

Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: A nutrient stress diagnostic tool?

La eficiencia cuántica máxima de separación de carga del fotosistema II de la comunidad de fitoplancton en el Pacífico Nororiental Tropical Mexicano: ¿Una herramienta adecuada para diagnosticar el estrés por nutrientes?

A Almazán-Becerril, E García-Mendoza*

Departamento de Oceanografía Biológica, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Km. 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada 22860, Baja California, México. * E-mail: ergarcia@cicese.mx

Abstract

Phytoplankton growth in oligotrophic regions might be constrained by a low photosynthetic capacity related to nutrient stress. A reduced photosynthetic capacity has been documented by low values of the maximum quantum efficiency of charge separation (F_v/F_m) of photosystem II (PSII). In the present work, spatial and temporal variations of F_v/F_m in phytoplankton samples of the Eastern Tropical North Pacific (ETNP) off Mexico were characterized to explore the potential of this parameter as a nutrient stress indicator. Our results show that F_v/F_m was lower than 0.5 in most of the samples and that in surface waters this parameter was highly variable. The variability of F_v/F_m was related to the time of sampling, and F_v/F_m changes followed a day/night cycle with maximum values at dawn and a strong reduction at noon related to down-regulation of PSII activity. Enrichment experiments showed that F_v/F_m did not increase after nitrate addition to surface samples. These results suggest that photosynthesis of the phytoplankton community in the ETNP dominated by picoplankton, of which 60–80% was represented by prokaryote biomass (*Prochlorococcus* and other cyanobacteria), was not rate-limited under natural conditions. Therefore, low F_v/F_m values associated with PSII down-regulation and inherent of specific phytoplankton species are not indicative of nutrient stress in picoplankton-dominated environments such as the ETNP off Mexico. These sources of variability that are not directly associated with the nutritional status of the phytoplankton community should be taken into account when using F_v/F_m as a diagnostic tool for nutrient limitation.

Key words: Photosystem II maximum efficiency, nutrient stress, tropical Pacific, *Prochlorococcus*.

Resumen

El crecimiento del fitoplancton en zonas oligotróficas del océano puede estar restringido por una baja capacidad fotosintética asociada a una limitación por nutrientes. Se ha documentado la reducción de la capacidad fotosintética como valores bajos de la eficiencia cuántica máxima de separación de carga del fotosistema II (PSII, F_v/F_m). En el presente trabajo se caracterizó la variación espacial y temporal de F_v/F_m en muestras de fitoplancton de la región oceánica del Pacífico Nororiental Tropical (PNOT) ubicado frente a la costa de México para explorar el potencial de este parámetro como indicador de estrés nutricional. Los resultados mostraron que F_v/F_m fue menor de 0.5 en la mayoría de las muestras y presentó una alta variabilidad en muestras de agua recolectadas en la superficie. Esta variabilidad estuvo relacionada con la hora de muestreo. Los cambios de F_v/F_m siguieron un patrón día-noche con valores máximos al final de la tarde y una marcada disminución durante el mediodía asociada a la regulación en la actividad del PSII. En experimentos de enriquecimiento con diferentes nutrientes en muestras de agua superficial no se observó un aumento en F_v/F_m . La comunidad del PNOT estuvo dominada por picoplancton, del cual entre 60 y 80% estuvo constituido por biomasa procariota (*Prochlorococcus* y otras cianobacterias), y no se encontró evidencia de limitación de la tasa fotosintética por estrés nutricional en condiciones naturales. Por lo tanto, los valores bajos de F_v/F_m relacionados con la regulación de la actividad del PSII e inherentes a especies fitoplanctónicas específicas, no indican un estrés nutricional en ambientes dominados por el picoplancton, como es el caso del PNOT de México. La variabilidad que no está directamente asociada con el estado nutricional de la comunidad fitoplanctónica debe de tomarse en cuenta al usar F_v/F_m como herramienta diagnóstica de limitación por nutrientes.

Palabras clave: Máxima eficiencia del fotosistema II, estrés nutricional, Pacífico Tropical, *Prochlorococcus*.

Introduction

Active fluorescence techniques have been widely used as a proxy to assess the physiological status of marine phytoplankton (Kolber *et al.* 1990, Falkowski *et al.* 1991, Geider *et*

Introducción

Las técnicas de fluorescencia activa han sido utilizadas ampliamente como una aproximación para conocer el estado fisiológico del fitoplancton marino (Kolber *et al.* 1990;

al. 1993a, Olaizola *et al.* 1996, Greene *et al.* 1994, Behrenfeld *et al.* 2006). One key parameter derived from these techniques is the maximum efficiency of charge separation (F_v/F_m) of photosystem II (PSII). Values of F_v/F_m lower than 0.65 or 0.75, depending on the protocol used (Kromkamp and Forster 2003), have been associated with a suboptimal photosynthetic performance of phytoplankton due to nutrient limitation, mainly by inorganic nitrogen (Kolber *et al.* 1990, Falkowski *et al.* 1991, Geider *et al.* 1993a, Olaizola *et al.* 1996). A low PSII efficiency is caused by a reduction in the turnover rate of reactions involved in the electron transport chain and CO₂ fixation that is probably caused by nutrient stress (Kolber and Falkowski 1993).

Even though F_v/F_m is widely accepted as a good indicator of nutrient limitation, this parameter does not reflect nutrient stress in cultures growing in steady-state conditions (Parkhill *et al.* 2001). It has also been shown that the light history is more important in the regulation of F_v/F_m than the nutritional status of dinoflagellates grown under nutrient-stress conditions (Rodríguez-Román and Iglesias-Prieto 2005). Therefore, nutrient-stressed cells can display similar values of F_v/F_m as compared with nutrient-replete cells if they are able to acclimate to a condition of low nutrient availability (Parkhill *et al.* 2001). Furthermore, most of the studies related to the effect of nutrient stress on F_v/F_m have been conducted on species with high nitrate requirements, such as large diatoms (Geider *et al.* 1993b). The extrapolation of the physiological responses observed in this algal group to field conditions is difficult considering that natural assemblages are composed of different evolutionary groups of prokaryotic and eukaryotic cells. Particularly, in oligotrophic regimes cyanobacteria and small eukaryotes dominate the phytoplankton community (Goericke *et al.* 2000). The structure of a given phytoplankton community is the result of the physiological response of particular species and the ecological processes linked to specific environmental conditions (Legendre *et al.* 1999). Species inhabiting oligotrophic regimes must have the capability to withstand low nutrient availability without being affected in their physiology. These species probably express physiological strategies to optimize their photosynthetic performance in nitrate-impooverished waters. In the present paper we present a series of experiments performed during a cruise in the Eastern Tropical North Pacific (ETNP) off Mexico to test the hypothesis that in an oligotrophic regime with a high-stratified vertical structure, phytoplankton is adapted to this condition and its photosynthetic rate is not limited. Therefore, a low F_v/F_m will not reflect an impairment of photosynthetic rate in the region.

Material and methods

Hydrographic data and water samples were collected during the MEX0203 cruise conducted in February and March 2003 in the ETNP (fig. 1) on board the R/V *New Horizon*. A total of eleven stations distributed along a transect perpendicular to the coastline were sampled. At each station, salinity,

Falkowski *et al.* 1991, Geider *et al.* 1993a, Olaizola *et al.* 1996, Greene *et al.* 1994, Behrenfeld *et al.* 2006). Un parámetro clave derivado de estas técnicas es la eficiencia cuántica máxima de separación de carga del fotosistema II (F_v/F_m). Dependiendo del protocolo usado (ver Kromkamp y Forster 2003), los valores de F_v/F_m menores a 0.65 o 0.75 han sido asociados a una actividad fotosintética subóptima debida a limitación por nutrientes, en particular nitrógeno inorgánico (Kolber *et al.* 1990, Falkowski *et al.* 1991, Geider *et al.* 1993a, Olaizola *et al.* 1996). El estrés nutricional se refleja en la disminución de la eficiencia del fotosistema II (PSII) causada por la reducción en la tasa de recambio de las reacciones involucradas en la cadena de transporte de electrones y fijación de CO₂ (Kolber y Falkowski 1993).

Aún cuando F_v/F_m es generalmente aceptado como un buen indicador de limitación por nutrientes, este parámetro no necesariamente refleja estrés nutricional en cultivos que crecen en condiciones de equilibrio (Parkhill *et al.* 2001). Incluso, la historia lumínica podría ser más importante que el estado nutricional para la regulación de F_v/F_m en dinoflagelados que crecen bajo condiciones de estrés (Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto 2005). Por lo tanto, las células que crecen en condiciones de estrés pueden presentar valores de F_v/F_m similares a los que presentan las células que crecen sin limitaciones de nutrientes si logran aclimatarse a la baja disponibilidad de los mismos (Parkhill *et al.* 2001). Aunado a esto, la mayoría de los estudios relacionados con el efecto del estrés nutricional se han efectuado con especies con requerimientos altos de nitrato como las diatomeas (Geider *et al.* 1993b). Es difícil extrapolar las respuestas fisiológicas observadas en este grupo a condiciones de campo si se toma en cuenta que las comunidades naturales están compuestas por diferentes linajes evolutivos de células procariontas y eucariotas. Particularmente en regimenes oligotróficos las cianobacterias y los picoeucariotas dominan la comunidad de fitoplancton (Goericke *et al.* 2000). La estructura de una comunidad de fitoplancton es el resultado de la respuesta fisiológica de especies particulares y de procesos ecológicos ligados a condiciones ambientales específicas (Legendre *et al.* 1999). Las especies que habitan los regimenes oligotróficos deben tener la capacidad de resistir la baja disponibilidad de nutrientes sin que esto afecte su fisiología. Probablemente estas especies desarrollan estrategias que les permiten optimizar su desempeño fotosintético en aguas pobres en nitratos. En el presente trabajo se presenta una serie de experimentos efectuados durante el crucero MEX0203 en el Pacífico Nororiental Tropical (PNOT) mexicano para probar la hipótesis de que, en un régimen oligotrófico con una fuerte estratificación vertical, el fitoplancton está adaptado a estas condiciones y su tasa fotosintética no está limitada. Por lo tanto, valores bajos de F_v/F_m no reflejarán un bajo potencial fotoquímico en esa región.

Materiales y métodos

Durante febrero y marzo de 2003 se realizó el crucero MEX0203 en la región del PNOT mexicano a bordo del B/O

temperature, chlorophyll *a* (Chl *a*) fluorescence and pressure were measured using a Seabird 19 plus CTD. Water samples for pigment analysis and F_v/F_m measurements were collected from different depths at each station. The collecting depths were chosen according to the vertical distribution of Chl *a* determined by the fluorescence profile.

Measurements of the maximum efficiency of charge separation of PSII (F_v/F_m)

Photosystem II emission was measured with a pulse amplitude modulated fluorometer (XE-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Nomenclature and parameter calculations were as in Kromkamp and Forster (2003). Maximum quantum efficiency of PSII was calculated as F_v/F_m . Variable fluorescence (F_v) is the difference between the maximum (F_m) and the minimum (F_0) Chl *a* emission. F_0 is the fluorescence in darkness excited only by the modulated measuring beam pulsed at 2 Hz (xenon lamp with a Schott BG39 filter), and F_m represents the maximum fluorescence measured in darkness when all the photochemical quenching is suppressed by a short saturating pulse of light (0.8 s). The fluorescence signal was measured in samples dark-adapted for at least 30 min. After this period, 2 mL of sample were placed in a quartz cuvette mounted in the ED-101US optical unit of the fluorometer. Three saturating light pulses were applied to each sample every 30 s. These measurements were performed three times for each depth. Variation between measurements was no more than 5%. Baseline correction was done by subtracting the background fluorescence signal of GF/F filtered seawater from the same depth of each sample.

Pigment quantification

Water from the samples (1.5–2.5 L) was filtered through 25-mm GF/F filters. The filters were frozen immediately in liquid nitrogen. Extraction of the pigments was done by mechanical disruption (Bead Beater, Biospec Inc.) of the filters with 0.5-mm diameter zirconia/glass beads in 1.5-mL pre-cooled 100% acetone. The homogenate was left for at least 2 h at -20°C in darkness. Cleaning of the samples was done by centrifugation ($15000\text{ g} \times 5\text{ min}$, 4°C). This procedure gave a good extraction yield without degradation of the samples (data not shown). Pigment quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) as in Van Heukelem and Thomas (2001) with the modification described by Colombo-Pallota *et al.* (2006). The HPLC instrument was a Shimadzu AV-10 series equipped with a Zorbax Eclipse XDBC-8 reverse phase column (150 mm \times 4.6 internal diameter, 3.5- μm size particles). An absorption detector was set up at 436 nm. This protocol achieves baseline separation of Chl *a* and divinyl chlorophyll *a* (DVChl *a*), and was calibrated with 16 pigment standards (DHI Inc., Sweden). Standard purity determination and the calibration protocol were as in Wright and Mantoura (1997).

New Horizon. Se muestrearon un total de 11 estaciones distribuidas en un transecto perpendicular a la línea de costa (fig. 1). En cada estación se registraron los valores de salinidad, temperatura, presión y fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*) en la columna de agua mediante lances de CTD (Seabird 19 plus). Paralelamente se filtraron muestras de agua de profundidades discretas en cada estación para análisis pigmentarios y mediciones de la eficiencia cuántica (F_v/F_m). El criterio para elegir las profundidades de colecta se basó en la distribución vertical de Chl *a* determinada mediante del perfil vertical de fluorescencia.

Medición de la eficiencia cuántica máxima de separación de carga del PSII (F_v/F_m)

La emisión del PSII fue medida con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (XE-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). La nomenclatura y el cálculo de los parámetros han sido descritos por Kromkamp y Forster (2003). La eficiencia cuántica máxima fue calculada como F_v/F_m . La fluorescencia variable (F_v) es la diferencia entre la emisión máxima (F_m) y la mínima (F_0) de la Chl *a*. F_0 es la señal de fluorescencia en la oscuridad, obtenida con pulsos de excitación de 2 Hz (lámpara de xenón con filtro óptico Schott BG39) y F_m representa la fluorescencia máxima medida en la oscuridad cuando todo el *quenching* fotoquímico es suprimido por un pulso de luz saturante (0.8 s). La señal de fluorescencia fue medida en muestras mantenidas en oscuridad por al menos 30 min. Después de este periodo, se colocaron 2 ml de muestra en una celda espectrofotométrica de cuarzo montada en la unidad óptica ED-101US del fluorómetro. Se aplicaron tres pulsos saturantes a cada

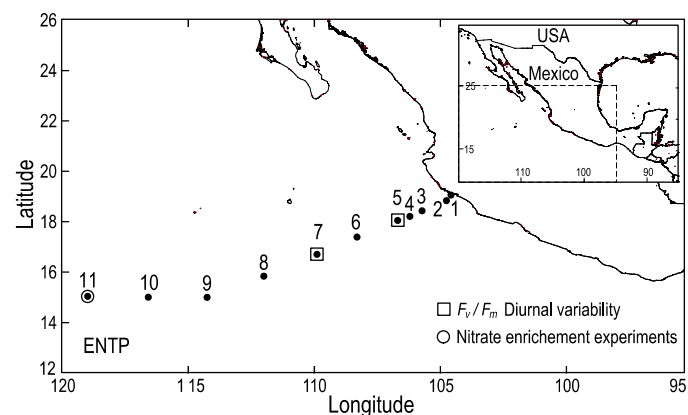


Figure 1. Location of sampling stations in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico. The diurnal variation of the maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was measured at the stations enclosed with diamonds. For the enrichment experiments, surface water was collected at station 11.

Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en el Pacífico Nororiental Tropical mexicano. La medición de la variación diaria de la máxima eficiencia fotosintética del PSII (F_v/F_m) se realizó en las estaciones señaladas con rombos. Para los experimentos de enriquecimiento se tomó agua de superficie de la estación 11.

Estimation of the relative contribution of phytoplankton taxa to total biomass

The relative contribution of different phytoplankton groups to total biomass, such as total chlorophyll concentration (Chl *a* + DVChl *a* = TChl *a*), was estimated using the CHEMTAX program (Mackey *et al.* 1996). The relative contribution of the different phytoplankton groups based on a single initial pigment ratio matrix involves an analytical error beforehand since it is assumed that all species are acclimated to the same environmental conditions. To try to get more reliable estimations, we divided the pigment data into different strata to represent different conditions at which the phytoplankton community was exposed. Euclidean distances of pigment concentration and pigment ratios in samples were used to detect clusters by using single linkage. This analysis separated three different groups according to the depth of the sample. Therefore, three different strata were defined for the chemotaxonomic analysis. All data from the surface to 35 m depth were grouped. A second stratum was defined from 36 to 85 m depth, where the deep chlorophyll maximum was located at most of the stations. Finally, the community below 85 m was considered to have similar acclimation conditions (third stratum). The initial pigment ratio matrix for the program iterations was taken from Schlüter *et al.* (2000).

The relative contribution of *Prochlorococcus* to phytoplankton biomass was calculated as the ratio of DVChl *a* to TChl *a*. Therefore, the contribution of the Chl *a* related to this group was subtracted from the pigment ratio matrix. Also, zeaxanthin (Zea) associated with *Prochlorococcus* was subtracted from the matrix to avoid the overestimation of other cyanobacteria. The amount of Zea associated with *Prochlorococcus* was calculated using a Zea/DVChl *a* of 1, 0.425 and 0.76 for the surface, middle and lower strata, respectively. These ratios were obtained from samples in which DVChl *a* represented more than 95% of the TChl *a*. Assuming that this pigment ratio was constant in all samples of the same layer, Zea related to *Prochlorococcus* was calculated as:

$$\text{Zea}_{\text{Proch}} = \text{Zea}/\text{DVChl } a \times [\text{DVChl } a] \quad (1)$$

Zea independent of *Prochlorococcus* in each sample could be attributed primarily to other cyanobacteria.

Nitrate enrichment experiments

To test the effect of nutrient addition on the photosynthetic performance of the phytoplankton community, three sequential enrichment experiments were performed. In the first experiment we evaluated the response of the phytoplankton community to the addition of phosphate (as orthophosphate), nitrate (as NaNO₃), and iron (as chelated FeCl₃). There were no changes in the F_v/F_m signal, but we noticed an increase in phytoplankton biomass in the sample in which nitrate was added (data not shown). Two new enrichment experiments were then

muestra en intervalos de 30 s. Estas mediciones fueron realizadas por triplicado para cada muestra. La variación entre muestras no fue mayor al 5%. La señal de fluorescencia fue corregida sustrayendo la fluorescencia producida por el agua de mar filtrada por GF/F proveniente de la misma profundidad de la muestra.

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Se filtraron de 1.5 a 2.5 L de agua mediante filtros GF/F de 25 mm diámetro, que fueron congelados de inmediato en nitrógeno líquido. La extracción de los pigmentos se llevó a cabo por disrupción mecánica (Bead Beater, Biospec Inc.) de los filtros en viales con perlas de vidrio/zirconio y 1.5 mL de acetona al 100% previamente enfriada. El homogenizado se mantuvo por al menos 2 h en oscuridad a -20°C. La solución de pigmentos se separó por centrifugación (15000 g × 5 min, 4°C). Este procedimiento dio buena eficiencia de extracción sin degradación de la muestra (datos no mostrados). La separación de pigmentos se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de acuerdo al protocolo de van Heukelem y Thomas (2001) con la modificación descrita en Colombo-Pallota *et al.* (2006). El equipo de HPLC utilizado fue un modelo Shimadzu de la serie AV-10 equipado con una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDBC-8 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno y 3.5 μm de tamaño de partícula). El detector de absorción fue configurado a 436 nm. Este protocolo separa, a nivel de línea base, la Chl *a* de la divinil clorofila *a* (DVChl *a*), y fue calibrado con 16 estándares comerciales (DHI, Inc. Suecia) de acuerdo a lo descrito por Wright y Montoura (1997).

Estimación de la contribución relativa de los grupos de fitoplancton a la biomasa total

La contribución relativa de los diferentes grupos de fitoplancton a la biomasa total, considerada como la concentración total de clorofila (Chl *a* + DVChl *a* = TChl *a*), fue estimada con el programa CHEMTAX (Mackey *et al.* 1996). La estimación de la contribución relativa de cada uno de los grupos de fitoplancton a la TChl *a* con base en una sola matriz de razones pigmentarias involucra de antemano un error analítico ya que supone que todas las especies están aclimatadas a las mismas condiciones ambientales. En este trabajo se intentó hacer estimaciones más confiables dividiendo las muestras en diferentes estratos para representar las condiciones a las cuales la comunidad de fitoplancton está expuesta. Para ello se realizó un análisis de *clusters* utilizando la distancia euclidiana de las concentraciones de pigmentos y razones pigmentarias en las muestras. Mediante este análisis se separaron tres diferentes grupos de acuerdo a la profundidad de las muestras. Por lo tanto se definieron tres estratos diferentes para el análisis quimiotaconómico. El primer estrato abarcó los primeros 35 metros de columna de agua, el segundo se estableció entre 36 y 85 m donde se localizó el máximo subsuperficial de clorofila (MSC). Finalmente, se consideró que las muestras obtenidas a

performed with addition of only nitrate. Both experiments were performed using surface water collected at station 11 on different dates. Each experiment consisted of two treatments and one control (with no addition of nitrate). Two replicates were performed for each treatment and the control. Surface water was incubated with 2 μM (treatment 1) and 4 μM (treatment 2) final concentration of NO_3^- on board in 1-L acid-washed polycarbonate bottles. The bottles were kept in an acrylic incubator with constant seawater flow and covered with a neutral density screening to simulate 60–70% of the irradiance at the surface. The objective of exposing the samples to this irradiance was to reduce high light stress without limiting growth. An aliquot was taken from each bottle every three hours during three days for F_v/F_m measurements. At the end of experiment, the remaining water was filtered for HPLC analysis. In this step the water from the control replicates was mixed and treated as a single sample.

F_v/F_m time series

Maximum quantum efficiency was monitored in the phytoplankton community from the surface (1–2 m depth range according to the length of the sampling bottle and rosette) and 40 m depth during the light period at stations 5 and 7 (see fig. 1). Sampling for pigment determination (HPLC analysis) and F_v/F_m measurements was performed every hour starting one hour before sunrise (dawn) and finishing after sunset.

Results

Hydrography

Surface temperatures above 25°C occurred throughout most of the ETNP region. The thermocline was at 50 m depth close to the coast, and between 80 and 90 m depth range at oceanic stations (stations 4–11; fig. 2). A strong vertical stratification of the water column was present (fig. 2c), limiting the flux of remineralized nitrogen from deeper waters into the mixed layer of the region. The rise of isopycnals in some parts along the transect (fig. 2c) was probably related to mesoscale structures, a common characteristic in the zone (López-Calderón *et al.* 2006).

Vertical changes of F_v/F_m and phytoplankton community composition

Figure 3 presents the distribution relative to depth of TChl *a*, F_v/F_m and pigment-derived phytoplankton taxa at three stations (1, 3 and 11). Station 1 represented conditions associated with a coastal environment. A well-developed deep chlorophyll maximum (DCM) was detected above 20 m depth (fig. 3a). From the surface to 30 m depth, diatoms contributed more than 90% of the TChl *a*. Below the DCM the relative contribution of prokaryotes to total biomass increased and DVChl *a* represented almost 90% of the TChl *a* at 80–90 m

más de 85 m provenían de una comunidad con condiciones similares de aclimatación. La matriz inicial de razones pigmentarias fue tomada del trabajo de Schlüter *et al.* (2000).

La contribución relativa de *Prochlorococcus* a la biomasa fitoplanctónica se calculó mediante la razón DVChl *a*/TChl *a*. Por lo tanto, la contribución de Chl *a* asociada a ese grupo fue restada de la matriz de razones pigmentarias. De la misma forma, la zeaxantina (*Zea*) asociada a *Prochlorococcus* fue sustraída de la matriz para evitar la sobreestimación de la contribución de las cianobacterias. La cantidad de *Zea* asociada a *Prochlorococcus* se calculó usando razones *Zea*/DVChl *a* de 1, 0.425 y 0.76 para los estratos de superficie, media agua y zona profunda respectivamente. Estas razones fueron obtenidas de muestras donde la DVChl *a* representó alrededor del 95% de la TChl *a*. Suponiendo constante este cociente en todas las muestras de la misma capa de profundidad, entonces la zeaxantina asociada a *Prochlorococcus* se calculó como:

$$\text{Zea}_{\text{Proch}} = \text{Zea}/\text{DVChl } a \times [\text{DVChl } a] \quad (1)$$

La *Zea* independiente de *Prochlorococcus* en cada una de las muestras se atribuyó a otras cianobacterias.

Experimentos de enriquecimiento con nitrato

Para probar el efecto de la adición de nutrientes sobre el desempeño fotosintético de la comunidad de fitoplancton se realizaron tres experimentos de enriquecimiento. En el primer experimento se evaluó la respuesta de la comunidad al enriquecimiento con fosfato (como ortofosfato PO_4^{3-}), nitrato (como NaNO_3), y hierro (como FeCl_3 quelado). En los resultados de este primer experimento no se observaron cambios en la señal de F_v/F_m , pero si se registró un aumento de la biomasa del fitoplancton en la muestra enriquecida con nitrato (datos no mostrados). Por lo tanto se realizaron dos nuevos experimentos en diferentes fechas añadiendo sólo nitrato a muestras superficiales de la estación 11. Cada experimento consistió en dos tratamientos y un control (sin adición de nitrato). Se hicieron dos réplicas por cada tratamiento y cada control. Se incubaron a bordo muestras de agua de superficie con 2 μM (tratamiento 1) y 4 μM (tratamiento 2) de concentración final de NO_3^- en botellas de policarbonato de boca angosta de 1 L previamente lavadas con HCl al 10%. Las botellas se mantuvieron en un incubador de acrílico con flujo constante de agua de mar y se cubrieron con una malla de plástico para simular 60–70% de la irradiancia medida en superficie. El objetivo de exponer las muestras a este nivel menor de irradiancia fue disminuir el estrés lumínico sin limitar el crecimiento. Se tomaron alíquotas de cada muestra cada 3 horas durante 3 días para mediciones de F_v/F_m . Al final del experimento el resto del agua fue filtrada para analizarla por HPLC. En este paso se mezcló el agua de las botellas control y se trató todo como una sola muestra.

Series de tiempo de F_v/F_m

La eficiencia cuántica máxima fue monitoreada en la comunidad de fitoplancton de superficie (intervalo de 1 a 2 m

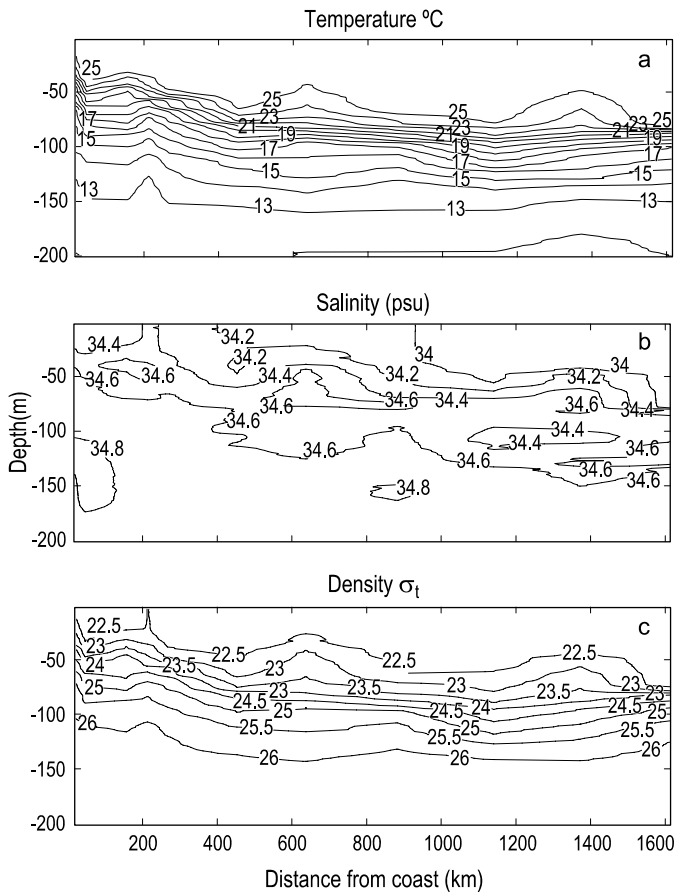


Figure 2. Hydrographic characteristics of the study area. Temperature ($^{\circ}\text{C}$; a), salinity (psu; b) and σ_t (c).

Figura 2. Características hidrográficas de la zona de estudio. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$; a), salinidad (psu; b) y σ_t (c).

depth (fig. 3c). Station 3 represented a transition between the oceanic conditions detected at stations 4–11 and the coastal environment. Station 3 was characterized by low surface chlorophyll concentration and a relatively shallow DCM (around 40 m depth) with a TChl *a* concentration of $0.37 \mu\text{g L}^{-1}$. At the surface, phytoplankton biomass was represented mainly by prokaryotic phytoplankton (>80% of TChl *a*). The contribution of this group to TChl *a* decreased in the DCM to 23% (fig. 3g) and the eukaryotic component (fig. 3h) was represented mainly by prymnesiophytes (presence of 19-hexanoiloxifucoxanthin, HF) and pelagophytes (presence of 19-butanoiloxifucoxanthin, BF). A second DCM was observed at station 3 around 100 m depth (fig. 3e); DVChl *a* was more than 94% of the TChl *a* in this maximum. The presence of this second maximum (*Prochlorococcus* maximum, pDCM) was not correlated to the TChl *a* at the surface or in the DCM (nonparametric Spearman rank correlation, $P > 0.05$; $n = 9$); however, there was a strong negative correlation between the depth of pDCM and the distance from the coast ($r = -0.94$, $P < 0.05$; $n = 9$). The pDCM was detected throughout the study area, except at stations 10 and 11, and was found to be deeper in oceanic

de profundidad dependiendo de la longitud de la botella y la roseta usadas para el muestreo) y de 40 m durante el periodo de luz en las estaciones 5 y 7 (ver fig. 1). Cada hora se recolectó agua de la superficie para determinar la concentración de pigmentos (HPLC) y para mediciones de F_v/F_m , comenzando antes del amanecer y concluyendo después del ocaso.

Resultados

Hidrografía

Durante la época de estudio se registraron temperaturas superficiales mayores a 25°C en la región del ETNP. La termoclina se encontró a ~ 50 m de profundidad cerca de la costa, y entre 80 y 90 m en las estaciones oceánicas (estaciones 4 a 11; fig. 2). Se observó una pronunciada estratificación (fig. 2c) en la región, lo que evitó el flujo de nitrógeno remineralizado de aguas profundas a la capa de mezcla. Fue evidente la elevación de las isopícnas en algunos puntos a lo largo del transecto, probablemente relacionadas con estructuras de mesoescala, las cuales son características comunes en la zona (López-Calderón *et al.* 2006).

Cambios verticales de F_v/F_m y la composición de la comunidad de fitoplancton

La figura 3 presenta la distribución de la TChl *a* a profundidad, F_v/F_m y las contribuciones a la biomasa de los diferentes grupos de fitoplancton estimados por medio de los pigmentos huella en tres estaciones (1, 3 y 11). La estación 1 representó las condiciones relacionadas con un ambiente costero en el que se detectó un máximo subsuperficial de clorofila (DCM) bien desarrollado situado a menos de 20 m de profundidad (fig. 3a). Desde la superficie y hasta 30 m la clorofila asociada a las diatomeas constituyó más de 90% de TChl *a*. Por debajo del MSC se incrementó sustancialmente la contribución relativa de los procariontes, y la DVChl *a* constituyó aproximadamente un 90% de la TChl *a* entre 80 y 90 m de profundidad (fig. 3c). La estación 3 presentó características de transición entre las condiciones oceánicas (estaciones 4 a 11) y los ambientes influenciados por la costa, y se caracterizó por presentar un MSC relativamente somero (~ 40 m) con concentraciones de TChl *a* de $0.37 \mu\text{g L}^{-1}$. En la superficie la TChl *a* estuvo conformada principalmente por biomasa de células procariontes (>80% de la TChl *a*). La contribución de estos grupos a la TChl *a* disminuyó hasta un 23% en el MSC (fig. 3g) y el componente eucariota (fig. 3h) estuvo representado principalmente por primnesiofitas (presencia de 19-hexanoiloxifucoxantina, HF) y pelagofitas (presencia de 19-butanoiloxifucoxantina, BF). En la estación 3, alrededor de los 100 m (fig. 3e), se encontró un segundo MSC donde la DVChl *a* representó más del 94% de la TChl *a*. La presencia de este segundo máximo (máximo de *Prochlorococcus*, pMSC) no estuvo correlacionada con la TChl *a* en la superficie o en el MSC ($P > 0.05$; $n = 9$; correlación de Spearman). Sin embargo, se detectó una

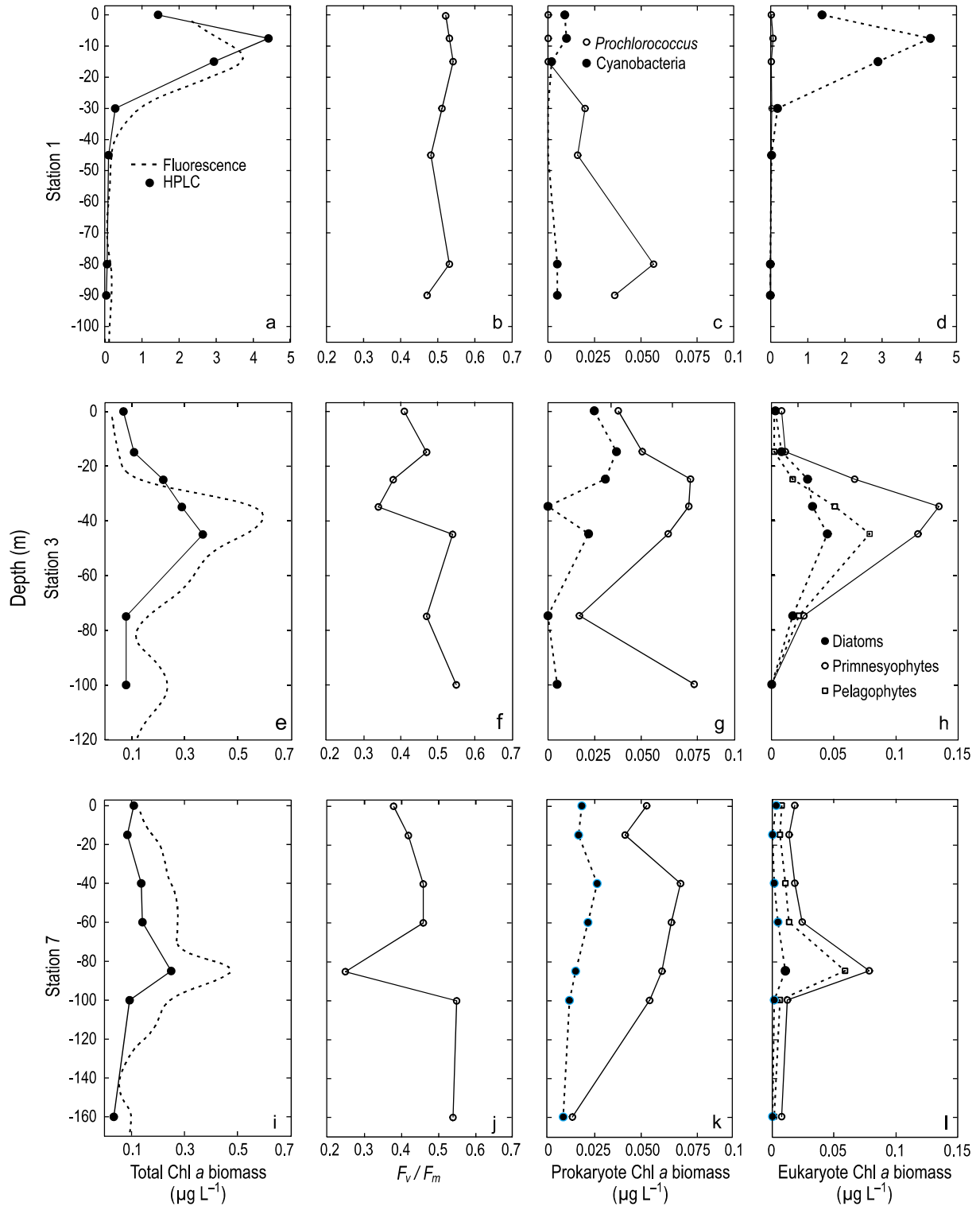


Figure 3. Vertical distribution of total chlorophyll *a* (TChl *a*; a, e and i) measured in discrete samples (closed symbols and continuous line) and fluorescence-estimated Chl *a* concentration during CTD casts (dotted line) at three representative stations in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico. The vertical distribution of F_v/F_m is presented in panels b, f and j. The prokaryotic (c, g and k) and eukaryotic (d, h and l) contribution to TChl *a* is also presented.

Figura 3. Distribución vertical de la clorofila total (TChl *a*; a, e e i) medida en muestras discretas (símbolos negros y línea continua) y concentración de Chl *a* estimada mediante el sensor de fluorescencia durante los lances de CTD (línea punteada) en tres estaciones representativas del Pacífico Nororiental Tropical mexicano. La distribución vertical de F_v/F_m se presenta en los paneles b, f y j. En los paneles c, g y k se presenta la contribución de procariontas a la TChl *a* y en los paneles d, h y l la de los eucariotas.

environments (fig. 3i). The pDCM has been associated with the presence of an oxygen minimum layer in the ETNP off Mexico that is shallow near the coast and deepens towards oceanic environments (Goericke *et al.* 2000). *Prochlorococcus* was the most important taxon in the water column in the study area. For example, at station 11, DVChl *a* was approximately 60% of the TChl *a* at the surface (fig. 3k). This contribution decreased to 30% in the DCM and increased in deeper waters to 90% (fig. 3g, c). In relation to the photochemical potential of the phytoplankton community in the area, F_v/F_m was below or close to 0.5 in most of the samples (fig. 3b, f, j), and seemed to increase from the surface to deeper waters with values above 0.5 only in the pDCM (fig. 3f, j). The highest variability of F_v/F_m was detected at the surface and close to the DCM samples.

The coast to ocean variation of the phytoplankton community structure and F_v/F_m was analyzed to derive a possible relationship between photosynthetic performance and different environmental conditions. Near the coast (station 1), diatoms dominated the phytoplankton community, while in the oceanic area *Prochlorococcus* and other cyanobacteria contributed 70–80% to TChl *a* (average $\sim 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) (fig. 4a). Prymnesiophytes were the best-represented group of eukaryotes in the oceanic community (fig. 4a). A cross-correlation between the contribution of the different phytoplankton groups to total biomass in the whole area resulted in a positive association among prymnesiophytes and pelagophytes (nonparametric Spearman rank correlation, $r = 0.83$, $P < 0.05$; $n = 60$). There was also a significant correlation between *Prochlorococcus* and cyanobacteria but the strength of the association was not high ($r = 0.5$, $P < 0.05$; $n = 60$). These four groups coexisted in the area, and at the oceanic stations (stations 2–11) we observed a strong negative correlation ($r = -0.78$, $P < 0.05$; $n = 60$) between the prokaryotic and eukaryotic (mainly prymnesiophytes and pelagophytes) components of the phytoplankton. These results indicate that the contribution of these four groups to phytoplankton biomass primarily defines the different phytoplankton communities in the area. Specifically, the phytoplankton community of the DCM was different from that of the surface in the oceanic area. At the surface, the variations in biomass were caused by changes in the relative contribution of pelagophytes and prymnesiophytes ($r = 0.88$, $P < 0.05$; $n = 9$) with concomitant changes in the prokaryotic component of the phytoplankton ($r = -0.88$, $P < 0.05$; $n = 9$). In contrast, the increase in biomass in the DCM was a consequence of the increase in eukaryotic species but not a decrease in prokaryotic biomass ($r = 0.83$; $P < 0.05$; $n = 9$). Therefore, we considered that phytoplankton from the surface, DCM and pDCM in the oceanic area could be regarded as different communities that might present different physiological characteristics.

The surface community was relatively constant in the oceanic region (stations 2–11, fig. 4a); however, F_v/F_m in samples from this depth was highly variable (fig. 4c). In comparison to surface samples, the DCM phytoplankton community was more diverse. The relative contribution to TChl *a* of the eukaryotic phytoplankton was more important in the

fuerte correlación negativa entre la profundidad del pMSC y la distancia a la costa ($r = -0.94$, $P < 0.05$; $n = 9$). El pMSC se detectó en toda el área de estudio excepto en las estaciones 10 y 11 (fig. 3i). El pMSC se ha relacionado con la presencia de la capa del mínimo de oxígeno en el ETNP de México que es somera cerca de la costa y tiende a hacerse más profunda hacia ambientes oceánicos (Goericke *et al.* 2000). *Prochlorococcus* fue el taxón más importante en la columna de agua en el área de estudio. Por ejemplo, en la estación 11, la DVChl *a* constituyó 60% de la TChl *a* en superficie (fig. 3k). Este aporte disminuyó al 30% en el MSC y se incrementó en aguas más profundas donde llegó a ser más del 90% de la TChl *a* (fig. 3g, c). En relación a los valores del potencial fotoquímico de la comunidad de fitoplancton en el área, los valores de F_v/F_m estuvieron por debajo, o cercanos a 0.5 en la mayoría de las muestras (fig. 3b, f, j). F_v/F_m pareció incrementarse de la superficie a aguas profundas con valores por encima de 0.5 sólo en el pMSC. La mayor variabilidad de este parámetro se detectó en la superficie y cercano al MSC.

Para identificar una posible relación entre la eficiencia fotoquímica y las diferentes condiciones ambientales se investigó la variación costa-océano de F_v/F_m y la estructura de la comunidad de fitoplancton. Cerca de la costa las diatomeas dominaron la comunidad de fitoplancton, mientras que en el área oceánica 70–80% de la TChl *a* ($\sim 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ en promedio) estuvo asociada a *Prochlorococcus* y otras cianobacterias (fig. 4a). Las primnesiofitas fueron el grupo de eucariotas mejor representado en las comunidades oceánicas (fig. 4a). Un análisis de correlación entre los grupos de fitoplancton mostró una fuerte asociación entre primnesiofitas y pelagofitas (correlación de Spearman; $r = 0.83$, $P < 0.05$; $n = 60$). Lo mismo se observó para *Prochlorococcus* y cianobacterias, pero la intensidad de esta relación no fue tan alta como la primera ($r = 0.5$, $P < 0.05$; $n = 60$). Estos cuatro grupos coexistieron en el área, y en las estaciones oceánicas (estaciones 2 a 11) se observó una correlación negativa ($r = -0.78$, $P < 0.05$; $n = 60$) entre los componentes procariotas y eucariotas (principalmente primnesiofitas y pelagofitas). Estos resultados indican que la contribución relativa de estos cuatro grupos principales a la biomasa total definen diferentes comunidades de fitoplancton en el área. Específicamente, la comunidad de fitoplancton en el MSC fue diferente a la de la superficie en la zona oceánica. En la superficie la variación de la biomasa fue causada por cambios en la contribución relativa de las pelagofitas y primnesiofitas ($r = 0.88$, $P < 0.05$; $n = 9$) con cambios concomitantes en el componente procariota ($r = -0.88$, $P < 0.05$; $n = 9$). En contraste, el incremento de biomasa en el MSC fue consecuencia del incremento de especies eucariotas y no de la disminución de la biomasa procariota ($r = 0.83$; $P < 0.05$; $n = 9$). Por lo tanto, consideramos que las comunidades de fitoplancton de la superficie, el MSC y el pMSC en el océano pueden ser consideradas comunidades diferentes y, por tanto, deben de poseer distintas características fisiológicas.

La comunidad de fitoplancton en la superficie fue relativamente constante en la región oceánica (estaciones 2 a 11, fig.

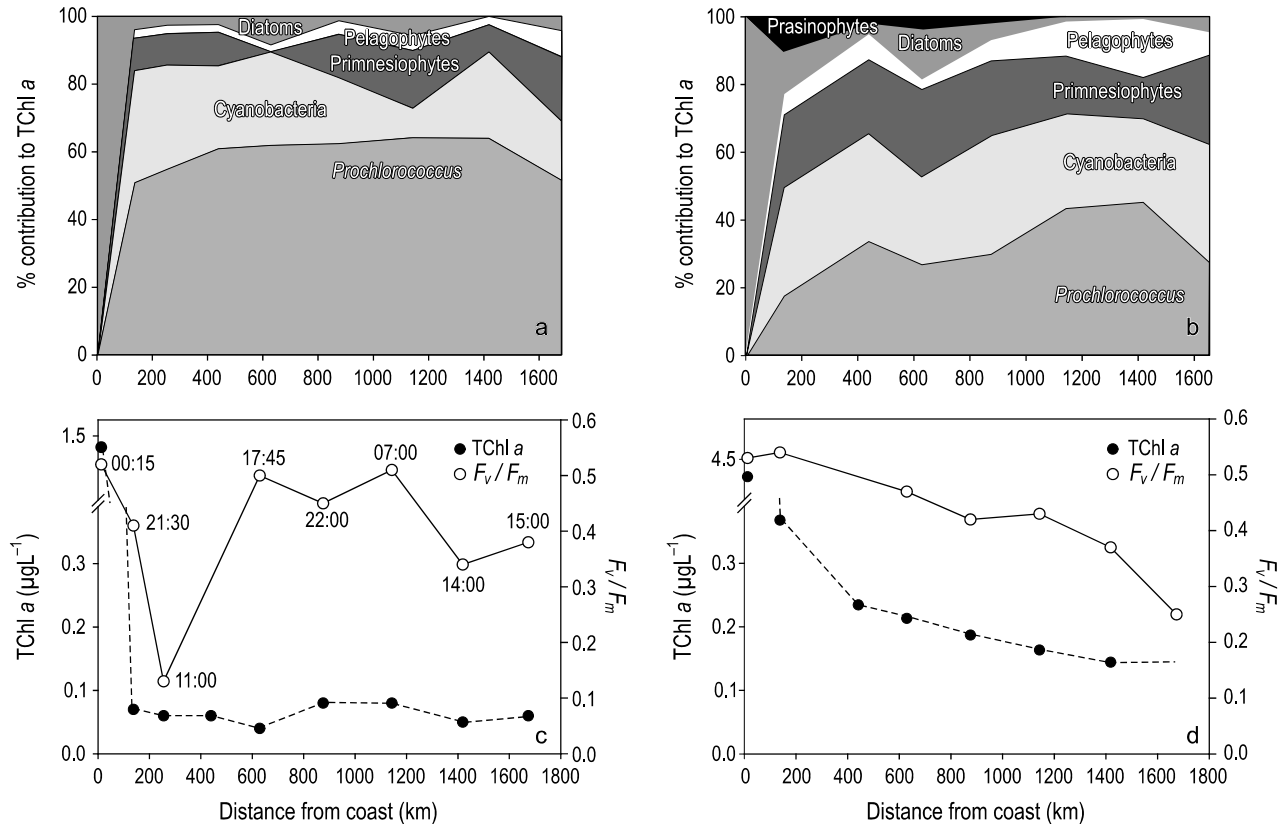


Figure 4. Relative contribution of phytoplankton groups to total chlorophyll *a* (TChl *a*) in surface samples (a) and in deep chlorophyll maximum samples (b) along a coast-to-ocean transect in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico; TChl *a* and F_v/F_m are presented for surface samples (c) and deep chlorophyll maximum samples (d).

Figura 4. Contribución relativa de los grupos de fitoplancton a la TChl *a* en la superficie (a) y en las muestras del máximo subsuperficial de clorofila (b) a lo largo de un transecto costa a océano en el Pacífico Nororiental Tropical mexicano. La TChl *a* y F_v/F_m se presentan para las muestras de superficie (c) y del máximo subsuperficial de clorofila (d).

DCM (fig. 4b). About 30–40% of the TChl *a* was related to prymnesiophytes and pelagophytes, and in less proportion to diatoms and prasinophytes (fig. 4b). In the DCM, high F_v/F_m values were detected close to shore (0.55). The F_v/F_m decreased from the coast to the open ocean (fig. 4d) and the reduction was negatively correlated with the depth of the DCM ($r = -0.81$, $P < 0.05$; $n = 9$).

F_v/F_m diurnal variability

In the surface low values of F_v/F_m were detected in samples collected during light hours (fig. 4b). The diurnal variation of this parameter was therefore monitored at stations 5 and 7 at two different depths. The F_v/F_m changes were similar at both stations. Figure 5 shows the diurnal variation of this parameter observed at station 7. The highest F_v/F_m at the surface was measured at dawn (0.6). The F_v/F_m decreased in the morning hours to the lowest values at noon (0.05) and recovered steadily in the afternoon to about 85% of the value measured at dawn (fig. 5). In contrast, samples collected from 40 m depth showed a midday reduction of only 10% of the F_v/F_m value

4a). Sin embargo, en las muestras obtenidas a esta profundidad F_v/F_m fue altamente variable (fig. 4c). En comparación con las muestras de la superficie, la comunidad del MSC fue más diversa. La contribución relativa del fitoplancton eucariota a la TChl *a* fue más importante en el MSC (fig. 4b). Entre 30% y 40% de la TChl *a* estuvo asociada a prymnesiofitas, pelagofitas y, en menor proporción, a diatomeas y prasinofitas (fig. 4b). En el MSC los valores mayores de F_v/F_m se registraron cerca de la costa (0.55). Por el contrario, los valores más bajos se detectaron en estaciones oceánicas (fig. 4d). F_v/F_m disminuyó de la costa hacia mar abierto (fig. 4d) y esta disminución estuvo correlacionada negativamente con la profundidad del MSC ($r = -0.81$, $P < 0.05$; $n = 9$).

Variabilidad diurna de F_v/F_m

En la superficie se detectaron valores bajos de F_v/F_m en muestras recolectadas durante las horas de luz (fig. 4b). Por lo tanto, la variación diurna de este parámetro fue monitoreada en las estaciones 5 y 7 a dos diferentes profundidades. Los cambios de F_v/F_m fueron similares en ambas estaciones. La figura 5

measured at dawn (fig. 5). The Zea to Chl *a* ratio was significantly higher in the surface (40%) than in the 40-m depth samples (Student's *t*-test, $P < 0.05$), but no changes in the relative concentration of this pigment were detected in either the surface or 40-m depth samples (data not shown). Therefore, the diurnal variation of F_v/F_m was not related to changes in pigment concentration of the phytoplankton community.

Enrichment experiments

The effect of nutrient addition on F_v/F_m and phytoplankton biomass was evaluated. As detected under *in situ* conditions, the variation of F_v/F_m followed a night/day cycle in the enrichment experiments (fig. 6). The midday decrease in F_v/F_m was lower since cells in the experiments were exposed to lower irradiances than in the field. Addition of nitrate to surface samples did not have a noticeable effect on F_v/F_m . There was no increase in the maximum values of F_v/F_m after the addition of nitrate to surface samples and this parameter was never higher than 0.6. In contrast, addition of nitrate to surface samples affected biomass accumulation and phytoplankton community composition. The surface samples used for the enrichment experiments presented low TChl *a* ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$), and prokaryotes represented 80% of this biomass (initial condition, table 1). Addition of nitrate resulted in a TChl *a* increase of 26-fold in experiment 1 and less than 2-fold in experiment 2 (table 1). Prymnesiophytes, pelagophytes but mainly the diatom biomass increased in the samples in which nitrate was added (table 1). This was evident by the increase in fucoxanthin, BF and HF (table 1). Particularly, the concentration of fucoxanthin at the end of the incubation period was 100 and 20 times higher in comparison to the initial condition and control treatment in

muestra la variación diurna de este parámetro observada en la estación 7. El valor más alto de F_v/F_m fue medido al amanecer (0.6). F_v/F_m disminuyó durante la mañana hasta llegar a su valor más bajo medido al mediodía (0.05) y se recuperó paulatinamente durante la tarde hasta alcanzar 85% del valor medido al amanecer (fig. 5). La razón Zea/Chl *a* fue significativamente mayor en la superficie (40%) que en las muestras tomadas a 40 m de profundidad (prueba de *t*, $P < 0.05$), pero no se detectaron cambios en la concentración relativa de este pigmento ni en la superficie ni en las muestras tomadas a 40 m de profundidad (datos no mostrados). Por lo tanto, la variación diurna no estuvo relacionada con cambios en la concentración de pigmentos de la comunidad de fitoplancton.

Experimentos de enriquecimiento

Se evaluó el efecto de la adición de nutrientes sobre F_v/F_m y la biomasa del fitoplancton. Al igual que en las condiciones *in situ*, en los experimentos de enriquecimiento la variación de F_v/F_m siguió un ciclo día-noche (fig. 6). La disminución de F_v/F_m durante el mediodía fue menor ya que las células de los experimentos estuvieron expuestas a menores irradiancias comparadas con las condiciones de campo. La adición de nitrato a las muestras superficiales no tuvo efecto notable en F_v/F_m . No hubo un incremento en los valores máximos de F_v/F_m tras la adición de nitratos a las muestras superficiales y este parámetro nunca fue mayor a 0.6. En contraste, la adición de nitrato a estas muestras afectó la acumulación de biomasa y la composición de la comunidad de fitoplancton. Las muestras superficiales utilizadas para los experimentos de enriquecimiento presentaron concentraciones bajas de TChl *a* ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$), en las que los procariotas representaron 80% de la biomasa. (Condición inicial; tabla 1). La adición de nitrato resultó en un incremento de 26 veces en la TChl *a* en el experimento 1 y en menos de 2 veces en el experimento 2 (tabla 1). La biomasa de las primnesiofitas y pelagofitas, pero principalmente la de las diatomeas, se incrementó en las muestras en las que se añadió nitrato (tabla 1). Esto fue evidente por el incremento de fucoxantina, BF y HF (tabla 1). Particularmente, la concentración de fucoxantina al final del periodo de incubación fue de 100 y 20 veces mayor comparada con la condición inicial y el tratamiento control en los experimentos 1 y 2 respectivamente (tabla 1). En contraste, las concentraciones de Zea y DVChl *a* fueron semejantes entre el control y los tratamientos con nitrato. Por lo tanto, la biomasa de las cianobacterias no se incrementó tras la adición de nitrato.

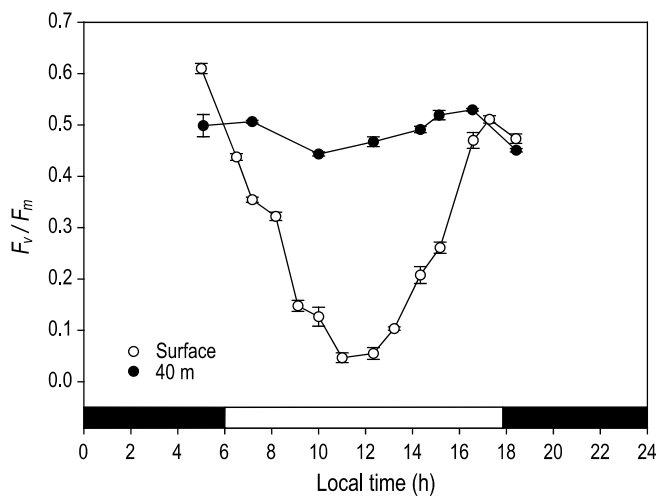


Figure 5. Diurnal variation of F_v/F_m in surface and 40-m depth samples from station 7.

Figure 5. Variación diurna de F_v/F_m en superficie y 40 m de profundidad en muestras de la estación 7.

Discusión

La eficiencia máxima de separación de carga del PSII no es un buen indicador de estrés nutricional en las comunidades de fitoplancton de regimenes oligotróficos debido a que este parámetro mostró una fuerte variabilidad diurna, en especial en las muestras superficiales. Por lo tanto, los valores bajos de F_v/F_m no reflejan necesariamente una limitación de la tasa

experiments 1 and 2, respectively (table 1). In contrast, the *Zea* and DVChl *a* concentration was similar between the control and nitrate treatments. Therefore, the cyanobacterial biomass did not increase after nitrate addition.

Discussion

The maximum efficiency of PSII charge separation is not a good indicator of nutrient stress in oligotrophic phytoplankton communities since this parameter showed a strong diurnal variation especially in surface samples. Therefore, low F_v/F_m values do not necessarily reflect a limitation of the photosynthetic rate of the phytoplankton community associated with nitrate stress. The use of F_v/F_m as a nutrient stress indicator in oceanography is based on the observation that this parameter increases from the surface towards the nutricline (Geider *et al.* 1993a). Also, the decrease of this parameter in surface samples from coast to open ocean has been used to conclude that low values of F_v/F_m indicate nutrient limitation of the photosynthetic rate (Kolber *et al.* 1990, Geider *et al.* 1993a, Falkowski *et al.* 1991, Olaizola *et al.* 1996). However, these studies have not taken into account the diurnal variation of PSII efficiency.

fotosintética de la comunidad de fitoplancton debida al estrés nutricional. El uso de F_v/F_m como indicador de estrés nutricional en estudios oceanográficos se basa en observaciones donde este parámetro se incrementa de la superficie hacia la nutriclina (Geider *et al.* 1993a). De la misma forma, la disminución de F_v/F_m en muestras superficiales en un gradiente costa-océano ha sido usado para concluir que los valores bajos de este parámetro indican limitación por nutrientes de la tasa fotosintética (Kolber *et al.* 1990, Geider *et al.* 1993a, Falkowski *et al.* 1991, Olaizola *et al.* 1996). Sin embargo, estos estudios no toman en cuenta la variación diurna de la eficiencia del PSII. Behrenfeld *et al.* (2006) mostraron que F_v/F_m sigue un ciclo día-noche con una disminución acentuada al mediodía asociada con la respuesta fisiológica del fitoplancton al exceso de luz, y también una disminución durante la noche debida a procesos de respiración. F_v/F_m reflejan la fisiología del fitoplancton; sin embargo, los cambios diurnos de este parámetro deben de ser considerados para hacer inferencias sobre el estrés por nutrientes. Específicamente, el valor más alto al amanecer y su reducción durante la noche define el estado fisiológico de la comunidad de fitoplancton (Behrenfeld *et al.* 2006). Nuestro estudio concuerda con lo reportado por Behrenfeld *et al.* (2006).

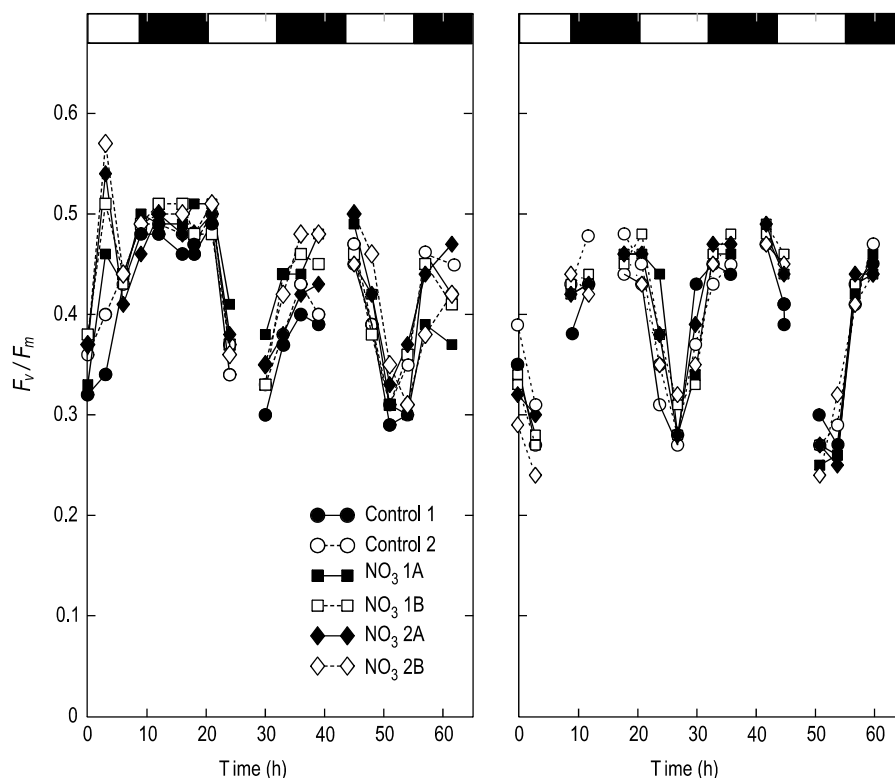


Figure 6. Variation of F_v/F_m in two enrichment experiments. Surface water from station 11 was enriched with 2 μM (treatments 1A and 1B) and 4 μM (treatments 2A and 2B) final concentration of NO_3^- . The control treatment represents a sample maintained under the same conditions as in treatments 1 and 2 but with no addition of nitrate.

Figura 6. Variación de F_v/F_m en dos experimentos de enriquecimiento. Se enriqueció agua superficial de la estación 11 con 2 μM (tratamiento 1A y 1B) y con 4 μM (tratamiento 2A y 2B) de concentración final de NO_3^- . El tratamiento control representa una muestra mantenida en las mismas condiciones de los tratamientos 1 y 2 pero sin adición de nitrato.

Behrenfeld *et al.* (2006) showed that F_v/F_m follows a day/night cycle with a strong depletion at noon associated with the physiological responses of phytoplankton to light, and also a strong depletion at night hours due to respiration processes. The F_v/F_m reflects the physiology of phytoplankton; however, diurnal changes of this parameter have to be considered to determine a nutrient stress condition. Specifically, the highest value at dawn and its reduction during night hours define the physiological status of the phytoplankton community (Behrenfeld *et al.* 2006). Our study agreed with that found by Behrenfeld *et al.* (2006).

The degree of F_v/F_m reduction during light hours was dependent on the irradiance reaching the phytoplankton. With relatively similar community composition, the 40-m depth samples present much lower F_v/F_m decrease at noon than the surface samples. The degree of F_v/F_m decrease at noon related to the submarine light field was also reported by Behrenfeld *et al.* (2006). Although there was a considerable F_v/F_m depletion at noon in surface samples, an almost full recovery of this yield was detected at the end of the day, which indicates that PSII activity is efficiently regulated during light hours. Several processes are involved in the reversible down-regulation of PSII activity. In particular, short-term synthesis of photoprotective carotenoids is one of the most important processes involved in

El grado de reducción de F_v/F_m durante el periodo de luz depende de la cantidad de irradiancia que llega al fitoplancton. Con una composición relativamente similar, la comunidad ubicada a 40 m de profundidad presentó una reducción mucho menor que la superficial durante el mediodía. La disminución de F_v/F_m relacionada con el campo de luz en capas profundas también fue reportado por Behrenfeld *et al.* (2006). Aunque hubo una disminución considerable al mediodía en las muestras superficiales, se detectó una recuperación casi total al final del día, lo que indica que la actividad del PSII está eficientemente regulada durante las horas de luz. Varios procesos están involucrados en la regulación reversible del PSII. Específicamente, la síntesis en corto plazo de carotenoides fotoprotectores es uno de los procesos más importantes relacionados con la regulación del PSII. La acumulación de diatoxantina es la principal estrategia fotoprotectora en comunidades dominadas por diatomeas (Kashino *et al.* 2002). Este no es el caso para regiones oligotróficas donde la comunidad del fitoplancton está dominada por cianobacterias. Específicamente, en el PNOT mexicano 60–80% de la biomasa superficial del fitoplancton estuvo asociada con este grupo (figs. 3, 4). La síntesis a corto plazo de carotenoides fotoprotectores no está presente en las cianobacterias. Por lo tanto, no se esperaba detectar variaciones en el corto plazo en la

Table 1. Pigment concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) and pigment ratios in surface samples from the Eastern Tropical North Pacific off Mexico measured at the beginning and at the end (60 h) of two enrichment experiments. Surface water from station 11 was enriched with 2 μM (treatments 1A and 1B) and with 4 μM (treatments 2A and 2B) final concentration of NO_3^- . The control treatment represents a sample maintained under the same conditions as in treatments 1 and 2 but with no addition of nitrate.

Tabla 1. Concentración de pigmentos ($\mu\text{g L}^{-1}$) y razones pigmentarias en las muestras de superficie del Pacífico Nororiental Tropical de México medidas al comienzo y al final (60 h) de los dos experimentos de enriquecimiento. Muestras de superficie de la estación 11 fueron enriquecidas con 2 μM (tratamiento 1A y 1B) y con 4 μM (tratamiento 2A y 2B) de concentración final de NO_3^- . El tratamiento control representa una muestra mantenida en las mismas condiciones que los tratamientos 1 y 2 pero sin adición de nitrato.

	DVChl <i>a</i>	Chl <i>a</i>	TChl <i>a</i>	Chl <i>a</i> /DVChl <i>a</i>	DVChl <i>a</i> /Zea	Chl <i>a</i> /BF	Chl <i>a</i> /Fuc	Chl <i>a</i> /HF
Experiment 1								
Initial	0.05	0.04	0.09	0.79	0.69	15.97	57.37	5.26
Control	0.03	0.08	0.11	2.39	0.45	5.30	9.60	5.28
NO_3^- 1A (2 μM)	0.05	0.37	0.43	7.01	0.44	10.49	2.39	14.63
NO_3^- 1B (2 μM)	0.05	0.36	0.41	7.52	0.44	26.94	1.36	32.56
NO_3^- 2A (4 μM)	0.06	1.63	1.68	29.61	0.61	46.46	1.60	62.79
NO_3^- 2B (4 μM)	0.05	2.30	2.35	51.66	0.48	43.85	1.63	54.52
Experiment 2								
Initial	0.05	0.04	0.10	0.83	0.75	15.73	50.40	5.30
Control	0.04	0.05	0.09	1.23	0.34	9.32	16.37	5.95
NO_3^- 1A (2 μM)	0.03	0.17	0.19	6.02	0.32	4.61	7.47	4.09
NO_3^- 1B (2 μM)	0.04	0.15	0.19	4.02	0.44	4.77	8.08	4.50
NO_3^- 2A (4 μM)	0.04	0.16	0.19	4.50	0.39	4.67	7.81	5.04
NO_3^- 2A (4 μM)	0.03	0.12	0.15	4.04	0.38	4.21	8.17	5.44

Abbreviations: DVChl *a* = divinyl chlorophyll *a*, Chl *a* = chlorophyll *a*, TChl *a* = total chlorophyll *a* (Chl *a* + DVChl *a*), Zea = zeaxanthin, BF = 19-butanoiloxifucoxanthin, Fuc = fucoxanthin, HF = 19-hexanoiloxifucoxanthin.

PSII regulation. The accumulation of diatoxanthin is the main strategy that allows phytoplankton to perform effective photosynthesis in communities dominated by diatoms (Kashino *et al.* 2002). This is not the case for oligotrophic regions since the phytoplankton community is dominated by cyanobacteria. Specifically, in the ETNP, 60–80% of the surface phytoplankton biomass was associated with this group (figs. 3, 4). Short-term synthesis of photoprotective carotenoids does not occur in cyanobacteria. Therefore, a short-term variation of carotenoid concentration was not expected and was confirmed by the relatively constant Zea to Chl *a* ratio during day hours. However, Zea/Chl *a* was much higher in surface phytoplankton than in deeper phytoplankton. Kana *et al.* (1988) reported that the concentration of Zea is significantly higher in *Synechococcus* acclimated to high light. Also, the increase of Zea in response to high light has been reported for oligotrophic surface communities (Letelier *et al.* 1993, Babin *et al.* 1996) and in *Prochlorococcus* cultures (Bruyant *et al.* 2005). Although the specific role of Zea for PSII regulation (energy quenching) has not been characterized in cyanobacteria, it is clear that carotenoids play an important role in the photoprotection of this group (Kerfeld 2004). Phytoplankton inhabiting oligotrophic regimens must have effective photoprotective mechanisms that down-regulate PSII activity in order to avoid photoinhibition. Recovery from photoinhibition requires *de novo* synthesis of proteins that represents an investment of energy. Therefore, down-regulation of PSII activity (reflected as a low F_v/F_m) does not mean a low photosynthetic potential associated with nutrient stress. One observation that indicates that photosynthesis of phytoplankton from the ETNP was not rate-limited is that there were no significant changes in F_v/F_m after nitrate addition to surface samples. The efficiency of PSII responds immediately to the alleviation of a stress factor. In iron-limited phytoplankton the night drop in F_v/F_m is abolished and dawn values increase immediately upon exposure to this micronutrient (Olson *et al.* 2000, Behrenfeld *et al.* 2006).

The F_v/F_m measured at dawn in surface and 40-m depth samples from the ETNP off Mexico and in the enrichment experiments (between 0.5 and 0.6) are characteristic of what Behrenfeld *et al.* (2006) define as physiological regime I of the tropical Pacific Basin. This regime occurs in oceanographic regions with sufficient iron but low availability of macronutrients. The photosynthetic rate of the phytoplankton community in these regions is not limited since phytoplankters are growing at high rates (Behrenfeld *et al.* 2006). On the other hand, high-nitrate demanding phytoplankton like diatoms and prymnesiophytes are most probably limited in their photosynthetic performance. The species of these groups could have a low photosynthetic yield characteristic of nutrient-stressed cells but since there is low biomass accumulation of these groups in the study zone, the variation of F_v/F_m probably does not reflect the physiological condition of these cells.

For the use of F_v/F_m as a physiological diagnostic tool in oceanography, the phytoplankton community is considered to be an entity composed of organisms that respond equally to

concentración de carotenoides, lo cual se confirma con los valores relativamente constantes de la razón Zea/Chl *a* encontrados a lo largo del día. Sin embargo, esta razón fue mucho mayor en la superficie que en las muestras más profundas. Kana *et al.* (1988) reportaron que la concentración de Zea es significativamente mayor en cultivos de *Synechococcus* aclimatados a luz intensa. También, el incremento de la concentración de Zea como respuesta a una alta intensidad de luz ha sido reportada en comunidades oligotróficas superficiales (Letelier *et al.* 1993, Babin *et al.* 1996) y en cultivos de *Prochlorococcus* (Bruyant *et al.* 2005). Aunque no se ha caracterizado el papel específico del Zea en la regulación de PSII (quenching energético) en cianobacterias, es claro que este carotenoide juega un papel importante en la fotoprotección de este grupo (Kerfeld 2004). El fitoplancton que habita ambientes oligotróficos debe contar con mecanismos efectivos de fotoprotección para regular la actividad de PSII y evitar la fotoinhibición. Para recuperarse de la fotoinhibición los organismos requieren síntesis *de novo* de proteínas, lo que representa una inversión energética importante. Por lo tanto, la regulación de la actividad del PSII (reflejado en los valores bajos de F_v/F_m) no significa que el potencial fotoquímico esté asociado con estrés nutricional. Una observación que corrobora que la fotosíntesis del fitoplancton en el PNOT no está limitada por nitratos es la ausencia de cambios en F_v/F_m después de la adición de este nutriente a las muestras superficiales. La eficiencia del PSII responde inmediatamente a la mitigación del factor de estrés. Por ejemplo, en comunidades de fitoplancton limitadas por hierro, la caída nocturna de F_v/F_m se revierte y su valor se incrementa inmediatamente después de incorporar este micronutriente (Olson *et al.* 2000, Behrenfeld *et al.* 2006).

Los valores de F_v/F_m medidos antes del amanecer y al atardecer en las muestras superficiales del PNOT; los obtenidos a 40 m de profundidad y los medidos en los experimentos de enriquecimiento (entre 0.5 y 0.6) son característicos de lo que Behrenfeld *et al.* (2006) definieron como el régimen fisiológico I de la cuenca del Pacífico Tropical. Este régimen está presente en regiones oceanográficas con suficiente hierro disuelto pero poca disponibilidad de macronutrientes. La tasa fotosintética de la comunidad de fitoplancton en estas regiones no está limitada ya que las microalgas presentan tasas de crecimiento altas (Behrenfeld *et al.* 2006). Por otra parte, las células con altos requerimientos específicos de nitrato como las diatomeas y prymnesiofitas si pueden sufrir limitación en su eficiencia fotosintética por falta de este nutriente. Lo anterior puede explicar la baja acumulación de biomasa de estos grupos en la zona de estudio donde las variaciones en F_v/F_m probablemente no reflejen las condiciones fisiológicas de tales células.

El uso de F_v/F_m como herramienta diagnóstica en oceanografía supone que la comunidad de fitoplancton es considerada una entidad compuesta por organismos que responden en forma homogénea a las restricciones ambientales. Sin embargo, dicha comunidad es un grupo diverso compuesto por microalgas pertenecientes a varios linajes evolutivos. Por lo tanto, la estructura de la comunidad puede jugar un papel

environmental constraints. The phytoplankton community is a diverse group composed of microalgae belonging to several phyla. Therefore, community structure may play an important role in maximum F_v/F_m values and the variation of this parameter must be associated with the differential response of the phytoplankters of the community. For example, in cyanobacteria F_v/F_m is never higher than 0.45 and the fluorescence yields (maximum and minimum fluorescence) depend on the association of their main antenna complexes (phycobilisomes) either to PSII or PSI (Campbell *et al.* 1998). Furthermore, in prokaryotic algae, respiration and photosynthetic electron transport chains are coupled, which greatly affects the redox state of the PQ pool that will directly affect the fluorescence of PSII (Campbell *et al.* 1998, Kolber and Falkowski 1993). Therefore, in mixed phytoplankton communities a F_v/F_m lower than 0.75 (for PAM protocols) does not necessarily indicate a reduction of PSII efficiency. Low values might reflect a significant contribution of groups with low F_v/F_m to the fluorescence signal. In fact, F_v/F_m values reported for natural communities are never as high as the ones reported for phytoplankton cultures (Bergmann *et al.* 2002, Gervais *et al.* 2002, Kashino *et al.* 2002).

In conclusion, in the ETNP dominated by autotrophic prokaryotes, maximum F_v/F_m at dawn and the insensitivity of this parameter to nutrient addition indicate that surface prokaryotes were not limited by the environmental conditions present in the ETNP. In contrast, these conditions limit the biomass accumulation of high-nitrate demanding species such as diatoms. The maximum efficiency of PSII might reflect the physiological status of the community to environmental conditions. However, the diurnal changes observed during light hours and the variation associated with a different composition of the phytoplankton community limit the use of active fluorescence as a nutrient-diagnostic tool.

Acknowledgements

The authors thank CONACYT for the scholarship granted to A Almazán, and to R Goericke from Scripps Institution of Oceanography and the crew of the R/V *New Horizon* for their collaboration and support.

References

- Babin M, Morel A, Claustre H, Bricaud A, Kolber Z, Falkowski PG. 1996. Nitrogen- and irradiance-dependent variations of the maximum quantum yield of carbon fixation in eutrophic, mesotrophic and oligotrophic marine systems. *Deep-Sea Res. I* 43: 1241–1271.
- Behrenfeld JM, Worthington K, Sherrell MR, Chavez PF, Strutton P, McPhaden M, Shea DM. 2006. Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics. *Nature* 442: 1025–1028.
- Bergmann T, Richardson TL, Pearl HW, Pinckney JL, Schofield O. 2002. Synergy and nutrients on the photosynthetic efficiency of phytoplankton populations from the Neuse River Estuary, North Carolina. *J. Plankton Res.* 24: 923–933.
- importante en los valores máximos de F_v/F_m , y la variación de este parámetro debe estar asociada con la respuesta diferencial de los fitoplanctones en la comunidad. Por ejemplo, en las cianobacterias F_v/F_m nunca es mayor de 0.45 y las eficiencias de fluorescencia (máxima y mínima) dependen de la asociación de los principales complejos antena (ficobilisomas) ya sea al PSII o PSI (Campbell *et al.* 1998). Además, en las algas procariontas la respiración y la cadena fotosintética de transporte de electrones están acopladas, lo que afecta el estado redox del conjunto de PQ, y éste a su vez incide directamente en los valores de fluorescencia del PSII (Campbell *et al.* 1998, Kolber y Falkowski 1993). Por lo tanto, en comunidades mixtas de fitoplancton las estimaciones de F_v/F_m menores a 0.75 (para protocolos PAM) no necesariamente indican una disminución en la eficiencia del PSII. Valores bajos pueden reflejar una contribución significativa de grupos con bajo F_v/F_m a la señal de fluorescencia. De hecho, los valores de F_v/F_m reportados para comunidades naturales nunca son mayores a los reportados en cultivos (Bergmann *et al.* 2002, Gervais *et al.* 2002, Kashino *et al.* 2002).
- En conclusión, en las comunidades de fitoplancton de la región del PNOT mexicano, dominadas por autótrofos procariontas, el F_v/F_m máximo medido al amanecer y la insensibilidad de este parámetro a la adición de nitratos, indican que las células procariontas no presentaron características de limitación por las condiciones ambientales presentes. En contraste, las condiciones del PNOT limitan la acumulación de biomasa de especies cuyos requerimientos metabólicos de nitrato son mayores, tales como las diatomeas. La eficiencia máxima del PSII puede reflejar el estado fisiológico de la comunidad a las condiciones ambientales. Sin embargo, los cambios diurnos observados durante las horas de luz y la variación asociada con diferentes comunidades del fitoplanctónicas limitan el uso de la fluorescencia activa como herramienta diagnóstica de estrés nutricional.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT la beca otorgada a A Almazán, y al Dr. Ralph Goericke de SIO y la tripulación del B/O *New Horizon* por su apoyo y colaboración.

- Bruyant F, Babin M, Genty B, Prasil O, Behrenfeld JM, Claustre H, Bricaud A, Garaczarek L, Holtzendorff J, Koblizek M, Dousova H, Partensky F. 2005. Diel variations in the photosynthetic parameters of *Prochlorococcus* strain PCC 9511: Combined effects of light and cell cycle. *Limnol. Oceanogr.* 50: 858–863.
- Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Oquist G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimatation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 667–683.
- Colombo-Pallota MF, García-Mondoza E, Ladah LB. 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *J. Phycol.* 42: 1225–1234.
- Falkowski PG, Ziemann D, Kolber Z, Bienfang PK. 1991. Nutrient pumping and phytoplankton response in a subtropical mesoscale eddy. *Nature* 352: 55–58.

- Geider RJ, Green RM, Kolber ZS, MacIntyre HL, Falkowski PG. 1993a. Fluorescence assessment of the maximum quantum yield efficiency of photosynthesis in the western North Atlantic. *Deep-Sea Res.* 40: 1205–1224.
- Geider R, La Roche JR, Greene M, Olaizola M. 1993b. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29: 755–756.
- Gervais F, Riebsell U, Gurbonov M. 2002. Changes in primary productivity and chlorophyll *a* in response to iron fertilization in the Southern Polar Frontal Zone. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1324–1335.
- Goericke R, Olson RJ, Shalapyonok A. 2000. A novel niche for *Prochlorococcus* sp. in low-light suboxic environments in the Arabian Sea and the Eastern Tropical North Pacific. *Deep-Sea Res.* 47: 1183–1205.
- Greene RM, Kolber ZS, Swift DG, Tindale NW, Falkowski PG. 1994. Physiological limitation of phytoplankton photosynthesis in the eastern equatorial Pacific determined from variability in the quantum yield of fluorescence. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1061–1074.
- Kana TM, Gilbert PM, Goericke R, Welschmeyer A. 1988. Zeaxanthin and B-carotene in *Synechococcus* WH 7803 respond different to irradiance. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1623–1327.
- Kashino Y, Kudoh S, Hayashi Y, Suzuki Y, Odate T, Hirakawa T, Satoh K, Fukuchi M. 2002. Strategies of phytoplankton to perform effective photosynthesis in North Water. *Deep-Sea Res.* 49: 5049–5061.
- Kerfeld CA. 2004. Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria. *Photosynthesis Res.* 81: 215–225.
- Kolber Z, Falkowski PG. 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1646–1665.
- Kolber Z, Wyman KD, Falkowski PG. 1990. Natural variability in photosynthetic energy conversion efficiency: A field study in the Gulf of Maine. *Limnol. Oceanogr.* 35: 72–79.
- Kromkamp CJ, Forster RM. 2003. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: Differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *Eur. J. Phycol.* 38: 103–112.
- Legendre L, Rassoulzadegan F, Michaud J. 1999. Identifying the dominant processes (physical versus biological) in pelagic marine ecosystems from field chlorophyll *a* and phytoplankton production. *J. Plankton Res.* 21: 1643–1658.
- Letelier RM, Bidigare RR, Henbel DV, Ondrusek M, Winn CD, Karl DM. 1993. Temporal variability of phytoplankton community based on pigment analysis. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1420–1437.
- López-Calderón J, Manzo-Monroy H, Santamaría-del-Ángel E, Castro R, González-Silvera A, Millán-Núñez R. 2006. Mesoscale variability of the Mexican Tropical Pacific using TOPEX and SeaWiFS data. *Cienc. Mar.* 32: 539–549.
- Mackey MD, Mackey DJ, Higgins HW, Wright S. 1996. CHEMTAX, a program for estimating class abundances from chemical markers: Application to HPLC measurements of phytoplankton pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144: 265–283.
- Olaizola M, Geider RJ, Harrison WG, Graziano LM, Ferrari GM, Schlittenhardt PM. 1996. Synoptic study of variations in the fluorescence-based maximum quantum yield efficiency of photosynthesis across the North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 41: 755–765.
- Olson RJ, Sosik HM, Chekalyuk AM, Shalapyonok A. 2000. Effects of iron enrichment on phytoplankton in the Southern Ocean during late summer: Active fluorescence and flow cytometric analyses. *Deep-Sea Res.* 47: 3181–3200.
- Parkhill JP, Maillet G, Cullen JJ. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PS II as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.* 37: 517–529.
- Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R. 2005. Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Mar. Biol.* 146: 1063–1073.
- Schlüter L, Møhlenberg F, Havskum H, Larsen S. 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: Testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll *a* ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192: 49–63.
- Van Heukelem L, Thomas CS. 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with application to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J. Chromatogr.* 910: 31–49.
- Wright S, Mantoura RFC. 1997. Guidelines for collection and pigment analysis of marine samples. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright S (eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO, Paris, pp. 429–445.

*Recibido en diciembre de 2006;
aceptado en noviembre de 2007.*