

Nota de Investigación/Research Note

Variabilidad de la comunidad del fitoplancton en Bahía San Quintín
estimada mediante el análisis de pigmentos

Variability of the phytoplankton community in San Quintín Bay
based on pigment analysis

Roberto Millán-Núñez^{1*}

E. Millán-Núñez²

S. Álvarez-Borrego²

C.C. Trees³

E. Santamaría-del-Ángel¹

¹ Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada 22800, Baja California, México
*E-mail: rmillan@uabc.mx

² Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
Km 103 carretera Tijuana-Ensenada
Ensenada 22860, Baja California, México

³ Center of Hydro-Optics and Remote Sensing
San Diego State University

Recibido en septiembre de 2002; aceptado en abril de 2003

Resumen

Se realizó una caracterización de la comunidad fitoplanctónica de Bahía San Quintín mediante el análisis de pigmentos estimados por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y el programa de taxonomía química CHEMTAX, de tal manera que no se excluyeran las células pequeñas (< 5 µm). Se generó una serie de tiempo de 24 h, con muestras de agua superficial cada hora, el 23–24 de abril de 2001. Además, se tomaron muestras en seis localidades de la bahía. Hubo una contribución significativa de siete grupos del fitoplancton. Los que más contribuyeron al total de la clorofila *a* fueron criptofitas, cianobacterias, baciliariofitas y clorofitas. En general, los pigmentos tuvieron concentraciones mayores en la zona de la boca de la bahía, con disminución hacia los extremos internos. Por primera vez se reporta la presencia del pigmento divinil clorofila *a* en Bahía San Quintín, sugiriendo fuertemente la presencia de *Prochlorococcus* sp. Este grupo contribuyó hasta un 40% del total de la clorofila *a* total. Las otras cianobacterias alcanzaron un máximo de 13% de contribución al total de clorofila *a*. Estos porcentajes indican grandes abundancias de estos grupos.

Palabras clave: pigmentos, HPLC, fitoplancton, Bahía San Quintín, CHEMTAX.

Abstract

The purpose of this work was to characterize the phytoplankton community of San Quintín Bay using pigment concentrations from HPLC and the CHEMTAX program, so that small cells (< 5 µm) would not be excluded. On 23–24 April 2001, a 24-h time series was generated, sampling surface water every hour. Samples were also taken from six localities throughout the bay. There was a significant contribution of seven phytoplankton groups. Those that contributed the most to total chlorophyll *a* were cryptophytes, cyanobacteria, bacilliarophytes and chlorophytes. In general, pigment concentrations were higher in the mouth region and decreased towards the internal extremes. This is the first report of the presence of the pigment divinyl chlorophyll *a* in San Quintín Bay, which firmly suggests the presence of *Prochlorococcus* sp. This group contributed up to 40% of the total chlorophyll *a*. Other cyanobacteria contributed up to 13% of the total chlorophyll *a*. These percentages are indicative of a very high abundance of these groups.

Key words: pigments, HPLC, phytoplankton, San Quintín Bay, CHEMTAX.

Introducción

Durante los últimos 30 años se ha reconocido a Bahía San Quintín, México, por su actividad ostrícola. El fitoplancton es importante como alimento para los filtroalimentadores nativos y cultivados y, además, es un índice de la fertilidad de la bahía, por lo que es necesario caracterizar apropiadamente la variabilidad del fitoplancton dentro de la misma. Sin embargo, este tipo de estudios han sido escasos (Lara-Lara *et al.*, 1980; Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota y Álvarez-Borrego, 1988). El uso del microscopio invertido ha subestimado la abundancia del nanofitoplancton, además de que la identificación del fitoplancton mediante microscopio requiere de una gran destreza taxonómica y consume mucho tiempo. Lara-Lara *et al.* (1980) reportaron que las diatomeas fueron más abundantes en la boca que en los interiores de la bahía. Millán-Núñez *et al.* (1982) reportaron que las diatomeas fueron más abundantes sólo durante eventos de intensificación de surgencias en la boca, seguido de mayor abundancia de dinoflagelados durante los periodos de relajamiento. Estas células de diatomeas y dinoflagelados eran $> 20 \mu\text{m}$. No obstante la gran proporción de células menores a $10 \mu\text{m}$, no se han realizado estudios que evalúen su abundancia en Bahía San Quintín.

Con el uso de epifluorescencia ha sido posible hacer conteos más apropiados de las células pequeñas. La citometría de flujo también permite conteos para generar espectros de tamaños, sin embargo, estas técnicas no permiten una clasificación taxonómica. En los últimos 16 años la taxonomía química del fitoplancton ha sido utilizada para una mejor comprensión de la distribución y composición de sus poblaciones. La utilización de datos de pigmentos fotosintéticos ha permitido estimar cuantitativamente la abundancia de clases (Mackey *et al.*, 1998). El uso del método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para la estimación de pigmentos ha sido útil para muestras recolectadas en áreas oligotróficas donde las células muy pequeñas pueden ser identificadas correctamente sólo por microscopio electrónico (Anderson *et al.*, 1996). Se ha reportado que en lugares con alta concentración de clorofila *a* las células pequeñas también son abundantes.

Muchas de las clases representadas en el picoplancton ($< 2 \mu\text{m}$) y nanoplancton ($< 20 \mu\text{m}$) tienen pigmentos específicos (clorofilas y carotenos) que indican su presencia y abundancia en una comunidad mezclada (Jeffrey *et al.*, 1975; Gieskes y Krayay, 1986). Algunos pigmentos son exclusivos de ciertas clases, tales como aloxantina en criptofitas, prasinoxantina en prasinofitas, peridinina en dinoflagelados, clorofila *b* en clorofitas, y divinil clorofila *a* y *b* en *Prochlorococcus* sp. Algunos pigmentos son encontrados en gran proporción en ciertas clases del fitoplancton, tales como la fucoxantina en diatomeas, haptofitas, primnesiofitas y crisofitas, y la zeaxantina en cianobacterias y clorofitas (Chisholm *et al.*, 1988; Jeffrey *et al.*, 1997).

En años recientes el uso de divinil clorofila *a* y *b* como pigmentos específicos de *Prochlorococcus* sp. ha facilitado el estudio del fitoplancton de $0.2\text{--}2.0 \mu\text{m}$. *Prochlorococcus* sp. es

Introduction

Over the past 30 years, San Quintín Bay (Mexico) has become known for the cultivation of oysters. An important source of food for the native and cultured filter feeders is phytoplankton, apart from being an index of the bay's fertility. It is therefore important to properly characterize the variability of the phytoplankton community at this site as only a few such studies have been done (Lara-Lara *et al.*, 1980; Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota and Álvarez-Borrego, 1988). The use of the inverted microscope has resulted in an underestimation of the nanophytoplankton abundance, and the microscopic identification of phytoplankton requires considerable taxonomic skill and is very time-consuming. Lara-Lara *et al.* (1980) reported that diatoms were more abundant in the mouth than in the inner reaches of the bay. Millán-Núñez *et al.* (1982) reported that diatoms were more abundant only during the intensification of upwelling events at the mouth, followed by greater abundance of dinoflagellates during the relaxation period. These diatom and dinoflagellate cells were larger than $20 \mu\text{m}$. Despite the large proportion of cells smaller than $10 \mu\text{m}$ at San Quintín Bay, studies have not been carried out to evaluate their abundance.

Epifluorescence microscopy has provided more accurate counts of small cells. It has also been possible to generate size spectra based on flow cytometry. However, a taxonomic classification is not possible with these techniques. Over the past 16 years the chemical taxonomy of phytoplankton has been used to better understand the distribution and composition of the populations. Class abundances have been quantitatively estimated using photosynthetic pigment data (Mackey *et al.*, 1998). The use of high performance liquid chromatography (HPLC) to estimate pigments has been useful for samples collected from oligotrophic areas, since very small cells can only be correctly identified under an electron microscope (Anderson *et al.*, 1996). Small cells are also abundant in areas with high chlorophyll *a* concentration.

Many of the picoplankton ($< 2 \mu\text{m}$) and nanoplankton ($< 20 \mu\text{m}$) classes have specific pigments (chlorophylls and carotenoids) that indicate their presence and abundance in a mixed community (Jeffrey *et al.*, 1975; Grieskes and Krayay, 1986). Some pigments are specific to certain classes, such as alloxantin in cryptophytes, prasinoxantin in prasinophytes, peridinin in dinoflagellates, chlorophyll *b* in chlorophytes, and divinyl chlorophyll *a* and *b* in *Prochlorococcus* sp. Some pigments are abundant in certain classes of phytoplankton, such as fucoxantin in diatoms, haptophytes, primnesiophytes and chrysophytes, and zeaxantin in cyanobacteria and chlorophytes (Chisholm *et al.*, 1988; Jeffrey *et al.*, 1997).

In recent years, the use of divinyl chlorophyll *a* and *b* as specific pigments of *Prochlorococcus* sp. has improved the study of phytoplankton in the 0.2 to $2.0\text{-}\mu\text{m}$ size range. *Prochlorococcus* sp. is a prokaryote that presents high abundance ($5\text{--}200 \times 10^7$ cells L^{-1}) in subtropical and tropical waters of the Atlantic Ocean (Chisholm *et al.*, 1988) and Pacific

un procariote que presenta grandes abundancias ($5\text{--}200 \times 10^7$ cel L^{-1}) en aguas subtropicales y tropicales del Océano Atlántico (Chisholm *et al.*, 1988) y del Pacífico (Letelier *et al.*, 1993), y posiblemente estas abundancias también se presentan en aguas eutróficas. El objetivo de este trabajo es hacer una caracterización preliminar de la comunidad fitoplanctónica de Bahía San Quintín mediante el análisis de pigmentos y el programa de taxonomía química (CHEMTAX), de tal manera que no se excluyan las células pequeñas.

Metodología

Se generó una serie de tiempo de 24 h, con muestras de agua superficial cada hora, durante el 23 y 24 de abril de 2001 frente a Molino Viejo. Además, se tomaron muestras en seis localidades de la bahía (fig. 1). Para la estimación de la concentración de pigmentos se filtró 1 L de agua de mar con filtros de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro y con tamaño de poro de $0.7 \mu\text{m}$ GF/F. Éstos fueron almacenados en un contenedor con nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio del Centro de Hidro-Óptica y Sensores Remotos de la Universidad Estatal de San Diego. El método utilizado para HPLC fue el propuesto por Wright *et al.* (1991). La extracción de los pigmentos se realizó con acetona al 100%. Los pigmentos fueron separados mediante una columna Spherisorb ODS-2 C_{18} ,

Ocean (Letelier *et al.*, 1993); these abundances may also occur in eutrophic waters. This study aims to characterize the phytoplankton community of San Quintín Bay based on pigment analysis and the chemical taxonomy program (CHEMTAX), so as not to exclude small cells.

Methods

On 23–24 April 2001, surface water was sampled every hour and a 24-h time series was generated off Molino Viejo. Samples were also taken from six localities throughout the bay (fig. 1). To estimate the concentration of pigments, 1 L of seawater was passed through GF/F fiberglass filters of 25-mm diameter and $0.7\text{-}\mu\text{m}$ pore size. The samples were stored in a container with liquid nitrogen until their analysis at the Center of Hydro-Optics and Remote Sensing of San Diego State University. The method proposed by Wright *et al.* (1991) was used for the HPLC analysis. Pigment extraction was carried out with 100% acetone. The pigments were separated in a Spherisorb ODS-2 C_{18} column, using a gradient system of three solvents at a flow of 1 mL min^{-1} , according to Bidigare and Trees (2000): (a) 80:20 methanol:0.5 M ammonium acetate (v/v); (b) 90:10 acetonitril:water (v/v); y (c) ethyl acetate. To compare and complement the data, the phytoplankton abundance was estimated using the Utermöhl (1958) method; water samples were taken in 250-mL dark Nalgene bottles, to which 2.5 mL of Lugol with sodium acetate base were added for preservation.

The CHEMTAX program was used to estimate the contribution of the different phytoplankton classes based on pigments (Mackey *et al.*, 1996). This program calculates the proportion of phytoplankton classes according to the chlorophyll and carotene concentrations determined by HPLC. The pigments used to characterize the chemical taxonomy and quantify the contribution of the different groups to the total of the phytoplankton community were peridinin, butanoloxylfucoxantin, fucoxantin, 19-hexanoloxylfucoxantin, prasinoxantin, alloxantin, lutein, zeaxantin, chlorophyll *b*, divinyl chlorophyll *a* and chlorophyll *a*, allomer of chlorophyll *a* and epimer of chlorophyll *a*.

Results

The total chlorophyll *a* concentration (chlorophyll *a* + divinyl chlorophyll *a* + allomer of chlorophyll *a* + epimer of chlorophyll *a*) and the chlorophyll *a* concentration presented a direct variation with sea level. The chlorophyll *a* concentration values varied from 0.43 mg m^{-3} at high tide to 0.09 mg m^{-3} at low tide. The local variation of chlorophyll *a* concentration indicates a change of up to 50% in one hour (fig. 2a). The concentration of divinyl chlorophyll *a* had a wide temporal variation, with values of up to 0.19 mg m^{-3} at the beginning of the series and of $\sim 0.02 \text{ mg m}^{-3}$ at the end. The concentration of fucoxantin was relatively constant, with values fluctuating around 0.05 mg m^{-3} . The concentrations of alloxantin,

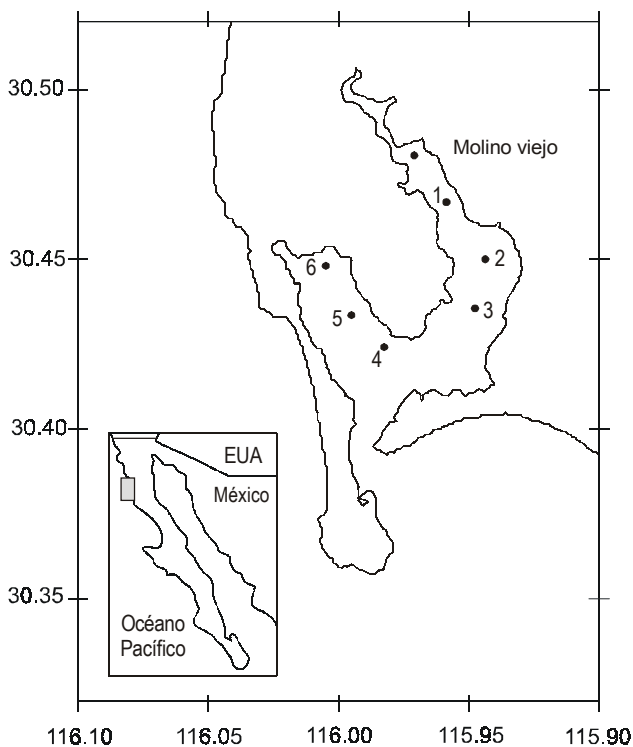


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en Bahía de San Quintín, Baja California, México. La serie de tiempo se generó en Molino Viejo (•). Los números indican las otras localidades.

Figure 1. Location of the sampling stations at San Quintín Bay, Baja California, Mexico. The time series was generated at Molino Viejo (•). The numbers indicate the other stations.

utilizando un sistema de gradiente de tres solventes, siguiendo la metodología descrita por Bidigare y Trees (2000): (a) 80:20 metanol: 0.5 M acetato de amonio (v/v); (b) 90:10 acetonitrilo: agua (v/v); y (c) acetato de etilo a un flujo de 1 mL min⁻¹. Con el propósito de comparar y complementar los datos se estimó la abundancia de fitoplancton mediante el método Utermöhl (1958), para lo cual se tomaron muestras de agua de mar en botellas Nalgene oscuras de 250 mL y se les agregó 2.5 mL de Lugol con base acetato de sodio para su preservación.

Para estimar la contribución de las diferentes clases del fitoplancton mediante los pigmentos se utilizó el programa CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1996). Este programa calcula la proporción de clases de fitoplancton a partir de concentraciones de clorofilas y carotenos determinados por HPLC. Los pigmentos usados para la caracterización de la taxonomía química y la cuantificación de las contribuciones de los diferentes grupos al total de la comunidad fitoplanctónica fueron peridinina, butanoloxifucoxantina, fucoxantina, 19-hexanoloxifucoxantina, prasinoxantina, aloxantina, luteína, zeaxantina, clorofila *b*, divinil clorofila *a* y clorofila *a*, alómero de clorofila *a* y epímero de clorofila *a*.

Resultados

La concentración del total de clorofila *a* (clorofila *a* + divinil clorofila *a* + alómero de clorofila *a* + epímero de clorofila *a*) y la concentración de clorofila *a* presentaron una variación directa con el nivel del mar. Los valores de concentración de clorofila *a* variaron de 0.43 mg m⁻³ en marea alta, hasta 0.09 mg m⁻³ en marea baja. La variación local de la concentración de clorofila *a* muestra un cambio de hasta ~50% en una hora (fig. 2a). La concentración de divinil clorofila *a* tuvo una amplia variación temporal con valores de hasta 0.19 mg m⁻³ al inicio de la serie y valores de ~0.02 mg m⁻³ hacia el final del muestreo. La concentración de fucoxantina fue relativamente constante, con valores fluctuando alrededor de 0.05 mg m⁻³. Las concentraciones de aloxantina, clorofila *b* y zeaxantina presentaron el mismo patrón que presentó la clorofila *a*, con concentraciones mayores durante el flujo y menores durante el reflujó (fig. 2b). Los pigmentos luteína, diatoxantina, diadinoxantina, prasinoxantina, hexanoloxifucoxantina, butanoloxifucoxantina y peridinina presentaron en general bajas concentraciones menores a 0.02 mg m⁻³, excepto la violaxantina que presentó concentraciones de hasta 0.05 mg m⁻³ (fig. 2c) en las primeras horas de la serie.

El porcentaje de contribución de las clases del fitoplancton al total de clorofila *a* estimado mediante el programa CHEMTAX se muestra en la figura 3a, donde se observa una contribución significativa de ocho grupos del fitoplancton. La contribución de *Prochlorococcus* sp. al total de clorofila *a* presentó la misma tendencia del pigmento divinil clorofila *a* (figs. 2b, 3a). De la misma manera la clase criptofita se asocia con el pigmento aloxantina, siendo ésta la más abundante a lo largo de la serie de tiempo.

chlorophyll *b* and zeaxantin presented the same pattern as that of chlorophyll *a* concentration, with higher values during ebb and lower values during flow tide (fig. 2b). In general, lutein, diatoxantin, diadinoxantin, prasinoxantin, hexanoloxifucoxantin, butanoloxifucoxantin and peridinín presented concentrations of less than 0.02 mg m⁻³; however, concentrations of up to 0.05 mg m⁻³ were recorded for violaxantin in the first hours of the series (fig. 2c).

The percentage of contribution of the phytoplankton classes to the total chlorophyll *a* estimated with the CHEMTAX program is given in figure 3a, showing a significant contribution of eight phytoplankton groups. The contribution of *Prochlorococcus* sp. presented the same trend as that of divinyl chlorophyll *a* (figs. 2b, 3a). Likewise, the cryptophytes, which were the most abundant class throughout the time series, were associated with alloxantin.

The diatoms were also relatively abundant, with a high contribution to the total chlorophyll *a* in the time series. This class presented a similar variation to that of fucoxantin (figs. 2b, 3a). The concentration of chlorophyll *b* is indicative of the variation of chlorophytes and prasinophytes, whereas prasinoxantin only indicates prasinophytes. The contribution of prasinophytes to the total chlorophyll *a* was ~10%. The rest of the phytoplankton groups, such as dinoflagellates and haptophytes, contributed less than 10% to the total chlorophyll *a* (fig. 3a).

The dominant taxa, determined through counts using an inverted microscope and following the Utermöhl method, were two genera of diatoms, *Nitzschia* and *Cocconeis*, constituting more than 70% of the total abundance in some cases (table 1).

In general, pigment concentrations were higher at the mouth of the bay (station 4) and decreased towards the internal extremes.

The concentrations recorded in the spatial variation are in general higher than those reported for the time series. For example, values of up to 1.9 mg m⁻³ were recorded for the chlorophyll *a* concentration (fig. 3b), four times higher than the concentrations estimated in the temporal variation. The exception was divinyl chlorophyll *a*, with concentrations of up to 0.08 mg m⁻³ in the spatial variation and of 0.19 mg m⁻³ in the time series (fig. 3c).

The rest of the pigments can be separated into two groups: those with concentrations of up to 0.5 mg m⁻³ (fig. 3b; chlorophyll *b*, fucoxantin, alloxantin and hexanoloxifucoxantin), and those with concentrations of less than 0.1 mg m⁻³ (fig. 3c; peridinín, butanoloxifucoxantine, violaxantin, diadinoxantin, diatoxantin, lutein and zeaxantin).

Discussion

The time series of total chlorophyll *a* concentration and chlorophyll *a* concentration showed a clear association with the tide; in general, the highest phytoplankton abundances occurred during flow tide and vice versa. This pattern has been fully described for the area by Lara-Lara *et al.* (1980) and Millán-Núñez *et al.* (1982).

Las diatomeas también fueron relativamente abundantes con una gran contribución al total de clorofila *a* en toda la serie de tiempo. Esta clase presentó una variación similar a la fucoxantina (figs. 2b, 3a). La concentración de clorofila *b* es

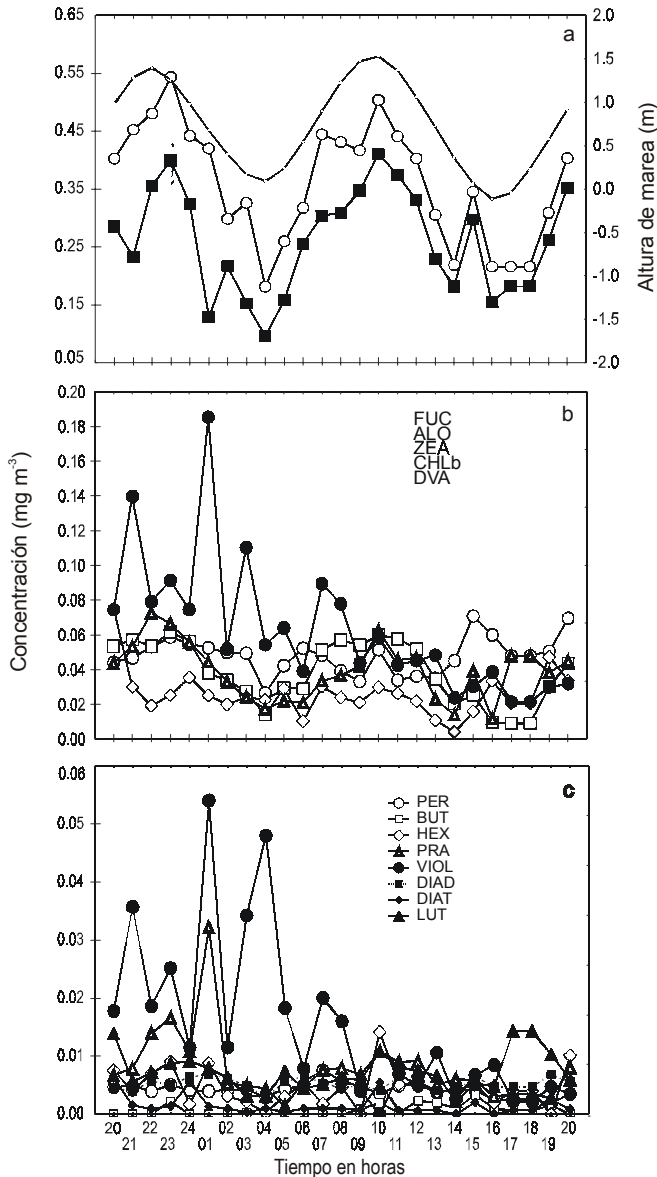


Figura 2. (a) Concentración del total de clorofila *a* (○) y clorofila *a* (■) en la serie de tiempo; la línea continua indica la altura de la marea durante el muestreo. (b) Pigmentos estimados por HPLC, con mayor concentración en la serie de tiempo: fucoxantina (FUC), alloxantina (ALO), zeaxantina (ZEA), clorofila *b* (CHLb) y divinil clorofila *a* (DVA). (c) Pigmentos con menor concentración: peridinina (PER), butanoloxifucoxantina (BUT), hexanoloxifucoxantina (HEX), prasinoxantina (PRA), violaxantina (VIOL), diadinoxantina (DIAD), diatoxantina (DIAT) y luteína (LUT).

Figure 2. (a) Concentrations of total chlorophyll *a* (○) and chlorophyll *a* (■) in the time series; the continuous line indicates the tidal height during the sampling. (b) Pigments estimated by HPLC with higher concentration in the time series: fucoxantin (FUC), alloxantin (ALO), zeaxantin (ZEA), chlorophyll *b* (CHLb), and divinyl chlorophyll *a* (DVA). (c) Pigments with lower concentration: peridinín (PER), butanoloxifucoxantin (BUT), hexanoloxifucoxantin (HEX), prasinoxantin (PRA), violaxantin (VIOL), diadinoxantin (DIAD), diatoxantin (DIAT), and lutein (LUT).

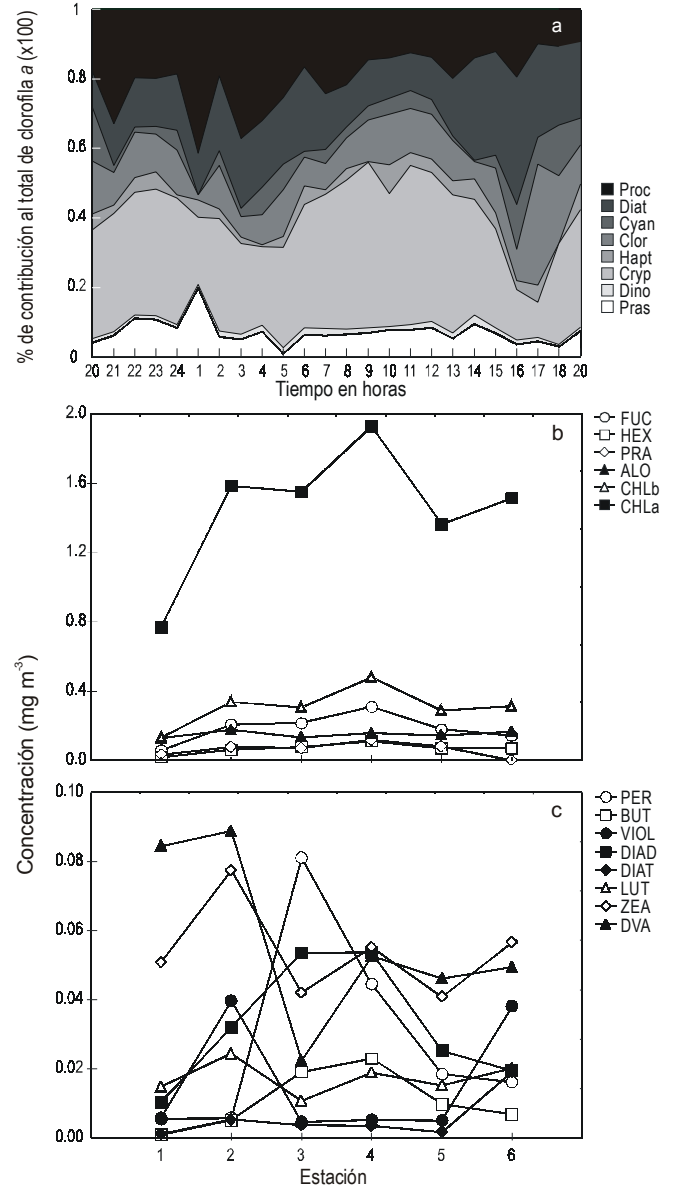


Figura 3. (a) Contribución porcentual de los grupos de fitoplancton al total de clorofila *a*, estimados por el programa CHEMTAX: *Prochlorococcus* sp. (Proc), diatomeas (Diat), cianobacterias (Cyan), clorofitas (Clor), haptofitas (Hapt), criptofitas (Cryp), dinoflagelados (Dino) y prasino fitas (Pras). (b) Pigmentos estimados por HPLC con mayor concentración en las estaciones: fucoxantina (FUC) hexanoloxifucoxantina (HEX), prasinoxantina (PRA), alloxantina (ALO), clorofila *b* (CHLb) y clorofila *a* (CHLa). (c) Pigmentos con menor concentración: peridinina (PER), butanoloxifucoxantina (BUT), violaxantina (VIOL), diadinoxantina (DIAD), diatoxantina (DIAT), luteína (LUT), zeaxantina (ZEA) y divinil clorofila *a* (DVA).

Figure 3. (a) Percent contribution of the phytoplankton groups to total chlorophyll *a*, estimated using the CHEMTAX program: *Prochlorococcus* sp. (Proc), diatoms (Diat), cyanobacteria (Cyan), chlorophytes (Clor), haptophytes (Hapt), cryptophytes (Cryp), dinoflagellates (Dino), and prasinophytes (Pras). (b) Pigments estimated by HPLC with highest concentrations at the stations: fucoxantin (FUC) hexanoloxifucoxantin (HEX), prasinoxantin (PRA), alloxantin (ALO), chlorophyll *b* (CHLb), and chlorophyll *a* (CHLa). (c) Pigments with lowest concentrations: peridinín (PER), butanoloxifucoxantin (BUT), violaxantin (VIOL), diadinoxantin (DIAD), diatoxantin (DIAT), lutein (LUT), zeaxantin (ZEA), and divinyl chlorophyll *a* (DVA).

indicadora de la variación de clorofitas y prasinofitas, mientras que la prasinoxantina es sólo de prasinofitas, la contribución de las prasinofitas al total de clorofila *a* fue alrededor del 10%. Los demás grupos del fitoplancton como dinoflagelados y haptofitas presentaron contribuciones menores al 10% al total de clorofila *a* (fig. 3a).

Los taxones dominantes determinados mediante el conteo por microscopio invertido siguiendo la técnica Utermöhl fueron dos géneros de diatomeas, *Nitzschia* y *Cocconeis*, que en algunos casos alcanzaron más del 70% de la abundancia total (tabla 1).

En el muestreo espacial, todos los pigmentos tuvieron concentraciones mayores en la zona de la boca de la bahía (estación 4), con disminución hacia los extremos internos.

En general las concentraciones encontradas en la variación espacial son mayores que la reportada en la serie de tiempo. Por ejemplo la clorofila *a* alcanzó valores de hasta 1.9 mg m⁻³

This is the first study that reports phytoplankton pigment concentrations based on HPLC at San Quintín Bay. The presence of divinyl chlorophyll *a* was detected, which strongly suggests the occurrence of *Prochlorococcus* sp. (Jeffrey *et al.*, 1997). Alloxantin, which is the pigment specific to the cryptophytes, was abundant throughout the time series, indicating that these organisms are dominant in the phytoplankton structure of the bay; it also presented a similar variation to that of chlorophyll *a*.

The pigments with concentrations below 0.02 mg m⁻³ (lutein, diatoxantin, diadinoxantin and butanoloxyfucoxantin) are those found in several classes of phytoplankton, which makes it difficult to estimate their percentage of contribution to the total chlorophyll *a*, as opposed to pigments that are specific to only one class of phytoplankton (such as peridinin, prasinoxantin and hexanoloxyfucoxantin). Concentrations higher than 0.02 mg m⁻³ were recorded for violaxantin; however, even

Tabla 1. Abundancias de taxa del fitoplancton estimadas mediante microscopio invertido (cél mL⁻¹), de las muestras de la serie de tiempo.

Table 1. Abundance of phytoplankton taxa in the time series samples, estimated using an inverted microscope (cells mL⁻¹).

Hora	<i>Nitzschia</i>	<i>Chaetoceros</i>	<i>Rhizosolenia</i>	<i>Cocconeis</i>	<i>Navicula</i>	<i>Oxytoxum</i>	<i>Prorocentrum</i>	<i>Gymnodinium</i>	<i>Richelia</i>	Otros	Total
20	21177	963	550	2475					1650		26815
21	6464			2338	276	138	550	1926		276	11968
22	12789	963		4125						138	18015
23	4125			3163			138	138	1788	551	9903
24	963			3026			275		2337		6601
01	3851	550		2613	138		275	275			7702
02	1376			3300	138		138				4952
03	826	688		2338		275				413	4540
04	3713			963			275				4951
05	7288	688	413	1650	550			275			10864
06	688	275		1926	1376		275				4540
07	7838	825	275	1788							10726
08	550			1513	550			550	1100		4263
09	1376	1238		1375			275	138	550	138	5090
10	3850	413		2613				276	413	275	7840
11	3988	138		3438				275		138	7977
12	1650			2613	276			413	1513		6465
13	5776	275		3026	138			138	1100		10453
14	2888	963	138	4401				1375	963	138	10866
15	7838			5226				688	2338	138	16228
16	3163			3301	138			138		138	6878
17	11139		413	2888				550	963	138	16091
18	3026	413		4125				688			8252
19	21177	963	550	2475					1650		26815
20	6464			2338	276	138	550	1926		138	11830

(fig. 3b), cuatro veces más que las concentraciones estimadas en la variación temporal. La excepción fue la divinil clorofila *a* que presentó concentraciones de hasta 0.08 mg m^{-3} en la variación espacial y de 0.19 mg m^{-3} en la temporal (fig. 3c).

El resto de los pigmentos pueden ser integrados en dos grupos: aquellos con concentraciones de hasta 0.5 mg m^{-3} (fig. 3b, clorofila *b*, fucoxantina, aloxantina y hexanoloxyfucoxantina), y los que presentaron concentraciones $< 0.1 \text{ mg m}^{-3}$ (fig. 3c, peridina, butanoloxyfucoxantina, violaxantina, diadinoxantina, diatoxantina, luteína, zeaxantina).

Discusión

Las series temporales de la concentración total de clorofila *a* y de clorofila *a* mostraron una clara asociación con la marea; en general, las abundancias altas de fitoplancton se presentan con la marea en flujo y viceversa. Este patrón ha sido descrito en detalle para esta zona por Lara-Lara *et al.* (1980) y Millán-Núñez *et al.* (1982).

Éste es el primer trabajo que reporta las concentraciones de pigmento del fitoplancton mediante el uso de HPLC en Bahía San Quintín, y en él se detectó la presencia de divinil clorofila *a*, que sugiere fuertemente la presencia de *Prochlorococcus* sp. (Jeffrey *et al.*, 1997). La aloxantina, que es el pigmento específico de la clase criptofita, fue abundante a lo largo de la serie de tiempo, lo que nos da una idea de que estos organismos son dominantes en la estructura fitoplanctónica de la bahía. Además presentó una variación similar a la clorofila *a*.

Los pigmentos con concentraciones menores a 0.02 mg m^{-3} (luteína, diatoxantina, diadinoxantina, butanoloxyfucoxantina), corresponden a pigmentos presentes en varias clases del fitoplancton, lo que dificulta la estimación del porcentaje de contribución al total de clorofila *a*, a diferencia de los pigmentos específicos de una sola clase de fitoplancton (como la peridina, prasinoxantina y hexanoloxyfucoxantina). La violaxantina presentó concentraciones mayores a 0.02 mg m^{-3} ; sin embargo, aunque este pigmento se encuentra en clorofitas y prasinofitas, los porcentajes de estas clases no fueron muy abundantes en la serie de tiempo.

Anteriormente no se había reportado la divinil clorofila *a* en esta zona debido a que las estimaciones de pigmentos se basaban en técnicas espectrofotométricas y/o fluorométricas que estimaban únicamente las concentraciones de clorofilas *a*, *b* y *c*, y sus productos de degradación (Millán-Núñez y Álvarez-Borrego, 1978; Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota y Álvarez-Borrego, 1988). Tampoco se había reportado la presencia de *Prochlorococcus* sp. en la bahía (Silva-Cota y Álvarez-Borrego, 1988) debido a que los estudios en taxocenosis fitoplanctónica se basaron en la técnica Utermöhl, siendo imposible observar estos organismos que, por su tamaño ($0.5\text{--}0.7 \mu\text{m}$), son considerados como los organismos fotosintéticos más pequeños conocidos a la fecha (Palinska *et al.*, 2000).

En años recientes, el uso de divinil clorofila *a* como un marcador altamente específico de *Prochlorococcus* sp. ha mejorado nuestra comprensión del papel del picoplancton

though this pigment occurs in chlorophytes and prasinophytes, these classes were not very abundant in the time series.

The occurrence of divinyl chlorophyll *a* in this area had not been reported previously, because the pigment estimates were based on spectrophotometric and/or fluorometric techniques, and only the concentrations of chlorophylls *a*, *b* and *c*, and their degradation products were determined (Millán-Núñez and Álvarez-Borrego, 1978; Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota and Álvarez-Borrego, 1988). Neither had the presence of *Prochlorococcus* sp. been reported in the bay (Silva-Cota and Álvarez-Borrego, 1988) because the phytoplankton taxocenosis studies were based on the Utermöhl method, and the size of these organisms ($0.5\text{--}0.7 \mu\text{m}$), which are considered the smallest photosynthetic organisms known to date (Palinska *et al.*, 2000), made their observation impossible.

In recent years, the use of divinyl chlorophyll *a* as a highly specific marker of *Prochlorococcus* sp. has improved our understanding of the role of picoplankton ($0.2\text{--}2 \mu\text{m}$) in the marine ecosystem (Gibb *et al.*, 2001). Maximum abundances up to three times higher than those of microphytoplankton have been recorded for this group (Chisholm *et al.*, 1988; Letelier *et al.*, 1993). Millán-Núñez *et al.* (2003), based on flow cytometry, recorded abundances of $3.3 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ and $10.3 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ for *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, respectively, in the California Current region off northwestern Baja California.

Prochlorococcus sp. has recently been classified as a cyanobacterium (Palinska *et al.*, 2000), and the presence of divinyl chlorophyll *a* allowed us to separate this species from the rest of the cyanobacteria. In San Quintín Bay, *Prochlorococcus* sp. contributed up to 40% of the total chlorophyll *a*, whereas the other cyanobacteria only accounted for 13%; however, both these contributions together account for 53% of the total chlorophyll *a*, and this concurs with Barlow *et al.* (1997, 1999), who reported ratios of divinyl chlorophyll *a* to total chlorophyll *a* of 11–40% for the Mediterranean and of up to 53% for the Arabian Sea.

To estimate the percentage of contribution to total chlorophyll *a* by the phytoplankton groups, the pigment ratios reported in the literature were used for each of them. As the pigment ratios for a particular group change with different physical and chemical seawater conditions (Mackey *et al.*, 1998), we suggest that the pigment ratios used in CHEMTAX be those of the phytoplankton species found in the study area; hence, the results regarding the contribution percentages for the different groups should be taken as a first approximation.

In general, the pigment concentrations near the mouth were higher than those in the inner parts of the bay, due to the higher microphytoplankton abundances that occur at the mouth (Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota and Álvarez-Borrego, 1988).

The presence of the different pigments at all the sampling stations indicates that the phytoplankton groups reported in the time series occur throughout the bay. However, the percentage of contribution to total chlorophyll *a* was not calculated

(0.2–2 μm) en el ecosistema marino (Gibb *et al.*, 2001). Este grupo presenta abundancias máximas de hasta tres órdenes de magnitud mayores que las máximas del microfitoplancton (Chisholm *et al.*, 1988; Letelier *et al.*, 1993). Millán-Núñez *et al.* (2003), utilizando citometría de flujo, encontraron *Prochlorococcus* y *Synechococcus* con abundancias de 3.3×10^6 cél L^{-1} y 10.3×10^6 cél L^{-1} , respectivamente, en la región de la Corriente de California frente al noroeste de Baja California.

Recientemente, *Prochlorococcus* sp. ha sido clasificado como cianobacteria (Palinska *et al.*, 2000). En este trabajo la presencia de divinil clorofila *a* ha permitido separar a *Prochlorococcus* sp. del resto de las cianobacterias. En Bahía San Quintín *Prochlorococcus* sp. contribuyó hasta un 40% del total de la clorofila *a*, mientras que el resto de las cianobacterias sólo alcanzaron hasta un 13%. Tomando en conjunto ambas contribuciones se alcanza el 53% del total de clorofila *a*, lo cual concuerda con Barlow *et al.* (1997, 1999), quienes reportaron razones de divinil clorofila *a* al total de clorofila *a* entre 11% y 40% para el Mediterráneo y de hasta 53% para el Mar Árabe.

Para la estimación del porcentaje de contribución al total de clorofila *a* por los grupos del fitoplancton se utilizaron las razones de pigmentos reportados en la literatura para cada uno de ellos. Sabemos que las razones de pigmentos en un grupo en particular cambian con las condiciones físicas y químicas del agua de mar (Mackey *et al.*, 1998). Por tanto, sugerimos que las razones de pigmentos que se usen en CHEMTAX sean las de las especies del fitoplancton del área de estudio. Es por lo anterior que los resultados sobre los porcentajes de contribución de los diferentes grupos deben ser tomados como una primera aproximación.

En general las concentraciones de pigmentos en las localidades cercanas a la boca fueron mayores que las que se encontraron en la parte interna de la bahía. Este patrón se debe a que en la boca de la bahía se encuentran mayores abundancias microfitoplanctónicas (Millán-Núñez *et al.*, 1982; Silva-Cota y Álvarez-Borrego, 1988).

La presencia de los diferentes pigmentos en todas las localidades muestreadas indica que los grupos fitoplanctónicos reportados para la serie de tiempo están presentes en toda la bahía. Sin embargo, no se hicieron cálculos de porcentaje de contribución al total de clorofila *a* por la escasez de los datos, ya que para el uso del CHEMTAX se requiere un número de muestras mayor que el número de pigmentos (Mackey *et al.*, 1997).

Los dinoflagelados estimados por microscopio para la serie de tiempo fueron escasos y su abundancia es consistente con su pigmento específico que es la peridina, la cual reflejó un porcentaje bajo de contribución al total de clorofila *a*. De la misma manera, las abundancias de diatomeas estimadas por microscopio fueron consistentes con la concentración de fucoxantina (pigmento de alta proporción en este grupo). Sin embargo, el resultado del CHEMTAX indicó que las diatomeas tuvieron una contribución menor al 70% como lo indicaron las muestras

porque de la falta de datos, as a greater number of samples than the number of pigments are required when using CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1997).

Few dinoflagellates were microscopically determined in the time series, and their abundance is consistent with their specific pigment, which is peridinin, reflecting a low percentage of contribution to the total chlorophyll *a*. Likewise, the microscopically estimated diatom abundances were consistent with the concentration of fucoxanthin (pigment of high proportion in this group); however, the CHEMTAX result indicated that diatoms contributed less than 70%, as shown by the inverted microscope samples (table 1). These comparisons stress the importance of considering the contribution of the small cells through chemical taxonomy, since *Prochlorococcus* sp. and cryptophytes cannot be observed under an inverted microscope because of their small size. In this study, both taxa accounted for 50% of the total chlorophyll *a*.

Acknowledgements

We thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions that helped to improve this manuscript.

English translation by Christine Harris.

de microscopio invertido (tabla 1). Estas comparaciones enfatizan la importancia de tomar en cuenta, mediante taxonomía química, la contribución de las células pequeñas, ya que por su tamaño los *Prochlorococcus* sp. y las cryptofitas no pueden ser observadas mediante microscopio invertido. En este trabajo ambos taxones acumularon hasta el 50% del total de clorofila *a*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a dos revisores anónimos sus comentarios y sugerencias que hicieron que este manuscrito mejorara en su contenido.

Referencias

- Anderson, R.A., Bidigare, R.R., Keller, M.D. and Latasa, M. (1996). A comparison of HPLC pigments signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep Sea Res.*, 43: 517–537.
- Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C., Cummings, D.G. and Fileman, T.W. (1997). Pigment chemotaxonomic distribution of phytoplankton during summer in the western Mediterranean. *Deep Sea Res.*, 44: 833–850.
- Barlow, R.G., Mantoura, R.F.C. and Cummings, D.G. (1999). Monsoonal influence on the distribution of phytoplankton pigments in the Arabian Sea. *Deep Sea Res.*, 46: 677–700.
- Bidigare, R.R. and Trees, C.C. (2000). HPLC phytoplankton pigments: Sampling laboratory methods, and quality assurance procedures. In: G.S. Fargion and J.L. Mueller (eds.), *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 2*,

- Chapter 14. NASA Tm 2000–209966, Goddard Space Flight Center, Greenbelt, MD, pp. 154–161.
- Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B. and Welschmeyer, N.A. (1988). A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334: 340–343.
- Gibb, W.S., Cummings, G.D., Irigoien, X., Barlow, G.R., Fauzi, R. and Mantoura, C. (2001). Phytoplankton pigment chemotaxonomy of the northeastern Atlantic. *Deep Sea Res.*, 48: 795–823.
- Gieskes, W.W.C. and Krayay, G.W. (1986). Analysis of phytoplankton pigments by HPLC before, during and after mass occurrence of the microflagellates *Coreobellus aureus* during the spring bloom in the open Northern Sea in 1983. *Mar. Biol.*, 92: 45–52.
- Jeffrey, S.W., Suielicki, M. and Haxo, F.T. (1975). Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. *J. Phycol.*, 1: 374–384.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. and Wright, S.W. (eds.) (1997). *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Monograph in Oceanographic Methods, Report for SCOR WH 78. SCOR-UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, Paris.
- Lara-Lara, J.R., Álvarez-Borrego, S. and Small, L.F. (1980). Variability and tidal exchange of ecological properties in a coastal lagoon. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 11: 613–637.
- Letelier, R.M., Bidigare, R.R., Hebel, D.V., Ondrusek, M., Winn C.D. and Karl, D.M. (1993). Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 1420–1437.
- Mackey, M.D., Mackey, D.J., Higgings, H.W. and Wright, S.W. (1996). CHEMTAX: A program for estimating class abundances from chemical markers application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144: 265–283.
- Mackey, M.J., Higgings, H.W., Mackey, M.D. and Wright, S.W. (1998). Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX. *Deep Sea Res.*, 45: 1141–1468.
- Millán-Núñez, R. y Álvarez-Borrego, S. (1978). Series de tiempo de clorofilas *a*, *b*, *c* y sus feofitinas en las bocas de dos lagunas costeras. *Ciencias Marinas*, 5:41–52.
- Millán-Núñez, R., Álvarez-Borrego, S. and Nelson, D.M. (1982). Effects of physical phenomena on the distribution of nutrients and phytoplankton and productivity in a coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 15: 317–335.
- Millán-Núñez, E., Sieracki, M.E., Millán-Núñez, R., Lara-Lara, J.R., Gaxiola-Castro, G. and Trees, C.C. (2003). Specific absorption coefficient and flow cytometry phytoplankton biomass in the southern region of the California Current. *Deep Sea Res.* (in press).
- Palinska, A.K., Jahns, T., Rippka, R. and Tandeau de Marsac, N. (2000). *Prochlorooccus marinus* strain PCC 9511, a picoplankton cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology*, 146: 3099–3104.
- Silva-Cota, S. and Álvarez-Borrego, S. (1988). The “El Niño” effect on the phytoplankton of the Northwestern Baja California coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 27:109–115.
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der International Vereinigung für theoretische und Angewandte Limnologie* 9, 1–38.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjorland, T., Repeta, D. and Welschmeyer. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77: 183.