCO₃ en el citoplasma celular, y de CO₂ en los cloroplastos, para formar azúcares usando ácido 3-fosfoglicérico (Riebesell, 2000; Reinfelder, 2011). Es por ello que la estimación de la biomasa es derivada usualmente de la cuantificación del pigmento fotosintético presente en todas las algas, la Cl-a. En el caso de los cultivos obtenidos, el estudio a futuro de nuevas variables, como la productividad primaria, podrían ayudar a comprender la ecología trófica de estas especies.

En este trabajo se utilizó la espectrofotometría para la estimación de la clorofila-a, en particular el método tricromático descrito originalmente por Jeffrey & Humphrey (1975) el cuál excluye la cuantificación de los feopigmentos, los cuales son producto de la degradación de la Cl-a al perder el ión magnesio ubicado en el anillo de porfirina de la molécula. El método monocromático descrito por Lorenzen (1967) también determina la concentración de la Cl-a y está basado en la acidificación de las muestras, por lo que toma en cuenta la presencia de feopigmentos. El máximo de absorción de luz de este tipo de pigmentos se ubica en los mismos intervalos de longitud de onda que la Cl-a, cercanos a los 664 nm por lo que su cuantificación es importante ya que puede sobreestimar los valores de Cl-a.

Los feopigmentos en los cultivos analizados son virtualmente escasos con base en el índice de pigmentos (430/664) utilizado. El Índice de pigmentos (430/664) o también llamado Índice de Margalef es una relación entre pigmentos amarillos y verdes que se ubica entre valores de 2 y 7; mientras mayor sea su valor implicará una mayor madurez de una asociación algal (Margalef, 2005), es decir que nos permite conocer la fase en que se encuentra un cultivo celular. En el caso de los cultivos utilizados para la cuantificación de Cl-a, este índice nunca rebasó un valor de 2.79, lo que indica que en el momento en que se tomaron las muestras de los cultivos, estos se encontraban como asociaciones jóvenes con una alta tasa de regeneración, característicos de la fase exponencial de crecimiento y por lo

tanto con una dominancia pigmentaria de Cl-a. Esto permitió homogenizar las cuantificaciones y hacerlas confiables, ya que si se hubieran tomado de una asociación madura, los feopigmentos hubieran sido los más abundantes y la estimación de la clorofila-a hubiera presentado un error significativo. El uso potencial de este índice de pigmentos con base en las estimaciones de clorofila-a probablemente esté subaprovechado, ya que ha sido poco utilizado en trabajos anteriores.

Aunque existen distintos indicadores de la biomasa algal (Hambrook & Canova, 2007), la evaluación de la concentración de Cl-a mediante espectrofotometría resulta suficiente, ya que es un método recomendado para muestras con concentraciones altas de Cl-a. Considerando que el valor real de la biomasa de las especies fitoplanctónicas es el obtenido mediante la espectrofotometría, tenemos que la biomasa de *T. hispida* reportada en el presente estudio mostró un promedio de 109.46 pgC/cel. El único trabajo con el cuál este dato puede ser comparado es el de Stevens *et al.* (2004), el cuál registra un promedio de 174.3 pgC/cel, por lo que tiene 59% más carbono que nuestra cepa. Esto resulta hasta cierto punto congruente, ya que el diámetro de su organismo osciló entre 15 y 25 μm , mientras que el presentado en este estudio presentó dimensiones de entre 5 y 15 μm .

La diatomea *T. hispida* a la que se refiere Stevens *et al.* (2004) fue mantenida a una temperatura de 4°C y un fotoperiodo de 18:6 hrs de luz:oscuridad, por lo que estuvo sometida a una temperatura fría comparado con lo reportado en este estudio pero con una mayor exposición a la luz. En el caso de la especie tipo del género *Thalassiosira*, *T. nordenskioeldii*, las observaciones en su medio natural indican que a una menor temperatura ambiental la especie presentará un menor tamaño (Durbin, 1977). De acuerdo con esto, la especie de Stevens *et al.* (2004) tendría que ser más pequeña, pero no ocurre así. Es probable que la razón de esto radique en la identificación taxonómica de ese organismo, ya que es una labor complicada debido a las sutiles diferencias con los otros integrantes del mismo género. En microscopía de luz *T. hispida* puede ser confundida con *T. allenii*, *T. decipiens* y *T. nordenskioeldii* (Syvertsen, 1986). El trabajo de Stevens *et al.* (2004) no presenta imágenes con las cuáles se pueda confirmar la identidad de la especie.

Thalassiosira hispida ha sido registrada en mares fríos y templados, sin embargo, no se ha observado en abundancias altas como para ser considerado como un florecimiento.

Las observaciones realizadas en el PNSAV en años recientes permiten clasificar a *T. hispida* como formadora de FANs debido a su alta abundancia (Aké-Castillo, com. pers.) por lo que su estudio es prioritario. El género como tal es uno de los más abundantes en las aguas del Atlántico mexicano (Hernández-Becerril *et al.*, 2008), y el presente estudio es el primer registro de la presencia de esta especie en el Golfo de México, por consiguiente en el PNSAV. Por su pequeño tamaño se desconoce si esta especie ha sido un integrante de la comunidad del PNSAV que ha pasado desapercibida o si constituye una especie invasora.

En el caso de *Pseudo-nitzschia* spp. el promedio estimado del contenido de carbono fue mayor que 10pgC/cel, mientras que en términos de Cl-a fue de 0.6968 pgCl-a/cel. Debido a que estas cuantificaciones son producto de la lectura de diferentes especies en asociación es posible comparar estos valores con otras especies comunes en los mares.

P. multiseriis se ha observado con concentraciones celulares de Cl-a entre 94.99 y 139.06 pgCl-a/cel; mientras que, en cuestión de carbono el intervalo se sitúa entre 0.66 y 1.75 pgC/cel (Pan *et al.*, 1996a; 1996b). Bargu *et al.* (2003) mencionan que *P. pungens* posee una biomasa de 256 pgC/cel, mientras que *P. multiseriis* tiene 285 pgC/cel. Fehling *et al.* (2004) indican que la biomasa de *P. pungens* oscila entre 150 y 600 pgC/cel (=0.15 y 0.6 ngC/cel) mientras que el contenido de Cl-a está en el intervalo de 1.2 y 3.8 pgCl-a/cel. Estos últimos resultados son referidos a la limitación de fósforo o sílice en cultivos batch. En territorio nacional las estimaciones recientes de Santiago-Morales & García-Mendoza (2011) sobre *P. australis* muestran una variación en el contenido de Cl-a. Esta cepa fue mantenida a una irradiancia de 30 $\mu\text{mol fotones/m}^2/\text{s}$ y una relación alta de Si:NO₃ de 2.5, lo que llevó a lecturas elevadas de clorofila-a de 2.71 pgCl-a/cel. En otras condiciones relacionadas con la concentración de sílice y nitratos, los valores de Cl-a pueden ser comparados con los presentados en este estudio ya que los intervalos se situaron entre 0.4 y 2 pgCl-a/cel.

Aunque nuestras estimaciones son menores a las encontradas en otras partes del mundo, es sabido que dentro de las especies integrantes de este género la biomasa es particularmente variable (LeBlanc *et al.*, 2012). Incluso los bajos valores de biomasa de *Pseudo-nitzschia* spp. pueden ser un reflejo de su alta silificación, ya que el sílice es el principal elemento constituyente en su morfología (Amato *et al.*, 2005). Otro punto a

considerar es la producción de ácido domoico que propicia una limitación de carbono en las células (Bates & Léger, 2006), en el caso del cultivo aquí expuesto se desconoce si la especie es capaz de producir esta toxina en condiciones de laboratorio.

El género *Pseudo-nitzschia* tiene presencia a nivel mundial, incluso *P. pungens* tiene una amplia distribución geográfica (Casteleyn *et al.*, 2008). Es de los pocos géneros del grupo de las diatomeas que puede ser tóxico, debido a la producción de ácido domoico con efectos sobre la fauna marina y la salud humana (Lefebvre *et al.*, 2012). En futuras investigaciones, una de las prioridades dentro de este género con especies de la zona debe ser el estudio relacionado a su toxicidad y su correspondencia con la biomasa, ya que influyen directamente en la salud humana por la contaminación de los recursos marinos.

Con respecto a *Cylindrotheca closterium* aislada en el PNSAV, los resultados muestran una baja biomasa, menor que 15 pgC/cel. *Cylindrotheca closterium*, además de poseer hábitos bentónicos (De Brouwer & Stal, 2002; Morris & Kromkamp, 2003) tiene la capacidad para formar FANs. En el Golfo de México, en la línea costera de Yucatán, formó mareas rojas durante 2003 (Rodríguez-Gil *et al.*, 2003) y en el Pacífico mexicano también ha generado florecimientos en la bahía de La Paz del Golfo de California (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009). Su identificación se complica al constituir un complejo de especies como lo evidenció su contenido celular (Haitao *et al.*, 2007).

Alcoverro *et al.* (2000) al realizar cultivos con células obtenidas del Mar Adriático bajo medios limitados de nitrógeno y fósforo encontraron que *C. closterium* tiene un contenido de carbono entre 78.98 y 127.13 pgC/cel. Esto sitúa a nuestra estimación por lo menos cinco veces menor comparado con una célula de la misma especie del Mar Adriático. Lo más probable es que esta diferencia esté explicada justamente por el sitio de colecta de los organismos aislados ya que el PNSAV presenta un ambiente tropical, además que el cultivo de esta especie en el presente estudio no tenía limitantes de compuestos nitrogenados ni fosfatados. Esto sugiere que *C. closterium* eleva su biomasa ante la limitación de nutrientes y viceversa.

En el caso de *Skeletonema costatum* la concentración de Cl-a estimada fue superior a 1 pgCl-a/cel, mientras que en términos de carbono fue cercana a los 18pgC/cel. Owens *et*

al. (1980) mencionan que en *Skeletonema costatum* existe una periodicidad en el contenido celular de Cl-a bajo ciertas condiciones de cultivo en el ambiente natural, lo que sugiere la regulación por los fotoperiodos de luz y oscuridad.

Deason (1980) encontró un intervalo entre 33.6 y 68.5 pgC/cel para una cepa aislada de *S. costatum* de la bahía Narragansett en E.U.A. Por su parte, Hitchcock (1980) observó una variación entre el contenido clorofílico en relación con diferentes condiciones de luz, temperatura y duración de los experimentos. Los intervalos registrados están entre los 0.4 y 1.4 pgCl-a/cel. Los experimentos anteriores forzaron a *S. costatum* a adecuarse a diferentes condiciones físicas sin modificar la química del agua en donde se cultivaron. En este sentido, Granum *et al.* (2002) al probar la limitación de la concentración de NO₃ sobre un cultivo de *Skeletonema costatum* encontraron que no existe diferencia significativa en el contenido de carbono orgánico particulado, estimado entre 10³ y 10⁵ µg/L. Esto tiene diferentes implicaciones, que aplicadas a nuestros resultados, dan certeza a que la especie dentro de un cultivo no varía significativamente en su biomasa. Nuestras estimaciones nuevamente se sitúan por debajo de la mayoría de los valores mencionados anteriormente; sin embargo, si están dentro del intervalo reportado por Hitchcock (1980). Las cuantificaciones de biomasa para especies en zonas tropicales resultan necesarias para realizar comparaciones entre diferentes regiones, más aún si esta especie, *S. costatum*, tiene una amplia distribución geográfica.

Skeletonema costatum se encuentra distribuida por toda la zona costera mundial, excepto en la Antártida. En China, la nación con mayor producción pesquera del mundo (FAO, 2010), en particular en su Mar Oriental, constituye una de las principales especies que aparecen formando densos florecimientos con repercusiones monetarias (Shen *et al.*, 2012), lo que nos habla de su importancia tanto en el ámbito ecológico como económico. *Skeletonema costatum sensu lato* es una especie de interés debido al reto que su taxonomía representa (Smayda, 2011). Actualmente se considera como una especie críptica, ya que su morfología no refleja su taxonomía, quedando entonces la biología molecular como herramienta de identificación (Ellegaard *et al.*, 2008).

Aunque en las cuatro especies aisladas la biomasa estimada fue menor que la de los estudios previos consultados (Tabla 8), es muy probable que esté explicado por la

temperatura en que se mantuvieron las células. En nuestro caso, la temperatura elegida fue de 25°C semejando el promedio de la temperatura del área de estudio, mientras que en otros trabajos la temperatura fue menor. De acuerdo con la revisión de Atkinson (1994), el aumento en la temperatura repercutirá en una disminución del tamaño de los organismos y viceversa, por lo que un individuo en un lugar cálido, será más pequeño que otro en un sitio templado o frío. Aunque esto constituye un paradigma en estudios ecológicos, se adecúa a los resultados expresados en este trabajo, más aún si son escasas este tipo de estimaciones en zonas tropicales y subtropicales.

Tabla 8. Cuadro comparativo de las estimaciones de la biomasa de las cuatro especies mantenidas en cultivo (*Cylindrotheca closterium*, *Pseudo-nitzschia* spp., *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira hispida*) y los valores publicados en la literatura. En negritas se resaltan los resultados del presente trabajo.

Especie	pgC cel	pgCl-a cel	Referencia
<i>C. closterium</i>	78-127		Alcoverro <i>et al.</i> , 2000
<i>C. closterium</i>	14.8157	0.9445	Este trabajo
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	94.99-139.06	0.77-1.75	Pan <i>et al.</i> , 1996b
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>		0.66-0.82	Pan <i>et al.</i> , 1996a
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>		0.4-2.71	Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>		1.2-3.8	Fehling <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	285		Bargu <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	256		Bargu <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	10.9307	0.6968	Este trabajo
<i>S. costatum</i>	33.6-68.5		Deason (1980)
<i>S. costatum</i>		0.4-1.4	Hitchcock (1980)
<i>S. costatum</i>	17.8523	1.13815	Este trabajo

<i>T. hispida</i>	174.3 ± 3.3	Stevens <i>et al.</i> , 2004
-------------------	-------------	------------------------------

<i>T hispida</i>	69.2	6.9784	Este trabajo
-------------------------	-------------	---------------	---------------------

Las observaciones al microscopio para las mediciones de BV de células vivas evidenciaron la diferencia de los contenidos de clorofila-a. *Thalassiosira hispida*, a pesar de ser pequeña (<15 µm), en su interior está mayormente integrada por pigmentos fotosintéticos, mientras que en *Pseudo-nitzschia* spp. y *Cylindrotheca closterium* estas concentraciones son menores con respecto al tamaño total del organismo. En el caso de *Skeletonema costatum* no se observó mucho contenido de clorofila-a en su interior.

Las estimaciones de BV de las cuatro especies referidas en este estudio han sido abordadas en distintas partes del mundo con resultados muy variables. Para estas cuantificaciones las fórmulas han sido elegidas de acuerdo con el criterio de cada investigador, lo que hace aún más complicado realizar una comparación de la biomasa con un mismo método pero bajo diversos enfoques. Sin embargo, en fechas recientes se ha logrado establecer una base de datos global de diatomeas, en las que se resumen ciertas variables entre las que se encuentran el BV y el contenido de carbono (LeBlanc *et al.*, 2012).

De acuerdo con el trabajo de LeBlanc *et al.* (2012), y con base en 64 observaciones de diferentes especies del género *Pseudo-nitzschia*, el promedio de la biomasa varía entre 11 y 485 pgC/cel, aunque dentro de este rango se incluyen valores de auxosporas que tienen un mayor peso que las células vegetativas. *Cylindrotheca closterium* y cuatro de sus cepas se ubicaron en el intervalo de 57 a 303 pgC/cel, mientras que tres cepas de *Skeletonema costatum* están entre los 2 y 193 pgC/cel. *Thalassiosira hispida* está ausente en dicho estudio, y de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, el presente trabajo constituye la primera estimación de BV de dicha especie. De esta comparación se puede establecer que las especies aisladas en el PNSAV son más pequeñas que el rango encontrado en otras partes del mundo.

Aunque los valores de BV mencionados anteriormente fueron sobre células vivas, y por lo tanto son tomados en cuenta como los más confiables, también se estimó el BV de células fijadas con acetoLugol, ya que es la sustancia más utilizada para preservar las células e incluso las estimaciones rutinarias se hacen con células en este estado.

El volumen de las células fijadas no fue significativamente diferente del de las células vivas en el caso de *Thalassiosira hispida* y *Skeletonema costatum*. En cambio, esta diferencia sí fue significativa en *Cylindrotheca closterium* y *Pseudo-nitzschia* spp. En este último cultivo, la adición de acetoLugol a las células incrementa su BV un 60%. Si bien pudiera parecer un cambio muy grande en *Pseudo-nitzschia* spp., los valores del C.V. de las estimaciones de BV confirman los datos, ya que aunque fueron altos (entre 20 y 23), no son diferentes entre las células vivas y fijadas de una misma especie.

De acuerdo con Hawkins *et al.* (2005), la adición de Lugol sobre las cianobacterias disminuye entre un 30 y 40% su volumen celular. Incluso en muestras naturales, el Lugol en distintas concentraciones ejerce un cambio en el BV tanto en el nano como en el microfitoplancton (Zarauz & Irigoien, 2008). Los resultados aquí mencionados también muestran variación entre el BV real y el estimado en células fijadas, por lo menos en dos de los cultivos, lo que coloca al BV como un método poco confiable para la estimación de la biomasa, aunado al hecho de que las estimaciones rutinarias se realizan con muestras fijadas, lo que acarrea una acumulación de errores.

De manera general se ha aceptado que el tamaño de los organismos decrece cuando aumenta la temperatura; que el contenido de carbono relacionado al BV disminuye con el aumento de tamaño y que la razón de C:Cl-a es igual entre los diferentes grupos que integran el fitoplancton. Sin embargo, investigaciones recientes han contradicho estas posturas si nos referimos a todos los organismos fitoplanctónicos (Menden-Deuer & Lessard, 2000; Montagnes & Franklin, 2001). Aunque estos paradigmas han sido desarrollados para zonas templadas, los resultados aquí expuestos parecen concordar debido a las diferencias con otras estimaciones, como los valores mostrados en la Tabla 8.

Si se compara la biomasa evaluada mediante la concentración de clorofila-a con la estimada mediante el BV de células vivas, solamente en el caso de *Pseudo-nitzschia* spp. el

BV resulta confiable, ya que la biomasa es muy similar. Sin embargo, en el caso de las otras tres especies, la biomasa mediante BV es diferente. En el caso de *Cylindrotheca closterium* el BV sobreestima su biomasa, mientras que en *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira hispida* lo subestima. En esta última especie la biomasa es subestimada casi por la mitad del valor real. Todos los argumentos anteriores permiten decir que el BV no es un buen método para la estimación de la biomasa si a especies particulares nos referimos.

Por lo tanto, el valor de biomasa que puede ser validado en muestras naturales es el obtenido mediante la medición de la Cl-a. Sin embargo, si los datos de los que disponemos están en función de BV, este estudio proporciona dos ecuaciones que estiman la concentración de carbono celular, para células vivas y fijadas. Aunque existen fórmulas preestablecidas como las desarrolladas por Menden-Deuer & Lessard (2000), las aquí expuestas son el resultado de cálculos con especies nativas de la zona, por lo que se considera que deben ser tomadas en cuenta por encima de las primeras al menos en estudios en la región. En cambio, si las muestras que tenemos son cuantitativamente representativas de la comunidad fitoplanctónica, como es el caso de muestras para conteo, la abundancia relativa de las cuatro especies en cultivo deben ser multiplicada por la cuota de carbono o clorofila-a para conocer su contribución en la biomasa del ecosistema. Esta validación fue realizada en tres muestras obtenidas del PNSAV con dominancia cuantitativa de las especies cultivadas.

En la muestra 1 extraída en agosto de 2011 cercano al Playa Tumbao, *Pseudo-nitzschia* spp. dominó cuantitativamente la comunidad fitoplanctónica sin tener el mismo comportamiento en términos de biomasa. Este evento constituyó por sí mismo un FAN debido a la alta densidad celular, mayor a 750 cel/ml sin presentar cambio en la coloración del agua y a su vez es el primer reporte de un FAN provocado por una especie de este género en las aguas del PNSAV.

Desde el punto de vista ecológico hay varias cuestiones a considerar. En primera instancia, se evidencía que el término de FAN es más bien una expresión operacional y no técnica (Glibert *et al.*, 2005). La alta densidad celular de *Pseudo-nitzschia* no fue suficiente para causar una decoloración del agua en la zona, lo que sugiere la existencia de eventos de FANs sin que estos hayan sido registrados, ya que no hay efectos a simple vista. Bajo este

enfoque y teniendo en cuenta que el área de estudio está bajo una constante presión hacia la eutroficación, es muy probable que los FANs de *Pseudo-nitzschia* spp. en el PNSAV se incrementen de acuerdo con lo expuesto por Parsons *et al.* (2002). Estos autores encontraron en núcleos de sedimento del norte del Golfo de México un aumento de *Pseudo-nitzschia* spp. relacionado con una elevación de los niveles de nitratos en las últimas décadas. Aunque sus resultados se refieren a una de las zonas muertas más grandes del mundo, las aguas del PNSAV también reciben la descarga de compuestos nitrogenados debido a una intensa actividad antropogénica (Ortíz-Lozano *et al.*, 2005).

Es de particular interés que aunque exista una dominancia en la abundancia celular, ésta no se vea reflejada en una dominancia en la biomasa durante un evento de FAN. Por lo menos en el caso de las diatomeas estudiadas en el PNSAV, esto implica que una proliferación algal no es necesariamente una fuente cuantitativa importante en la biomasa de un sistema (Zingone & Enevoldsen, 2000), lo que podríamos entender entonces como un FAN de baja biomasa. De acuerdo con la revisión de Anderson *et al.* (2011), los florecimientos algales en aguas costeras contaminadas usualmente se relacionan con una elevada acumulación de biomasa, algo que en este caso no ocurre. La razón probablemente esté en función del agente causal, ya que si hubiera sido un dinoflagelado, el FAN muy probablemente hubiera sido de alta biomasa (Zingone & Enevoldsen, 2000).

La importancia del florecimiento se centra entonces en su posible toxicidad, misma que está ligada sólo a algunas especies del género *Pseudo-nitzschia*. Estos organismos han cobrado mayor importancia en los últimos 20 años debido a la capacidad de producir ácido domoico con efectos dañinos en peces, mamíferos marinos y en la salud humana (Trainer *et al.*, 2011; Lefebvre *et al.*, 2012; Lelong *et al.*, 2012). Su función en la ecología trófica ha sido un tanto relegada, a pesar de que tiene una amplia distribución en los mares del mundo. De acuerdo con Parsons *et al.* (2012), en el PNSAV se tienen registradas siete especies, de las cuáles cinco son potencialmente tóxicas de acuerdo con reportes de otros sitios del planeta: *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima* y *P. pungens*. Actualmente se desconoce si las especies de éste género presentes en el PNSAV son capaces de producir ácido domoico, lo que significa que independientemente de su contribución en la biomasa del sistema, es importante su sola presencia.

Aunque sólo se cuenta con una muestra del florecimiento de *Pseudo-nitzschia* en el área de estudio, su dominancia cuantitativa ha sido observada en otras partes del mundo como en Juan de Fuca, E.U.A. donde Trainer *et al.* (2009) describen a *Pseudo-nitzschia* spp. como un componente pequeño dentro de la comunidad de fitoplancton, pero con una aparición recurrente como formador de FANs. La reincidencia de *Pseudo-nitzschia* spp. siempre representó menos del 17% de la biomasa total aún en eventos de marea roja, algo que coincide con el comportamiento de la biomasa en el PNSAV y presta certidumbre a los resultados aquí mostrados.

El sitio Playa Tumbao, donde se presentó el FAN, ha sido escenario en últimas fechas de florecimientos algales con evidente decoloración del mar, aunque causados principalmente por *P. quinquecorne* (obs. pers.). En la muestra revisada, además del dominio de *Pseudo-nitzschia* spp., la composición de especies estuvo representada en su mayoría por dinoflagelados como *P. quinquecorne* con una densidad celular mayor a 58 000 cel/L. Lo más probable es que la mayoría de la biomasa total del sistema esté influenciada por los dinoflagelados, ya que éstos presentan mayor contenido celular de carbono que otros grupos del fitoplancton y tienen generalmente mayor tamaño (Menden-Deuer & Lessard, 2000), aunque en los conteos celulares no esté representada esta contribución mayoritaria en la biomasa.

En la muestra 2 obtenida en Playa Norte en octubre de 2011 dominaron *Skeletonema costatum* y *Cylindrotheca closterium*. En términos de biomasa si unimos a las dos especies, apenas contribuyeron con 0.4% del total. La composición de especies estuvo mayormente dominada por las diatomeas; sin embargo, hay dos especies de dinoflagelados encontrados en la muestra: *Gyrodinium* sp. y *Prorocentrum gracile*. En este punto de muestreo se encontró un valor elevado de la biomasa ($>11 \text{ mgCl-a/m}^3$).

Este alto valor en la biomasa se puede deber a diversos factores, como la presencia de feopigmentos. Longhurst *et al.* (1995) mencionan que existe incertidumbre sobre la concentración de feopigmentos en la zona costera, por lo que al cuantificarse sólo a la Cl-a es probable que se esté sobreestimando este valor y se subestime el de los feopigmentos en los muestreos de campo. Como parte del trabajo de laboratorio de esta tesis, se realizaron algunas pruebas de acuerdo con la metodología descrita por Lorenzen (1967) para estimar

los feopigmentos de las muestras de campo; sin embargo, las lecturas al espectrofotómetro después de acidificar las muestras resultan poco estables, por lo que se debe abordar una adecuación del método en futuras investigaciones, más aún si esta variable, como se ha visto, es tan importante.

El comportamiento temporal del sistema puede ser otra de las causas de que se encontrara un valor elevado de Cl-a. De acuerdo con Okolodkov *et al.* (2011), en octubre se presentan los mayores valores de biomasa planctónica en el PNSAV; además, la riqueza de especies fitoplanctónicas también es mayor comparada con otros meses. En el trabajo citado, la biomasa estimada incluye al zooplancton, por lo que se infiere que debe existir suficiente producción primaria que sustente a los consumidores. En este sentido, es esperado que durante esta época, es decir el inicio de los “nortes”, los valores de biomasa fitoplanctónica también sean elevados.

De cualquier manera, la contribución a la biomasa de la especie en cultivo resultó ser muy pobre con respecto a la biomasa fitoplanctónica total. La razón de esto puede estar en el tamaño de los organismos. Si se contrastan las dimensiones de las especies presentes, tendríamos que los dinoflagelados en las muestras son más grandes en volumen que las diatomeas de interés. De acuerdo con el listado de Olenina *et al.* (2006), *Gyrodinium* sp. tiene un volumen celular de entre 8 000 y 177 000 μm^3 , que comparado con el BV de *Skeletonema costatum* (83.73 μm^3) y *Cylindrotheca closterium* (169.98 μm^3) en este estudio resultan claramente superiores. En este sentido, dentro de los dinoflagelados, un mayor tamaño está relacionado a una mayor biomasa, salvo algunas excepciones de dinoflagelados heterotróficos (Menden-Deuer & Lessard, 2000).

En el caso de la muestra 3, tomada en febrero de 2012 en Playa Norte, *Thalassiosira hispida*, *Pseudo-nitzschia* spp. y *Skeletonema costatum* fueron las más abundantes con 21, 17 y 16% del total de la comunidad fitoplanctónica, con una equivalencia en la biomasa total de 6.7, 0.54 y 0.82 % respectivamente. Aquí nuevamente la composición general de especies estuvo definida por las diatomeas; sin embargo, estuvo presente *Prorocentrum gracile* y se identificó a *Ceratium furca* y a *Karenia brevis*.

Resulta evidente que en la muestra 3 las especies en cultivo son casi despreciables desde el punto de vista trófico; sin embargo, la importancia de las diatomeas en las redes alimenticias reside en la riqueza de especies que sumadas constituyen una biomasa considerable con respecto al total del sistema (LeBlanc *et al.*, 2012). Los dinoflagelados presentes son relativamente grandes, principalmente *Prorocentrum gracile* y *Ceratium furca* por lo que es probable que estos organismos sean significativos en la producción primaria. En el caso de *Karenia brevis*, es conocido que su presencia dominante en un posible evento de marea roja, elevaría la producción entre dos a cinco veces de lo normal (Vargo *et al.*, 1987). Además, en el PNSAV ya se han registrado FANs causados por *Karenia* “Mexican hat” en enero de 2010 (Aké-Castillo *et al.*, 2010); mientras que fue en febrero cuando se tomó esta muestra (ambos meses pertenecientes a la temporada de “nortes”), por lo que los dos primeros meses del año, son de interés en el caso de un probable florecimiento de este dinoflagelado.

En el sitio de recolecta de las muestras 2 y 3 hay un punto importante a considerar: la descarga directa de una planta de tratamiento de aguas residuales. De acuerdo con Burford *et al.* (2012) en las zonas costeras la concentración de clorofila-a incrementa en respuesta al aporte de nitrógeno y fósforo proveniente de este tipo de descargas. Este sitio es importante para todo el sistema, ya que las aguas que ahí se encuentran se dispersan por todo el litoral de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río dependiendo de la temporada del año (De Buen-Kalman, 2007), por lo que nutren las aguas alejadas de la fuente original.

Es importante mencionar que menos de 50 especies de diatomeas son las responsables de más del 90% de la biomasa fitoplanctónica a nivel global, siendo en su mayoría diatomeas centrales (LeBlanc *et al.*, 2012). Licea *et al.* (2011) expresan que *Cylindrotheca closterium*, *Skeletonema costatum*, *Pseudo-nitzschia pungens* y *Thalassiosira eccentrica* forman parte de un grupo de 33 diatomeas que en conjunto constituyen más del 40% de las especies más frecuentes en el sur del Golfo de México. Esto significa que es común encontrarlas como abundantes en las muestras en esta región, por lo que, además de ser potencialmente nocivas por su capacidad para generar florecimientos, el riesgo de que estos se presenten es alto.

Si las especies que se mantuvieron en cultivo, aparecieran en el medio natural con una abundancia de por lo menos 1 000 cel/ml, es decir formando un FAN, *Skeletonema costatum* estaría aportando 1.13815 mgCl-a/m³, *Cylindrotheca closterium* 0.9445 mgCl-a/m³ y *Pseudo-nitzschia* 0.6968 mgCl-a/m³. Teniendo en cuenta que el promedio de la concentración de clorofila-a en el PNSAV oscila entre 1.5 y 5.5 mgCl-a/m³ (Jasso-Montoya, 2012), la contribución a la biomasa fitoplanctónica de estas tres especies es muy baja. Independientemente de su importancia con respecto a su capacidad para formar FANs, estas tres especies como parte de un grupo de pequeñas diatomeas con poca biomasa, son las que en situaciones normales proveen de la producción primaria para sostener otros organismos, en lo que a flujos de materia se refiere. Como se ha mencionado, estas especies son comunes, por lo que son constituyentes normales dentro de la comunidad fitoplanctónica durante gran parte del año.

En el caso de *Thalassiosira hispida*, su aporte a la biomasa sería de 6.9784 mgCl-a/m³ (considerando 1 000 cel/ml), un valor que claramente es superior a las otras tres diatomeas, y en general, para la concentración normal en el PNSAV. Esto significa que *T. hispida* es capaz de elevar la biomasa como para ser considerada por sí sola como un componente importante en el inicio de las redes alimenticias, ya que su presencia en abundancias altas se reflejaría en un aporte de carbono para otros niveles tróficos.

Sin tomar en cuenta estos escenarios teóricos, los argumentos antes desarrollados permiten establecer que ninguna de las cuatro especies aisladas son las de mayor contribución en términos del total de la biomasa fitoplanctónica, independiente de que se encuentren como las más abundantes en las muestras. Esto abre nuevas incógnitas, ya que entonces se desconoce quién contribuye en mayor cantidad con la producción primaria. Lo más probable, es que los dinoflagelados sean los responsables, aunque tampoco se puede dejar de lado a algunas diatomeas con alto contenido celular, una tarea que será resuelta hasta completar el catálogo con estimaciones de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica.

8. CONCLUSIONES

1. La diferencia de los contenidos celulares de clorofila-a (pgCl-a/cel) entre las especies estudiadas (*Thalassiosira hispida* 6.9784, *Pseudo-nitzschia* spp. 0.6968, *Cylindrotheca closterium* 0.9445 y *Skeletonema costatum* 1.13815) indica que, aunque dichas especies sean cuantitativamente dominantes dentro de la comunidad fitoplanctónica, no son las dominantes en términos de biomasa.
2. La presencia de FANs de baja biomasa provocado por *Pseudo-nitzschia* spp. en el PNSAV sugiere que en un futuro, los florecimientos pueden ser más constantes y con mayor cantidad de materia orgánica, como se ha observado en otras partes del mundo que también soportan una alta influencia antropogénica.
3. La baja biomasa de las especies aisladas en el PNSAV indica una posible relación con la temperatura ambiental, ya que las mismas especies en sitios templados o fríos tienen una mayor biomasa.
4. Se comprueba que la medición del biovolumen es un método inexacto para estimar la biomasa de especies fitoplanctónicas, ya que obtiene valores por arriba y por debajo de los valores reales del contenido de carbono, este rango se ubica entre 2 y 60% en las especies estudiadas.
5. Para estudios donde se requiera conocer las dimensiones celulares, es preferible trabajar con las células vivas, ya que el Lugol modifica significativamente el tamaño de las diatomeas por lo menos en el caso de *Cylindrotheca closterium* (disminuye 25%) y *Pseudo-nitzschia* spp. (aumenta 60%).
6. El presente estudio ofrece dos ecuaciones con las correcciones para las especies de la zona, por lo que si se cuenta con valores de biovolumen de células vivas, se sugiere utilizar la fórmula $\text{pgC/cel} = -1.5567 + 0.1428(\text{BV})$, y si los datos proceden de células fijadas con Lugol, utilizar la fórmula $\text{pgC/cel} = -5.0126 + 0.1644(\text{BV})$; el biovolumen como indicador de la biomasa debe ser utilizado con cautela.

7. Las características de los organismos en el cultivo de *Pseudo-nitzschia* spp. extraído del PNSAV sugieren que en la zona de estudio podrían existir más especies que las registradas a la fecha, en particular la diatomea tóxica *Pseudo-nitzschia galaxiae*.
8. El nuevo registro de *Thalassiosira hispida* para el Golfo de México indica que la especie tolera el ambiente tropical.
9. *Thalassiosira hispida* por su contribución calculada en la producción primaria en un FAN provocaría un evento de alta biomasa; una abundancia de 1 000 cel/ml equivale a 6.9784 mgCl-a/m³.

9. LITERATURA CITADA

Aguirre-Gómez, R. 2002. Producción primaria en el sur del Golfo de México estimada a partir de la fluorescencia natural. *Hidrobiológica* 12(1): 21-28.

Aké-Castillo, J.A. 2011. Temporal dynamics of *Trichodesmium erythraeum* (Cyanophyta) in the National Park “Sistema Arrecifal Veracruzano” in the Gulf of Mexico. *J. Environ. Biol.* 32: 395-399.

Aké-Castillo, J.A. & G. Morales-Sánchez. 2012. Patrón temporal de la productividad primaria frente a la costa de Antón Lizardo, Veracruz. XVII Reunión de la Sociedad Mexicana de Planctología. Chetumal, Quintana Roo, 9 al 13 de abril de 2012.

Aké-Castillo, J.A. & Y.B. Okolodkov. 2009. *Pseudo-nitzschia subcurvata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Mexico? Harmful Algae News, An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms, The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 40: 6-7.

Aké-Castillo, J.A., Y.B. Okolodkov, K.A. Steidinger, J.A.G. González-González & H. Pérez-España. 2010. *Karenia* sp. “Mexican hat” first bloom in Mexico. Harmful Algae News, An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms, The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 41: 16-17.

Alcoverro, T., E. Conte & L. Mazzella. 2000. Production of mucilage by the Adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. *J. Phycol.* 36: 1087-1095.

Amato, A., L. Orsini, D. D’Alelio & M. Montresor. 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41: 542-556.

Aminot, A. & F. Rey. 2000. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. International Council for the Exploration of the Sea. (ICES), Copenhagen, Denmark. 17 pp.

- Andersen, R.A. & M. Kawachi. 2005. Traditional microalgal isolation techniques. In: Andersen, R.A. (ed.). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, Amsterdam. Pp. 83-100.
- Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff. 2011. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annu. Rev. Marine Sci.* 4: 143-176.
- A.P.H.A. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 1220 pp.
- Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size - biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25: 1-58.
- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, D.J. López-Cortés, E. Núñez-Vasquez & F.E. Hernández-Sandoval. 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21(3): 381-413.
- Bargu, S., B. Marinovic, S. Mansergh & M.W. Silver. 2003. Feeding responses of krill to the toxin-producing diatom *Pseudo-nitzschia*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 284: 87-104.
- Barón-Campis, S.A., D.U. Hernández-Becerril, N.O. Juárez-Ruiz & C. Ramírez. 2005. Marea roja producida por el dinoflagelado *Peridinium quinquecorne* en Veracruz, México (Oct-Nov, 2002): morfología del agente causal. *Hidrobiológica* 15(1): 73-78.
- Bates, S.S. & C. Léger. 2006. Effect of carbonate addition on domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* in batch culture. 12th. International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae. Copenhagen, Denmark. 4-8 September 2006.
- Braarud, T. 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. In: Sears, M. (Ed.). Oceanography. American Association Advancement Science, Washington, DC, USA. Pp. 271-298.
- Brown, C.W. 1995. Global distribution of coccolithophore blooms. *Oceanogr.* 8(2): 59-60.

- Bryantseva, Y.V., A. Lyakh & O. Sergeeva. 2005. Calculation of biovolumes and surface areas of Black Sea microalgae. Preprint. NAS Ukraine. Institute of Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Ukraine. 25 pp.
- Burford, M.A., A.T. Revill, J. Smith & L. Clementson. 2012. Effect of sewage nutrients on algal production, biomass and pigments in tropical tidal creeks. *Mar. Pollut. Bull.* 64(12): 2671-2680.
- Burkholder, J.M., R.V. Azanza & Y. Sako. 2006. The ecology of harmful dinoflagellates. In: Granéli, E. & J.T. Turner (eds.). *Ecology of harmful algae*. Springer, Berlín. Pp. 53-66.
- Campos-Bautista, G., Y. Okolodkov, J.A. Aké-Castillo & N. Moya-Lara. 2009. Monitoreo de florecimientos algales tóxicos y no tóxicos en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano de 2005 A 2009. En: III Taller sobre florecimientos algales nocivos, Acapulco, Guerrero, 9-11 noviembre de 2009. P. 70.
- Casteleyn, G., V.A. Vhepurnov, F. Leliaert, D.G. Mann, S.S. Bates, N. Lundholm, L. Rhodes, K. Sabbe & W. Vyverman. 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* 7: 241-257.
- Chan, A.T. 1978. Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. 1. Growth under continuous light. *J. Phycol.* 14: 396-402.
- CNA. 2012. Comisión Nacional del Agua. Atlas del agua en México 2012. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México D.F. 133 pp.
- Contreras-Espinosa, F. 1994. Manual de técnicas hidrobiológicas. 1a ed. Trillas, México D.F. 191 pp.
- Cortés-Altamirano, R. 1998. Distribución y efectos de mareas rojas en México. En: Cortés-Altamirano, R. (ed.). *Las mareas rojas*. AGT editor, México D.F. Pp. 33-42.
- Cullen, J.J. 1982. The deep chlorophyll maximum: comparing vertical profiles of chlorophyll a. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 791-803.

Cupp, E.E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. Bull. Scripps Instn. Oceanogr. 5(1): 1-238.

Deason, E.E. 1980. Grazing of *Acartia hudsonica* (A. clausi) on *Skeletonema costatum* in Narragansett Bay (USA): influence of food concentration and temperature. Mar. Biol. 60: 101-113.

De Brouwer, J.F.C. & Stal, L.J. 2002. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). J. Phycol. 38: 464-472.

De Buen-Kalman, R.C. 2007. Modelación de la dispersión de los contaminantes vertidos en Playa Norte, Veracruz. Tesis de Lic. en Física. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, D.F. 88 pp.

D.O.F. 1992. Diario Oficial de la Federación. Decreto por el que se declara área natural protegida con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Parque Arrecifal Veracruzano, ubicado frente a las Costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado del estado de Veracruz Llave, con superficie de 52,238-91-50 hectáreas, publicado el día lunes 24 de agosto de 1992, México.

D.O.F. 2012. Diario Oficial de la Federación. Decreto que modifica al diverso por el que se declara Area Natural Protegida, con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Sistema Arrecifal Veracruzano, ubicada frente a las costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado del Estado de Veracruz Llave, con una superficie de 52,238-91-50 hectáreas, publicado los días 24 y 25 de agosto de 1992, México.

Durbin, E.G. 1977. Studies on the autoecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskioeldii*. II. The influence of cell size on growth rate, and carbon, nitrogen, chlorophyll a and silica content. J. Phycol. 13: 150-155.

Edler, L. & M. Elbrächter. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: Karlson, B., C. Cusack & E. Bresnan (ed.). Microscopic and molecular

methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55). Pp. 13-20.

Ellegaard, M., A. Godhe, K. Härnström & M. McQuoid. 2008. The species concept in a marine diatom: LSU rDNA-based phylogenetic differentiation in *Skeletonema marinoi/dohrnii* (Bacillariophyceae) is not reflected in morphology. *Phycologia* 47(2): 156-167.

FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y acuicultura 2010. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma. 219 pp.

Fehling, J., K. Davidson, C.J. Bolch & S.S. Bates. 2004. Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. *J. Phycol.* 40: 674-683.

Field, C.B., M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson & P. Falkowski. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237-240.

Gárate-Lizárraga, I., C. Band-Schmidt, D.J. López-Cortés & J.J. Bustillos. 2009. Raphidophytes in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*, An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms, The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 40: 1-4.

Gattuso, J.-P., M. Frankignoulle, & R. Wollast. 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 405–434.

Glibert, P.M., D.M. Anderson, P. Gentien, E. Granéli & K.G. Sellner. 2005. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanogr.* 18(2): 136-147.

Granum, E., S. Kirkvold & S.M. Mykkestad. 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242: 83-94.

Guillard, R.R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

- Haitao, L., Y. Guanpin, S. Ying, W.U. Suihan & Z. Xiufang. 2007. *Cylindrotheca closterium* is a species complex as was evidenced by the variations of *rbcL* gene and SSU rDNA. J. Ocean Univ. China 6(2): 167-174.
- Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32: 79-99.
- Hambrook, J.A. & M. Canova. 2007. Algal biomass indicators. In: Biological indicators. U.S. geological survey techniques of water-resources investigations, book 9, chap. A7, section 7.4, August, available online only from <http://pubs.water.usgs.gov/twri9A/>. (consultado el 20 de octubre de 2011).
- Hansen, P.J., A. Skovgaard, R.N. Glud & D.K. Stoecker. 2000. Physiology of the mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. II. Effects of time scale and prey concentration on photosynthetic performance. Mar. Ecol. Prog. Ser. 201: 137-146.
- Harrison, P.J. & J.A. Berges. 2005. Marine culture media. In: Andersen, R.A. (ed.). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, Amsterdam. Pp. 21-34.
- Hasle, G.R. 1978. Diatoms. In: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton manual. UNESCO, París. Pp. 136-142.
- Hasle, G.R. & E.E. Syvertsen. 1997. Marine diatoms. In: In: Tomas, C. (Ed.). Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, San Diego. Pp. 5-385.
- Hawkins, P.R., J. Holliday, A. Kathuria & L. Bowling. 2005. Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine. Harmful Algae 4: 1033-1043.
- Hernández-Becerril, D.U., J.A. García-Reséndiz, D.A. Salas de León, M.A. Monreal-Gómez, M. Signoret-Poillon & J. Aldeco-Ramírez. 2008. Fracción de nanoplancton en la estructura del fitoplancton en el sur del Golfo de México (abril de 2000). Cienc. Mar. 34(1): 77-90.
- Hitchcock, G.L. 1980. Diel variation in chlorophyll a, carbohydrate and protein content of the marine diatom *Skeletonema costatum*. Mar. Biol. 57: 271-278.

- Hidalgo-González, R.M., S. Álvarez-Borrego, C. Fuentes-Yaco & T. Platt. 2005. Satellite derived total and new phytoplankton production in the Gulf of Mexico. *Indian J. Mar. Sci.* 34(4): 408-417.
- Hidalgo-González, R.M. & S. Álvarez-Borrego. 2008. Estructura de la columna de agua y perfiles de biomasa fitoplanctónica en el Golfo de México. *Cienc. Mar.* 34(2): 197-212.
- Hillebrand, H., C. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger & T. Zohary. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35: 403-424.
- Hodgkiss, I.J. & K.C. Ho. 1997. Are changes in N:P ratios in coastal waters the key to increased red tide blooms? *Hydrobiologia* 352: 141-147.
- Hunter, B.L. & E.A. Laws. 1981. ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnol. Oceanogr.* 26(5): 944-956.
- Idino, B. & F. Striquer. 2011. New geometric models for calculation of microalgal biovolumen. *Brz. Arch. Biol. Technol.* 54(3): 527-534.
- Iglesias-Rodríguez, M.D., C.W. Brown, S.C. Doney, J. Kleypas, D. Kolber, Z. Kolber, P.K. Hayes & P.G. Falkowski. 2002. Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: coccolithophorids. *Global Biogeochem. Cycles* 16(4): 1-47.
- Jasso-Montoya, J. 2012. Variación de los parámetros oceanográficos alrededor del Arrecife Verde en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (Golfo de México Occidental). Tesis de Maestría en Ecología y Pesquerías. Universidad Veracruzana, Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, Boca del Río, Veracruz. 71 pp.
- Jeffrey, S.W. & G.F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194.
- Kon-Kee, L., L. Atkinson, R.A. Quiñones & L. Talaue-McManus. 2010. Biogeochemistry of continental margins in a global context. In: Kon-Kee, L., L. Atkinson, R.A. Quiñones & L. Talaue-McManus (eds.). Carbon and nutrient fluxes in continental margins. A global synthesis. Springer, Berlin-Hidelberg. Pp. 3-24.

- Landsberg, J., F. Van Dolah & G. Douchette. 2005. Marine and estuarine harmful algal blooms: impacts on human and animal health. In: Belkin, S. & R. Colwell (eds.). Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer, New York, USA. Pp. 165-215.
- Lara, M., C. Padilla, C. García & J.J. Espejel. 1992. Coral reef of Veracruz Mexico I. Zonation and community. In: Proc. 7th Int. Coral Reef Symp., Guam, 1: 535-544.
- LeBlanc, K., J. Arístegui, L. Armand, P. Assmy, B. Beker, A. Bode, E. Breton, V. Cornet, J. Gibson, M.-P. Gosselin, E. Kopczynska, H. Marshall, J. Peloquin, S. Piontkovski, A.J. Poulton, B. Quéguiner, R. Schiebel, R. Shipe, J. Stefels, M.A. van Leeuwe, M. Varela, C. Widdicombe & M. Yallop. 2012. A global diatom database—abundance, biovolume and biomass in the world ocean. *Earth Syst. Sci. Data* 5: 147-185.
- Lefebvre, K.A., E.R. Frame & P.S. Kendrick. 2012. Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful Algae* 13: 126-130.
- Le Floch, E., G. Malara & A. Sciandra. 2002. An automatic device for in vivo absorption spectra acquisition and chlorophyll estimation in phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* 14: 435-444.
- Lelong, A., H. Hégaret, P. Soudant & S.S. Bates. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51(2): 168-216.
- Licea, S., J.L. Moreno, H. Santoyo & G. Figueroa. 1995. Dinoflageladas del Golfo de California. México. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México 165 pp.
- Licea, S., M.E. Zamudio, J.L. Moreno-Ruiz & R. Luna. 2011. A suggested local regions in the Southern Gulf of Mexico using a diatom database (1979-2002) and oceanic hydrographic features. *J. Environ. Biol.* 32: 443-453.
- Longhurst, A., S. Sathyendranath, T. Platt & C. Caverhill. 1995. An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *J. Plankton Res.* 17(6): 1245-1271.

- López-Fuerte, F.O., D.A. Siqueiros & G. de la Cruz. 2007. Biovolumen ponderado: índice para estimar la contribución de especies en asociaciones de diatomeas bentónicas. *Hidrobiológica* 17(1): 83-86.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- Lundholm, N., Ø. Moestrup, G.R. Hasle & K. Hoef-Emden. 2003. A study of the *Pseudonitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39: 797-813.
- Lyakh, A. 2007. A new method for accurate estimation of diatom biovolume and surface area. In: Kusber, W.-H. & R. Jahn (eds.). *Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting 2007*. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin. Pp. 113-116.
- Malone, T.C. 1971. The relative importance of nanoplankton and netplankton as primary producers in tropical oceanic and neritic phytoplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 16: 633-639.
- Margalef, R. 2005. *Ecología*. 10a reimpresión. Edic. Omega, Barcelona, España. 951 pp.
- Menden-Deuer, S. & E.J. Lessard. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* 45(3): 569-579.
- Miyai, H., K. Matsuzaki, K. Ogawa & T. Sugihara. 1988. A simple method for the estimation of phytoplankton biomass based on cell morphology. *Bull. Plankton Soc. Jpn.* 35(2): 121-126.
- Montagnes, D.J.S., J.A. Berges, P.J. Harrison & F.J.R. Taylor. 1994. Estimating carbon, nitrogen, protein and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 39(5): 1044-1060.
- Montagnes, D.J.S. & D.J. Franklin. 2001. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms. *Limnol. Oceanogr.* 46(8): 2008-2018.

- Moreno, J.L., S. Licea & H. Santoyo. 1995. Diatomeas del Golfo de California. México. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 273 pp.
- Morris, E.P. & J.C. Kromkamp. 2003. Influence of temperature on the relationship between oxygen- and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*). Eur. J. Phycol. 38: 133-142.
- Mullin, M.M., P.R. Sloan & R.W. Eppley. 1966. Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 11: 307-311.
- Navarro, J.N. 2009. Glosario diatomológico ilustrado. Lulu.com, Ponce. 61 pp.
- Ochoa, J.L., E. Núñez-Vazquez & J. Saad. 2003. Diferentes términos utilizados para describir las mareas rojas. Rev. Biol. Trop. 51: 1-7.
- Okolodkov, Y.B. 2003. A review of Russian plankton research in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea in the 1960-1980s. Hidrobiológica 13(3): 207-221.
- Okolodkov, Y.B. 2008. *Protoperidinium* Bergh (Dinophyceae) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, Gulf of Mexico, with a key for identification. Acta Bot. Mex. 84: 93-149.
- Okolodkov, Y.B. 2010. *Ceratium* Shrank (Dinophyceae) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, Gulf of Mexico, with a key for identification. Acta Bot. Mex. 93: 41-101.
- Okolodkov, Y.B., G. Campos-Bautista, I. Gárate-Lizárraga, J.A.G. González-González, M. Hoppenrath & V. Arenas. 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. Aquat. Microb. Ecol. 47: 223-237.
- Okolodkov, Y.B., J.A. Aké-Castillo, M.G. Gutiérrez-Quevedo, H. Pérez-España & D. Salas-Monreal. 2011. Annual cycle of the plankton biomass in the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, southwestern Gulf of Mexico. In: Kattal, G. (ed.). Zooplankton and phytoplankton. Nova Science Publishers, Inc. Pp. 63-88.

Olenina, I., S. Hajdu, L. Edler, A. Andersson, N. Wasmund, S. Busch, J. Göbel, S. Gromisz, S. Huseby, M. Huttunen, A. Jaanus, P. Kokkonen, I. Ledaine & E. Niemkiewicz. 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea HELCOM Balt. Sea Environ. Proc. No. 106. 144 pp.

Ortíz-Lozano, L., A. Granados-Barba, V. Solís-Weiss & M.A. García-Salgado. 2005. Environmental evaluation and development problems of the Mexican Coastal Zone. Ocean Coast. Manage. 48: 161-176.

Owens, T.G., P.G. Falkowski & T.E. Whitledge. 1980. Diel periodicity in cellular chlorophyll content in marine diatoms. Mar. Biol. 59: 71-77.

Pan, Y., D.V. Subba Rao, K.H. Mann, R.G. Brown & R. Pocklington. 1996a. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131: 225-233.

Pan, Y., D.V. Subba Rao, K.H. Mann, W.K.W. Li & W.G. Harrison. 1996b. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. II. Continuous culture studies. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131: 235-243.

Parsons, M.L., Q. Dortch & R.E. Turner. 2002. Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. Limnol. Oceanogr. 47:551-558.

Parsons, M.L., Y.B. Okolodkov & J.A. Aké-Castillo. 2012. Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. Acta Bot. Mex. 98: 51-72.

Ramírez-Granados, R. 1963. Marea roja, datos para su conocimiento y pronóstico. Serie: Trabajos de divulgación, 35. SIC. Dirección General de Pesca e Industrias Conexas, Departamento de Estudios Biológicos Pesqueros. 9 pp.

Redalje, D.G. & E.A. Laws. 1981. A new method for estimating phytoplankton growth rates and carbon biomass. Mar. Biol. 62: 73-79.

Redfield, A.C. 1960. The inadequacy of experiment in marine biology. In: Buzzati-Traverso, A.A. (Ed.). Perspectives in marine biology. Univ. California Press, Berkeley, CA, USA. Pp. 17-26.

Reinfelder, J.R. 2011. Carbon concentrating mechanisms in eukaryotic marine phytoplankton. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3: 291-315.

Reynolds, C.S. 2006. The ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, New York, USA. 535 pp.

Riebesell, U. 2000. Carbon fix for a diatom. *Nature* 407: 959-960.

Rodríguez-Gil, L.A., C.F. Reyes-Sosa & Y. Carrillo. 2003. Determinación de la marea roja en las costas del Estado de Yucatán, México. 59th Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Pp. 249-254.

Rodríguez-Gómez, C.F., J.A. Aké-Castillo & G. Campos-Bautista. 2011. Evaluación de la productividad primaria en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. En: III Congreso Mexicano de Ecología, Boca del Río, Veracruz, 3-7 abril de 2011. P. 535.

Rodríguez-Palacio, M.C. 2006. Establecimiento de cultivos de dinoflagelados del Pacífico mexicano. Tesis de Maestría en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D.F. 108 pp.

Rott, E., N. Salmaso & E. Hoehn. 2007. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates-an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia* 578: 141-146.

Round, F.E., R.M. Crawford & D.G. Mann. 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge. 747 pp.

Salas-Monreal, D., D.A. Salas de León, M.A. Monreal-Gómez & M. L. Riverón-Enzástiga. 2009. Current rectification in a tropical coral reef system. *Coral Reefs* 28(4): 871-879.

Salas-Pérez, J. & A. Granados-Barba. 2008. Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmósfera* 21(3): 281-301.

- Santiago-Morales, I.S. & E. García-Mendoza. 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO₃ ratios. *Harmful Algae* 12: 82-94.
- Shen, L., H. Xu, X. Guo & P. Wu. 2012. Oceanography of *Skeletonema costatum* harmful algal blooms in the East China Sea using MODIS and QuickSCAT satellite data. *J. App. Remote Sens.* 6(1): 063529 (May 21, 2012).
- Signoret, M., C. Bulit & R. Pérez. 1998. Patrones de distribución de clorofila a y producción primaria en aguas del Golfo de México y del Mar Caribe. *Hidrobiológica* 8(2): 81-88.
- Signoret M., J. Aldeco & M.T. Barreiro. 2006. Variabilidad de perfiles de clorofila a obtenidos por fluorescencia natural en el oeste y centro del Golfo de México en junio de 1999. *Hidrobiológica* 16(3): 221-232.
- Smayda, T.J. 1978. From phytoplankters to biomass. In: Sournia, A. (ed.). *Phytoplankton manual*. UNESCO, París. Pp. 273-279.
- Smayda, T.J. 2002. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *J. Oceanogr.* 58: 281-294.
- Smayda, T.J. 2006. Autoecology of bloom-forming microalgae: extrapolation o laboratory results to field populations and the Redfield-Braarud debate revisited. In: Subba-Rao, D.V. (ed.). *Algal cultures analogues of blooms and applications*. Science Publishers, Enfield, USA. Pp. 215-270.
- Smayda, T.J. 2011. Cryptic planktonic diatom challenges phytoplankton ecologists. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 108(11): 4269-4270.
- StatSoft. 2005. Statistica (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- Steele, J.H. 1964. A study of production in the Gulf of Mexico. *J. Mar. Res.* 22(3): 211-222.

- Stevens, C.J., D. Deibel & C.C. Parrish. 2004. Incorporation of bacterial fatty acids and changes in a wax ester-based omnivory index during a long-term incubation experiment with *Calanus glacialis* Jaschnov. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 303: 135-156.
- Strathman, R. R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. Limnol. Oceanogr. 12: 411–418.
- Suárez-Caabro, J. 1965. Datos meteorológicos, hidrográficos y planctónicos del litoral de Veracruz, Ver. An. Inst. Biol. Mex. 36: 25-46.
- Subba-Rao, D.V. 2006. Why study algae in culture? In: Subba-Rao, D.V. (ed.). Algal cultures analogues of blooms and applications. Science Publishers, Enfield, USA. Pp. 1-32.
- Sun, J. & D. Liu. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. J. Plankton Res. 25: 1331-1346.
- Syvertsen, E.E. 1986. *Thalassiosira hispida* sp. nov., a marine planktonic diatom. In: Ricard, M. (ed.). Proceedings of the 8th International Diatom Symposium. Koeltz, Koenigstein. Pp. 33-42.
- Thompson, P. 2006. Effects of temperature and irradiance on marine microalgal growth and physiology. In: Subba-Rao, D.V. (ed.). Algal cultures analogues of blooms and applications. Science Publishers, Enfield, USA. Pp. 571-638.
- Thronsen, J. 1978. Preservation and storage. In: Sournia, A. (ed.). Phytoplankton manual. UNESCO, París. Pp. 69-74.
- Trainer, V.L., B.M. Hickey, E.J. Lessard, W.P. Cochland, C.G. Trick, M.L. Wells, A. MacFadyen & S.K. Moore. 2009. Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. Limnol. Oceanogr. 54(1): 289-308.
- Trainer, V.L., S.S. Bates, N. Lundholm, A.A. Thessen, W.P. Cochlan, N.G. Adams & C.G. Trick. 2011. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. Harmful Algae 14: 271-300.

- Uitz, J., H. Claustre, B. Gentili & D. Stramski. 2010. Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochem. Cycles* 24(3): 3016-3035.
- Vadrucci, M.R., M. Cabrini & A. Basset. 2007. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Trans. Water Bull.* 2: 83-102.
- Vargo, G.A., K.L. Carder, W. Gregg, E. Shanley, C. Heil, K.A. Steidinger & K.D. Haddad. 1987. The potential contribution of primary production by red tides to the west Florida shelf ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 32(3): 762-767.
- Verity, P.G., C.Y. Robertson, C.R. Tronzo, M.G. Andrews, J.R. Nelson & M.E. Sieracki. 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37(7): 1434-1446.
- Zaccaroni, A. & D. Scaravelli. 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In: Evangelista, V., L. Barsanti, A.M. Frassanito, V. Passarelli & P. Gualtieri (eds.). *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. Springer, Pisa. Pp. 91-158.
- Zarauz, L. & X. Irigoien. 2008. Effects of Lugol's fixation on the size structure of natural nano-microplankton samples, analyzed by means of an automatic counting method. *J. Plankton Res.* 30(11): 1297-1303.
- Zingone, A. & H.O. Enevoldsen. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manage.* 43: 725-748.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, USA. 944 pp.