



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



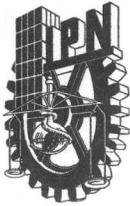
**VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA TRAMA
TRÓFICA MICROBIANA EN LA LAGUNA DE
MACAPULE, SINALOA**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA:

CRISTIAN HAKSPIEL SEGURA

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA TRAMA TRÓFICA
MICROBIANA EN LA LAGUNA DE MACAPULE, SINALOA”**

Presentada por el alumno:

HAKSPIEL
Apellido paterno

SEGURA
materno

CRISTIAN
nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 7 | 1 | 1 | 9 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DRA. AIDA MARTÍNEZ LÓPEZ

PRESIDENTE

MC. ROXANA DE SILVA DÁVILA

SECRETARIO

MC. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCÍA

SEGUNDO VOCAL

DRA. BÁBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2°. DIRECTOR

TERCER VOCAL

DRA. MELINA LÓPEZ MEYER

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**IPN
CICIMAR
DIRECCION**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 17 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe BIOL. CRISTIAN HAKSPIEL SEGURA alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B071199 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. AÍDA MARTÍNEZ LÓPEZ y
DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA y ceden los derechos del trabajo titulado:
"VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA TRAMA TRÓFICA MICROBIANA
EN LA LAGUNA DE MACAPULE, SINALOA".
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: amartin@ipn.mx bgonzal@ipn.mx hakspiel7apsalon@hotmail.com
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIOL. CRISTIAN HAKSPIEL SEGURA

nombre y firma

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico muy especialmente a la mujer que más me ama, que nunca deja pensar en mí, que me encomienda a Dios cada día de su vida, aquella que aún sin pedírselo sigue luchando solo para que yo pueda realizarme como un hombre de bien.

Mamá tienes toda mi admiración y para ti es cada triunfo de mi vida.

A mis hermanitos adorados Erika y Yorgen.

Gracias por cuidarme y estar ahí de corazón cuando más los necesito.

A mi abuelita y a Tanza cuya generosidad y amor desinteresado ha sido un ejemplo para mí.

A todas mis tías y primos.

A mi abuelo Herman por cultivar en mí el amor por las ciencias naturales

A mis compañeros del postgrado.

A mis amistades paceñas y colombianas.

AGRADECIMIENTOS

*Esta tesis no podría haber sido realizada sin la confianza que plantaron ciegamente la **Dra. Aída Martínez López** y la **Dra. Bárbara González Acosta** en este extraño que vino desde tan lejos. Aprovecho esta oportunidad para dar gracias a ambas por todos los conocimientos que me aportaron, el apoyo logístico y técnico, el tiempo invertido, pero sobretodo por el cariño y la fuerza moral que me transmitieron para seguir adelante frente a todas las dificultades.*

A los miembros del comité revisor integrado por la M.C. Roxana de Silva Dávila, la Dra. Melina López Meyer y el M.C. Ricardo Palomares García por todos sus comentarios y sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de este documento.

Al apoyo desinteresado del Dr. Gerardo Verdugo por enriquecer y perfeccionar este trabajo.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR-IPN y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIDIIR-IPN, Unidad Sinaloa, por las facilidades otorgadas en el uso de las instalaciones y equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para finalizar mis estudios.

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado al proyecto SIP por la beca PIFI y el apoyo COFFA, los cuales permitieron además de la realización de este trabajo, su difusión en eventos regionales, nacionales e internacionales.

Agradezco muy especialmente a la doctora en proyecto Diana Escobedo Urías; esta tesis no habría podido ser realizada sin su apoyo, información, comentarios y consejos. Aprecio mucho lo buena compañera que es, así como su contribución a mi formación en la maestría. Recordaré con agrado nuestras enriquecedoras charlas, que en ocasiones dieron pie a más especulaciones que a respuestas.

A Yuri y a la MC. Ana Elsi Ulloa Pérez por su apoyo logístico en los muestreos y procesamiento de muestras, así como a su amable atención durante mis estancias en el Laboratorio de Medio Ambiente del CIIDIR-Unidad SINALOA.

A la Dra. Melina López Meyer y al Dr. Nacho por su asesoría y gentileza durante mis estancias en el Laboratorio del CIIDIR-Unidad SINALOA. Agradezco también a sus hijos por recordarme que sigo siendo niño.

A todas las chicas y muchachos que me ayudaron e hicieron agradable mi estancia en Guasave en especial al McS. Juan Carlos. Lucky y Cia. Ltda.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, así como al Dr. Norberto Vibanco y al Ing. Alejandro Vásquez por el apoyo logístico y técnico y su colaboración en la resolución de algunos cuestionamientos de este trabajo de tesis.

A mis hermanas adoptivas Irela, Magdalena y Citlalli por su tolerancia, ayuda y comentarios alentadores.

Todá Rabá

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| RELACIÓN DE TABLAS..... | VIII |
| RELACIÓN DE FIGURAS | IX |
| I INTRODUCCIÓN..... | - 1 - |
| II ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN..... | - 6 - |
| III OBJETIVOS | - 13 - |
| III.1 Objetivos generales..... | - 13 - |
| III.2 Objetivos específicos | - 13 - |
| IV HIPÓTESIS | - 14 - |
| V ÁREA DE ESTUDIO..... | - 15 - |
| VI MATERIALES Y MÉTODOS | - 17 - |
| VI.1 Trabajo de campo | - 17 - |
| VI.2 Trabajo de laboratorio | - 19 - |
| VI.2.1 Determinación de nutrientes | - 19 - |
| VI.2.2 Recuento total de Microorganismos..... | - 19 - |
| VI.3 Análisis de datos | - 32 - |
| VII RESULTADOS..... | - 35 - |
| VII.1 Variables ambientales | - 35 - |
| VII.1.1 Datos meteorológicos | - 35 - |
| VII.1.2 Hidrografía | - 38 - |
| VII.1.3 Medio físico-químico | - 38 - |
| VII.1.4 Nutrientes inorgánicos disueltos | - 41 - |
| VII.1.5 Nutrientes orgánicos disueltos | - 44 - |
| VII.1.6 Nitrógeno y Fósforo total..... | - 45 - |

| | | |
|----------|--|---------|
| VII.2 | Densidad de componentes microbianos..... | - 46 - |
| VII.2.1 | Virioplancton, bacterioplancton y picoplancton autótrofo..... | - 46 - |
| VII.2.2 | Nanoplancton autótrofo y heterótrofo..... | - 48 - |
| VII.3 | Densidad de componentes microplanctónicos | - 50 - |
| VII.3.1 | Microfitoplancton | - 50 - |
| VII.3.2 | Grupo Ciliophora | - 52 - |
| VII.3.3 | Otros grupos microzooplanctónicos..... | - 53 - |
| VII.4 | Contribución de los componentes fotosintéticos | - 54 - |
| VII.4.1 | Clorofila a..... | - 54 - |
| VII.5 | Relaciones entre los componentes planctónicos..... | - 57 - |
| VII.5.1 | Control viral | - 57 - |
| VII.5.2 | Depredación por nanozooplancton | - 57 - |
| VII.5.3 | Depredación por ciliados heterótrofos | - 60 - |
| VII.6 | Influencia de las variables ambientales sobre los componentes microbianos y microplanctónicos | - 61 - |
| VII.7 | Detección del WSSV | - 67 - |
| VII.7.1 | Resultados preliminares del PCR sencillo y anidada en una muestra de agua de un estanque infectado durante un evento infeccioso en junio de 2007..... | - 67 - |
| VII.7.2 | Detección del WSSV por PCR anidada en las muestras de agua de la Laguna de Macapule y en los sitios de muestreo de la granja Doña Juana (diciembre de 2007 – diciembre de 2008)..... | - 68 - |
| VII.7.3 | Detección cuantitativa y semi-cuantitativa de WSSV a partir de los extractos de algunas muestras del estanque y reservorio..... | - 73 - |
| VIII | DISCUSIÓN..... | - 76 - |
| VIII.1 | Componentes planctónicos y variabilidad ambiental..... | - 76 - |
| VIII.1.1 | Periodo frío | - 79 - |
| VIII.1.2 | Periodo cálido..... | - 82 - |
| VIII.2 | Interacciones entre componentes microbianos | - 102 - |
| VIII.2.1 | Mixotrofia..... | - 102 - |

| | | |
|----------|---|---------|
| VIII.2.2 | Componentes autotróficos..... | - 107 - |
| VIII.2.3 | Otras relaciones tróficas..... | - 113 - |
| VIII.3 | Detección del WSSV en componentes planctónicos..... | - 125 - |
| VIII.3.1 | Detección por PCR..... | - 127 - |
| VIII.3.2 | Posibles relaciones del WSSV con fracciones planctónicas..... | - 131 - |
| IX | CONCLUSIONES..... | - 136 - |
| X | RECOMENDACIONES..... | - 138 - |
| XI | BIBLIOGRAFÍA..... | - 139 - |
| XII | ANEXOS..... | - 183 - |

RELACIÓN DE TABLAS

- Tabla 1. Oligonucleótidos usados para PCR sencillo y anidada. F y R se refieren al sentido de los oligonucleótidos; F (Forward, sentido); R (Reverse, antisentido). - 25 -
- Tabla 2. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de ADN bacteriano (control) y del WSSV. - 26 -
- Tabla 3. Porcentajes de la varianza explicada y acumulada de los primeros tres ejes de ordenación obtenidos del ACC a partir de los datos del estero El Tortugón, la boca de Macapule y el total de datos de la Laguna de Macapule. * Según la prueba de Montecarlo no hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel del 95% ($p > 0.05$). VE: Varianza explicada. VA: Varianza acumulada. - 62 -
- Tabla 4. Resumen de resultados de los métodos de detección y cuantificación por PCR para WSSV (PCR anidada y en tiempo real) empleados en algunas muestras de agua fraccionadas del evento infeccioso en junio de 2007 y durante el ciclo de muestreo diciembre de 2007-diciembre de 2008. (M) Microplancton; (N) Nanoplancton; (P) picoplancton. - 75 -
- Tabla 5. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de nanofitoplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado. - 108 -
- Tabla 5. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de picoplancton autótrofo en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado. - 109 -
- Tabla 7. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de virioplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado..... - 115 -
- Tabla 8. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de bacterioplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado. - 121 -
- Tabla 9. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de nanozooplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado. - 122 -
- Tabla 10. Valores de profundidad total y disco Secchi, irradiancia solar, cociente de atenuación de la luz y profundidad de capa fótica para cada sitio de muestreo en la Laguna de Macapule durante diciembre de 2007 – diciembre de 2008..... - 184 -
- Tabla 11. Detección y cuantificación de ADN de WSSV por PCR anidada y en tiempo real de muestras de tejido de camarón. * Obtenido a partir de la mezcla de pleópodos de los animales 154, 190 y 272. (+) Positivo. (-) Negativo. N.D. No hay dato. - 185 -
- Tabla 12. Valores promedio mensuales de abundancia de PSV, PT (BP+PA), BP, PA, NF y NZ para cada sitio de muestreo (Reservorio y estanque tipo) en la granja camaronícola Doña Juana durante diciembre de 2007 – diciembre de 2008..... - 188 -

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Inclusión de la participación de los virus en el modelo del bucle microbiano (Microbial Loop) (Tomado y modificado de Wommack & Colwell, 2000). MOD: Materia orgánica disuelta..... - 9 -

Figura 2. Sitios de colecta de muestras para este estudio dentro de la Laguna de Macapule (1 y 2) y complejo camaronero (3 y 4). 1. Boca norte laguna (25.37° N y 108.74° W). 2. Estero El Tortugón (25.39° N y 108.67° W). 3. Reservorio. 4. Estanque camaronero. - 15 -

Figura 3. Periodicidad de los muestreos en sus respectivas estaciones. - 17 -

Figura 4. Productos de PCR de muestras con diferente grado de infección y estándares de concentración de ADN de WSSV amplificados por el método IQ₂₀₀₀TM para PCR semi-cuantitativo (Tomado de manual del kit IQ₂₀₀₀TM)..... - 31 -

Figura 5. Curva de calibración de estándares de concentración conocida (100.000, 10.000 y 1000 copias de ADN· μL^{-1}). Ct: (Threshold cycle) número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral de detección. Log Co: logaritmo de la concentración de ADN. - 33 -

Figura 6. Variación temporal de a) Precipitación de agua e irradiancia solar y b) Temperatura del aire y humedad relativa entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Los valores de temperatura ambiental, humedad relativa e irradiancia son promedios mensuales; los de precipitación corresponden a niveles acumulados mensuales. Datos proporcionados por las estaciones meteorológicas Las Glorias (CIAD-Mazatlan) y El Tortugón (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa)..... - 36 -

Figura 7. Variación temporal de la velocidad y dirección de los vientos en la zona de estudio entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Noroeste (NO); suroeste (SO); suroeste (SE); noreste. Datos proporcionados por las estaciones meteorológicas Las Glorias (CIAD-Mazatlan), CNA Guasave y El Tortugón (CIIDIR-Sinaloa). - 37 -

Figura 8. Variación temporal de: a) temperatura; b) pH, c) salinidad; d) profundidad del disco Secchi; e) concentración de oxígeno y f) porcentaje de saturación de oxígeno en las estaciones del estero El Tortugón y la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. - 40 -

Figura 9. Variación temporal de: a) Amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) + nitrato (NO_3^-), Nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y urea; b) fosfatos (PO_4^-) y ácido silícico (SiO_3^-); c) Proporciones N:P y N:Si. d. Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (PT) en el estero El Tortugón y la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. N.D.= No hay dato. - 43 -

Figura 10. Variación temporal de la fracción del Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (FT) libre de las porciones inorgánicas disueltas (NID y FID) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. - 46 -

| | |
|---|--------|
| Figura 11. Variación temporal de la densidad de virioplancton (PSV), bacterioplancton (BP) y picoplancton autótrofo (PA) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 47 - |
| Figura 12. Variación temporal de la densidad de nanofitoplancton (NF) y nanozooplancton (NZ) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 49 - |
| Figura 13. Variación temporal de la densidad de los componentes microfitoplanctónicos en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 51 - |
| Figura 14. Variación temporal densidad de los ciliados autótrofos (CA), ciliados heterótrofos autotróficos (CH) y otros grupos microzooplanctónicos (MZ) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 53 - |
| Figura 15. Variación temporal de la clorofila <i>a</i> y la contribución porcentual de los componentes autotróficos (PA, NF y MF) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 55 - |
| Figura 16. Variación temporal de la densidad de los componentes autotróficos (PA; NF y MF) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 56 - |
| Figura 17. Variación temporal de las razones virus:microorganismo (V:BP, V:P _A y V:N _F) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 57 - |
| Figura 18. Variación temporal de las razones bacterioplancton:nanozooplancton (RBN _Z) y razones picoplancton autótrofo:nanozooplancton (P _A N _Z) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 58 - |
| Figura 19. Variación temporal de las razones nanofitoplancton:nanozooplancton (RN _F N _Z) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule (b) entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 59 - |
| Figura 20. Variación temporal de las razones microorganismo:ciliados heterótrofos (BP:CH, PA:CH y NF:CH) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule (b) entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar. | - 60 - |
| Figura 21. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los meses de muestreo (triángulos azules) y las variables ambientales (vectores) en el espacio del primer y tercer ejes de ordenación para la Laguna de Macapule. E1 y E2 hacen referencia al estero El Tortugón y la Boca de Macapule, respectivamente. | - 63 - |
| Figura 22. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los grupos microbianos y microplanctónicos (puntos azules) y las variables ambientales | |

(vectores) en el espacio de los dos primeros ejes de ordenación para (a) el estero El Tortugón (b) y la boca de Macapule. - 65 -

Figura 23. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los grupos microbianos y microplanctónicos (puntos azules) y las variables ambientales (vectores) en el espacio del primer y tercer ejes de ordenación para (a) el estero El Tortugón (b) y la boca de Macapule. - 66 -

Figura 24. (a) Productos de PCR sencillo (oligonucleótidos: wssv1out/wssv2out) de extractos de DNA obtenidos de diferentes fracciones planctónicas de una muestra de agua colectada en el estanque de cultivo durante evento infeccioso en junio de 2007. Carril (1) 1-20 µm; (2, 3 y 4) 0.2-1 µm; (5 y 6) 20 µm; (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracto de DNA de camarón infectado con WSSV); (+b) Control positivo (reacción de PCR sencilla positiva a WSSV); (-) Control negativo (en la reacción se sustituyó el DNA por agua ultrapura). (b) Productos de PCR anidado. Se usó como templado 1 µl de la reacción de PCR sencillo correspondiente. Los carriles están acomodados de acuerdo al panel superior. Las flechas negras indica la posición en el gel de los productos de PCR esperados. Datos no mostrados para la fracción 0.02 µm. - 67 -

Figura 25. Productos de PCR sencillo amplificados con oligonucleótidos de procariotas (F2C/C) en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante diciembre de 2007 y julio de 2008. (1Kb) Marcador molecular; Control positivo (extracción DNA de bacteria) (+a) y (+b); Control negativo (agua ultrapura) (-). (M) Microplancton; (N) Nanoplancton; (P) Picoplancton; (F) Femtoplancton. Las flechas negras indican la posición en el gel de los productos de PCR esperados. - 69 -

Figura 26. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante diciembre de 2007 y julio de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV); (-) Control negativo (agua ultrapura). Las flechas blancas indican la posición en el gel de los productos de PCR esperados. - 70 -

Figura 27. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante agosto de 2007 y diciembre de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV +); (-) Control negativo (agua ultrapura). La flecha blanca indica la posición en el gel del producto de PCR esperado. - 71 -

Figura 28. (a) Productos de PCR sencillo (oligonucleótidos: wssv1out/wssv2out) de extractos de DNA obtenidos de las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de agua del estero El Tortugón (con y sin inóculo de WSSV) concentradas por ultra-filtración durante marzo de 2009. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracto de DNA de camarón infectado con WSSV); (+b) Control positivo (reacción de PCR sencilla positiva a WSSV); (-) Control negativo (en la reacción se sustituyó el DNA por agua ultrapura). (b) Productos de PCR anidado. Se usó como templado 1 µl de la reacción de PCR sencillo. La flecha blanca indica la posición en el gel del producto de PCR esperado. (Ac NH₄) Muestras con extracción de ADN con acetato de amonio. - 72 -

Figura 29. Productos de anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante agosto de 2007 y diciembre de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV +); (-) Control negativo (agua ultrapura). - 73 -

Figura 30. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en extractos de tejido camarón infectado y en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación del WSSV (*). (M2) Marcador molecular 1Kb; (+) Control positivo; (-) Control negativo (agua ultrapura). - 186 -

Figura 31. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) y semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀) para detección de WSSV en extractos de tejido camarón infectado. (M1) Marcador molecular IQ₂₀₀₀; (M2) Marcador molecular 1Kb; (+) Control positivo para IQ₂₀₀₀; (+54) Control positivo (camarón confirmado por IQ₂₀₀₀); (-) Control negativo (agua ultrapura). - 187 -

Figura 32. Productos de PCR anidada semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀) para detección de WSSV en extractos de tejido de camarón infectado y en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación del WSSV (*). (M1) Marcador molecular IQ₂₀₀₀; (+) Control positivo para IQ₂₀₀₀; (-) Control negativo (agua ultrapura). - 187 -

Figura 33. Variación temporal de la densidad de virioplancton (PSV) y picoplancton total (PT) en las estaciones del reservorio (a) y el estanque de cultivo (b) de la granja camaronícola Doña Juana entre marzo y octubre de 2008. Las barras de error indican el error estándar. - 189 -

GLOSARIO

Antropogénico: hace relación a algo de origen humano o derivado de sus actividades.

Autotrófico: se dice del tipo de metabolismo en el cual la fuente de Carbono es inorgánica y la fuente de energía es solar o derivada de alguna sustancia inorgánica.

Buferización del fósforo: es el conjunto de mecanismos involucrados en el mantenimiento y equilibrio de las concentraciones de fósforo inorgánico disuelto en los sistemas acuáticos. Este implica la movilización de fósforo del sedimento a la columna de agua por procesos de adsorción-absorción y desorción.

Cianófago: virus que infecta cianobacterias.

Ciclo lítico: en esta fase el ADN viral forma parte del material genético de la célula hospedera y es capaz de tomar el control, fabricar más virus e inducir la lisis celular para la liberación de las partículas virales.

Ciclo lisogénico: es cuando el ADN viral inyectado a la célula huésped permanece inactivo por un cierto tiempo, hasta que un apropiado evento celular dispara el proceso lítico nuevamente. En este ciclo la célula huésped no es destruida, pero el ADN viral prevalece en un sitio en el cromosoma o como material extra-cromosómico.

Bacterioplancton: procariontes heterotróficos (arqueas y bacteria) planctónicos. En su mayoría está compuesto por organismos del picoplancton.

Bacteriófago: virus que infecta bacterias y arqueas.

Bacteriovoría: consumo de procariontes heterotróficos para suplir los requerimientos nutricionales. Protistas heterotróficos, mixótrofos fagotróficos, algunos organismos mesozooplanctónicos y filtradores son generalmente los principales bacterióvoros.

Eutrofización: proceso natural o inducido antropogénicamente, el cual implica un incremento acelerado de la tasa de producción de materia orgánica por organismos autótrofos. Este proceso está mediado en gran parte por el incremento en la concentración de nutrientes inorgánicos y orgánicos, y sus efectos tienden a disminuir la calidad física, química y biológica del medio acuático.

Fagocitosis: Ingestión o transporte de material particulado al interior de la célula a través de engolfamientos de la membrana celular.

Heterotrófico: se dice del metabolismo en el cual la fuente de Carbono y energía es derivada de la materia orgánica.

Mixotrofia: metabolismo que incluye la combinación de metabolismos autótrofo y heterótrofo. Esto incluye la posibilidad de adquirir fuentes de Carbono y energía tanto de origen orgánico como inorgánico o luz solar.

Mixótrofo fagotrófico: organismos unicelulares con metabolismo mixotrófico que tienen la posibilidad de obtener su fuente de Carbono orgánico por fagocitosis de partículas.

Mixótrofo osmotrófico: organismos unicelulares con metabolismo mixotrófico que tienen la posibilidad de obtener fuentes de Carbono orgánico disuelto por absorción osmótica.

Nanoplancton: se dice de la fracción de los organismos del plancton que se encuentran dentro del intervalo de los 2.0 - 20 μm de longitud.

Picoplancton: se dice de la fracción de los organismos del plancton que se encuentran dentro del intervalo de los 0.2 - 2.0 μm de longitud. Incluye principalmente bacterias, arqueas, cianobacterias y algunos pequeños eucariotas unicelulares.

Razón de Redfield: Es la proporción elemental promedio del Carbono, Nitrógeno y Fósforo de la materia orgánica que constituye al fitoplancton marino. Esta proporción es consistente con la detectada para nutrientes inorgánicos en el océano profundo.

La razón de Redfield indica que por cada 106 átomos de Carbono presentes en un organismo planctónico, existen a su vez 16 de Nitrógeno y 1 de Fósforo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés): técnica molecular empleada para amplificar un fragmento de ADN. Sus aplicaciones son muy diversas, aunque principalmente se enfocan en la identificación y descripción de fragmentos del genoma de un organismo de interés.

Virioplancton: hace referencia a la fracción del plancton entre los 0.02-0.2 μm de longitud al cual corresponden los componentes virales libres en la columna de agua.

RESUMEN

Laguna de Macapule, Sinaloa es un sistema somero eutrofizado con condiciones limitantes por Nitrógeno para el crecimiento del fitoplancton. Esto sugiere una importante participación de los microorganismos planctónicos en el reciclaje de nutrientes y el mantenimiento del sistema. Para ponderar esto se cuantificaron mensualmente los componentes microbianos y microplanctónicos entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008 en dos estaciones de muestreo en la laguna (estero y boca). Así mismo, en estas mismas fracciones planctónicas se determinó su posible asociación al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés) tanto en la laguna como en dos sitios (reservorio y estanque tipo) de la granja camaronícola Doña Juana por medio de análisis moleculares. La dinámica estacional de algunos componentes autótrofos, como picoplancton autótrofo (PA) y microfitoplancton (MF) difirió en ambos sitios de muestreo. Estas disimilitudes definieron un ciclo bimodal de producción. El incremento de primavera estuvo caracterizado por la respuesta del MF de la boca a altas concentraciones de nutrientes inorgánicos nitrogenados y sílice derivados de la influencia de surgencias y la actividad agrícola. El otro aumento ocurrió a finales del verano e inicios del otoño en el estero, asociado a fuertes desbalances de Nitrógeno:Fósforo (N:P) y al predominio de PA, cianobacterias en tricomas y algunos géneros de diatomeas. En tanto que la dinámica del bacterioplancton, virioplancton y nanoplancton fue similar en ambos sitios. Las densidades de estos dos primeros componentes estuvieron muy relacionadas a las proliferaciones fitoplanctónicas de invierno-primavera, indicando la disponibilidad de sustratos orgánicos y hospederos. En este periodo se registraron también las mayores razones virus:microorganismo sugiriendo un mayor control por actividad viral. El incremento de PA a partir de marzo se correlacionó positivamente con altos valores de temperatura del agua y máximos niveles de Fósforo inorgánico disuelto. Mayores densidades de PA en el estero que en la boca fueron consecuencia de posibles desfases en la producción y pérdida por pastoreo, así como algunas diferencias en la composición taxonómica del microzooplancton entre ambos sitios. Los taxa con metabolismo mixótrofos y capaces de explotar fuentes atmosféricas de Nitrógeno contribuyeron de manera importante en la comunidad fitoplanctónica en la Laguna de Macapule. En general este estudio indica que la trama trófica microbiana en Macapule está favorecida por el proceso de eutrofización. Esta condición sugiere que gran parte del flujo de carbono orgánico es retenido por los componentes microbianos. El WSSV estuvo asociado a fracciones del nano y microplancton únicamente en el estanque durante altos niveles de eventos infecciosos. La escasa detección a lo largo del ciclo anual y en fracciones $<2.0 \mu\text{m}$ podría estar relacionado con bajas concentraciones del virus en la muestra de agua y a la posible ocurrencia de variables genéticas del virus en las secuencias correspondientes a los sitios de hibridación de los oligonucleótidos usados en cada análisis de PCR.

Palabras clave: virioplancton, bacterioplancton, nanoplancton, picoplancton autótrofo, eutrofización, Macapule.

ABSTRACT

Laguna de Macapule, Sinaloa is an eutrophic and shallow aquatic system with nitrogen limited conditions for phytoplankton growth. It suggests an important participation of planktonic microorganism recycling nutrients and supporting ecosystem food webs. To estimate their participation, we quantified microbial components monthly from December 2007 to December 2008 in two points of Macapule (estuary and entrance). Also, in these same fractions was determined their possible association to white spot syndrome virus (WSSV) in the lagoon and in two sites (reservoir and pond) at shrimp farm Doña Juana by means of molecular analysis. Some autotrophic fractions, like autotrophic picoplankton (PA) and microphytoplankton (MF) were different between both location sampling. This defined a bimodal production cycle with two seasonal peaks: spring and summer-autumn. The former increase was characterized by larger MF densities in the Macapule entrance, which were favored by high dissolve inorganic Nitrogen and silica concentration derived from coastal upwelling and agricultural activities. The second peak in the estuary occurred under strong Nitrogen:Phosphorus (N:P) unbalance and was associated to PA, cyanobacterial trycome and some diatoms predominance. Bacterioplankton, virioplankton and nanoplankton dynamics were similar between both sites. These two first components were tightly related with some phytoplanktonic blooms in the cold period (January-April) indicating a high available organic substrates and hosts. During this period, the virus-microorganism ratio registered high values suggesting a stronger viral control. Stimulated PA abundance at ending spring and early summer was related to water temperature and dissolve inorganic phosphorus increase. Their densities were usually higher in the estuary than the entrance because of possible microzooplankters grazing loss unbalance and some differences in their taxonomic structure from both sites. A significant contribution of mixotrophic and Nitrogen fixing populations was a feature of the phytoplankton community from Macapule lagoon. This study revealed that microbial food web in Macapule is favored by eutrophization process. This condition suggests that much of the organic carbon flux is retained by the microbial components. The WSSV was associated with nano-and microplankton fractions only in the pond during high levels of infectious events. The low detection during the annual cycle and in $<2.0 \mu\text{m}$ fractions could be related to low concentrations of virus in the water sample, as long as the possible occurrence of genetic variables in viral sequences corresponding to the hybridization sites of primers in each PCR analysis.

Keywords: virioplankton, bacterioplankton, nanoplankton, autotrophic picoplancton, eutrofization process, Macapule.

I INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se sabe que la participación de las comunidades microbianas en las redes tróficas, es imprescindible y crucial para la productividad general de los sistemas acuáticos. Inicialmente, estudios de sistemas marinos y continentales en latitudes templadas y árticas, han permitido comprender el papel de las comunidades del fitoplancton, bacterioplancton, nanozooplancton y virus en la producción de carbono orgánico particulado (COP) (Wilhelm & Suttle, 1999; Kirchman & Williams, 2000; Pomeroy *et al.*, 2007; Sherr *et al.*, 2007).

A diferencia del modelo unidireccional de flujo de materia y energía propuesto anteriormente (Steele, 1974), el fitoplancton en la columna de agua no es la única vía implicada en la producción de biomasa y su transferencia de carbono orgánico a los niveles tróficos superiores, en donde los organismos aumentan en tamaño progresivamente. Hoy se sabe, gracias a la introducción del concepto del ciclo microbiano, que las bacterias heterótrofas, abundantes en los sistemas acuáticos, incorporan en biomasa el carbono orgánico disuelto (COD) procedente de la exudación vegetal y la excreción de otros organismos y de esta forma lo devuelven y transfieren en forma de COP a través de pequeños pastoreadores nanozooplancntones, a las redes tróficas acuáticas (Pomeroy, 1974; Azam *et al.*, 1983).

Así mismo, con el descubrimiento de que los virus son las entidades biológicas más abundantes en los sistemas acuáticos y los sedimentos (Bergh *et al.*, 1989; Proctor & Fuhrman, 1990), nuevos esfuerzos reconocieron la importancia del control viral, a través de la lisis celular, sobre la abundancia y diversidad de bacterias (Fuhrman & Noble, 1995; Hennes & Simon, 1995; Fuhrman, 1999, 2000), fitoplancton (Suttle *et al.*, 1990; Cottrell & Suttle, 1991; Bratbak *et al.*, 1993; Chen & Suttle, 1995; Castberg *et al.*, 2001), protozoarios (Garza & Suttle, 1995) y algunos invertebrados (Wommack & Colwell, 2000; Drake & Dobbs, 2005). En este sentido, se hizo necesaria su introducción en las redes tróficas microbianas, como otra vía de

producción de COD y COP y liberación de nutrientes nitrogenados y fosforados (Wilhelm & Suttle, 1999).

La preponderancia de este nuevo modelo sobre circulación de materia orgánica particulada y disuelta fue inicialmente mejor estudiado en sistemas oligotróficos y oceánicos de las regiones templadas y polares (e.g. Gasol *et al.*, 1997; Fuhrman, 2000). Anteriormente, se cuestionaba acerca de cómo se podían encontrar cantidades importantes de materia y energía en los niveles tróficos superiores, a pesar de bajas a moderadas tasas de producción primaria. El conocimiento generado, incentivó nuevas investigaciones corroborando que los componentes microbianos como vías de generación de COP y COD, estaban también implicados e incluso eran más activos y complejos que en sistemas donde los recursos nutricionales son abundantes (Ducklow, 2000; Nagata, 2000; Thingstad, 2000a).

Hoy en día, muchos trabajos sustentan la participación de los componentes microbianos en todos los sistemas acuáticos, a pesar de las diferencias latitudinales y climáticas. No obstante, algunos rasgos muestran diferencias notables en la estructura, densidad y actividad entre ambientes oceánicos y costeros. Los ambientes costeros a diferencia de los oceánicos, poseen mayor capacidad de carga y fuertes fluctuaciones a consecuencia de pulsos de nutrientes procedentes del mar y el continente (Cochlan *et al.*, 1993). Esto en primera instancia, favoreció la idea de que en sistemas costeros las vías herbívoras eran la principal producción de Carbono orgánico particulado (Legendre & Rassoulzadegan, 1995). A pesar de ello, ésta idea ha venido evolucionando y aún no es concluyente el papel que pueden estar jugando las vías microbianas en estos sistemas. Caso particular son los ambientes impactados, enriquecidos por descargas de aguas residuales, ya que es menos comprendido el papel que juega el proceso de eutrofización en la selección de las vías herbívoras y microbianas. En sistemas acuáticos eutróficos, la disponibilidad de nutrientes en una primera fase del proceso, incrementa las tasas de crecimiento y con ello la biomasa de microorganismos autótrofos. Sin embargo, algunos ambientes costeros con el proceso de eutrofización más avanzado, pueden estar limitados por algún elemento (Si, N, P, Fe, etc.). De esta forma, la

concentración y la calidad de estos nutrientes estarían promoviendo el crecimiento selectivo de especies o poblaciones adaptadas a situaciones tales como cuando las proporciones de N:P caen por debajo de la proporción de Redfield (Cloern, 2001).

Algunos estudios realizados en sistemas estuarinos eutrofizados, indican que el impacto de las redes tróficas microbianas en términos de la retención de COP y su disminución en la eficiencia de los flujos hacia los niveles tróficos superiores, parece incrementarse en respuesta a la variación estacional y al ingreso de nutrientes al sistema (Putland, 2005). De esta forma, pequeñas cianobacterias cocoides, llegan a aportar la mayor parte de la producción primaria principalmente en el verano, asociadas a altos valores de temperatura, bajos aportes fluviales y bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos nitrogenados (Murrell & Lores, 2004; Murrell & Caffrey, 2005). La actividad lítica y la densidad de virus, por otra parte parecen estar positivamente relacionados con la disponibilidad de estos nutrientes, que mantienen altas tasas de crecimiento bacteriano (potenciales hospederos) (Wilson, *et al.*, 1998; Hewson, 2000).

Con respecto al Pacífico mexicano, existe un gran desconocimiento de la participación de los componentes microbianos tanto en sistemas costeros como oceánicos, así como su relación con el enriquecimiento por actividad antropogénica. Existen algunos trabajos puntuales para el área del Golfo de California (e.g. Díaz-Hernández & Maske, 2000) y la Corriente de California (e.g. Morales-Zamorano *et al.*, 1991), los cuales destacan la contribución de bacterias y cianobacterias en la columna de agua, sin embargo, pocos integran las interacciones ecológicas entre más de un componente microbiano con el medio físico-químico. Hasta el momento, ningún estudio ha hecho una contribución al conocimiento del número de virus en la columna de agua, por lo que hay mucho por esclarecer aún sobre el papel de los microorganismos dentro de las tramas tróficas pelágicas en estos sistemas subtropicales.

Dentro de esta categoría, la Laguna de Macapule localizada en la región costera del margen noroccidental de México, es un sistema productivo (ver referencias en

Magaña-Álvarez, 2004) donde se ha evidenciado el proceso de enriquecimiento por nutrientes, en respuesta a la influencia antropogénica de las aguas municipales, actividades agrícolas, acuícolas e industriales que se llevan a cabo en la región (Escobedo-Urías *et al.*, 1999). A pesar de ser un ambiente eutrofizado (Escobedo-Urías & Martínez-López, 2007), con altas concentraciones de compuestos nitrogenados, pero aparentemente limitado por Nitrógeno, existe un importante componente nanofitoplanctónico (dinoflagelados y cianobacterias) que predomina a lo largo del año y eventualmente genera proliferaciones (Poot-Delgado, 2006; Martínez-López *et al.*, 2007). Aunque se tiene idea de la dinámica de estas poblaciones, los resultados indican que las vías de pastoreo o herbívoras podrían ser menos relevantes que las vías detritívoras, como lo sugieren los datos precedentes de que en este lugar existen bajas abundancias del componente macrozooplanctónico (Zavala-Norzagaray, 2006; De Silva-Dávila *et al.*, 2006) y un componente importante de microzooplancton. Estos rasgos de la comunidad plantónica sugieren que los componentes microbianos están jugando un papel importante en la circulación de nutrientes y el mantenimiento del sistema; lo cual justifica que deban ser cuantificados.

Dentro de los componentes de la trama trófica microbiana, los virus adquieren relevancia, ya que algunos de ellos pueden afectar directamente la actividad acuacultural de la región, como es el caso del virus de la mancha blanca (WSSV), el cual se ha identificado desde hace algunos años, como una de las principales causas de mortalidad del camarón en México (ver referencias en Lightner, 2003). Esto es relevante para Macapule ya que adyacente a la laguna, se llevan a cabo importantes actividades de la industria camaronera para lo cual hacen uso del agua de la laguna (Lyle-Fritch *et al.*, 2001). Algunos estudios en la zona, indican que la presencia del virus en los estanques y zona lagunar parecen estar relacionados con las fracciones del microzooplancton, especialmente con las poblaciones de copépodos y otros pequeños crustáceos (Ramírez-Douriet, 2005), sin descartarse la posibilidad de una transmisión por la ruta adhesión virus-fitoplancton como ha sido observado en otras regiones del mundo (Zhang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Los

datos sugieren que las comunidades planctónicas parecen estar implicadas en la dispersión de la infección, no obstante, el conocimiento generado no es concluyente y hace falta explorar la posibilidad de que este virus pueda prevalecer también dentro de fracciones más pequeñas e incluso en el virioplancton.

Teniendo en cuenta la importancia y relevancia de las componentes microbianas como indicadores y partícipes en las redes tróficas y por ende de la productividad general de los sistemas acuáticos, además del impacto que pueden causar algunos de ellos sobre la economía de la región, este trabajo pretende conocer la variabilidad estacional de los componentes del fitoplancton (pico, nano y micro), bacterioplancton, virioplancton y nanozooplancton, así como el papel de algunos de los factores ambientales que intervienen en la regulación de sus abundancias. Adicionalmente, este trabajo enmarcado dentro del proyecto para la detección de virus causante de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) en la industria camaronera, intenta detectar su ocurrencia en las diferentes fracciones planctónicas, así como estandarizar un método para el recuento directo de partículas virales en muestras de la columna de agua. Para este objetivo, es necesaria la aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) anidada y en tiempo real para la identificación y cuantificación del virus causante de la enfermedad.

II ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La Laguna de Macapule es parte de un complejo lagunar en el estado de Sinaloa, considerado uno de los sistemas más productivos del país en cuanto a la cría, alimentación, reclutamiento y captura de especies de importancia comercial (Flóres-Verdugo *et al.*, 1993). Varias de las investigaciones de tipo oceanográfico se han centrado en el estudio de peces y macroinvertebrados, así como en especies de importancia comercial.

Debido a las características físicas, geográficas y socioeconómicas de la zona, desde hace unas décadas hasta hoy, se han venido incrementando el número de asentamientos humanos y con ello las descargas sobre los cuerpos de agua, provocando grandes alteraciones (Escobedo-Urías *et al.*, 1999, 2003).

Algunos estudios como el de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) (1974), realizaron una caracterización puntual preliminar a nivel de concentraciones de nutrientes, plaguicidas y calidad bacteriológica de las descargas de los drenes en los municipios de Guasave y Ahome. Dichas descargas aportan el 26% de la carga de materia orgánica, aguas residuales industriales y domésticas al sistema lagunar y sólo un 28% reciben algún tipo de tratamiento (Poder Ejecutivo Federal, 1995).

Descripciones a nivel bacteriológico y físico-químico en el complejo lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule, han esclarecido algunos aspectos de su variación estacional en relación con los aportes por ingreso de aguas residuales y derivadas de las actividades agrícolas de la región. Dichas contribuciones, procedentes de los drenes han aumentado las concentraciones de nutrientes inorgánicos, materia orgánica y algunos otros productos de desecho agroindustrial como fertilizantes y plaguicidas, entre otros (Escobedo-Urías *et al.*, 1999). En el caso de los nutrientes inorgánicos, algunos estudios en la zona han asociado su dinámica estacional a cambios en la estructura y producción de la comunidad planctónica. En términos de

la comunidad fotosintética, algunos trabajos reportan proliferaciones algales en coincidencia con el periodo de mayor precipitación y escorrentía, y en relación a los sectores cercanos a descargas de aguas residuales (Poot-Delgado, 2006; Martínez-López *et al.*, 2007). Para esta misma época (agosto-septiembre), De Silva-Dávila *et al.* (2006) y Zavala-Norzagaray (2006) reportaron máximas concentraciones de algunos grupos mesozooplancctónicos aparentemente favorecidos por la disponibilidad de alimento. A pesar de que la laguna posee un estado de eutrofia debido al continuo aporte de estos nutrientes (Magaña-Álvarez, 2004; Escobedo-Urías & Martínez-López, 2007), se ha encontrado una baja relación N:P, indicativo de limitación por Nitrógeno para las comunidades fitoplanctónicas (Martínez-López *et al.*, 2007).

Varios estudios realizados indican que la ocurrencia de florecimientos algales es relativamente frecuente (Poot-Delgado, 2006), por lo que se hace necesario investigar de que forma el fitoplancton está solventando dicho déficit. Estimaciones de clorofila *a* (Clo *a*), como una medida indirecta de biomasa, se han encontrado estrechamente relacionadas con densidades de fitoplancton correspondiente a las fracciones del nanoplancton (células < 20 μm), el cual ha mostrado ser el componente más abundante en el Golfo de California (Zeitzschel, 1969; Gilmartin & Revelante, 1978; Lara-Lara & Valdez, 1988; Álvarez-Borrero & Lara-Lara, 1991; Gaxiola *et al.*, 1995; Ulloa, 2005) y en el caso específico de la Laguna de Macapule (Poot-Delgado, 2006). No obstante, datos más recientes de biomasa fitoplanctónica (concentración de Clo *a*) parecen no ser coherentes muchas veces con las abundancias de dichos florecimientos de fitoplancton (Poot-Delgado, 2006). Esta situación ha sido atribuida a múltiples factores como la madurez o juventud de la comunidad fitoplanctónica, el estado fisiológico y la cantidad de feopigmentos o pigmentos accesorios (Margalef, 1974), y al predominio de organismos de escaso tamaño (<20 μm), anteriormente menospreciados conocidos como nano y picofitoplancton que poseen baja concentración de Clo *a* relativa al contenido de carbón (Malone, 1971; Mccarthy *et al.*, 1974; Gilmartin & Revelante, 1978; MacIntyre *et al.*, 2002).

Algunos estudios han encontrado que dicha porción del fitoplancton ($< 20 \mu\text{m}$), está asociada a valores altos de abundancia y productividad primaria con escasas cantidades de Clo *a* (Chávez, 1989; Chisholm, 1992; MacIntyre *et al.*, 2002). Este fenómeno ha sido explicado en la Laguna de Macapule y otros lugares, desde el punto de vista de las ventajas que tienen células de escaso tamaño para resolver la limitación por nutrientes, debido a su alto cociente superficie:volumen (Malone, 1980; Chisholm, 1992; Koch, 1996; Posh *et al.*, 2001). El argumento anterior explica en gran parte lo que podría estar sucediendo con la composición de tamaños y abundancia de la comunidad fitoplanctónica en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, quedan sin resolver el cómo pueden estar solventando este déficit.

Una de las hipótesis más acertadas, está relacionada con la proporción de células autótrofas y heterótrofas que pueden estar conformando el nanoplancton. Actualmente, herramientas como la microscopia de epifluorescencia, han contribuido a esclarecer estas inquietudes, revelando que el nanoplancton además de poseer una alta fracción de células que hacen parte del fitoplancton, incluye aunque en menor proporción células ausentes de pigmentos fotosintéticos que producen biomasa a partir de la ingestión de partículas de Carbono orgánico particulado (COP) y/o bacterias, y en un caso más complejo, células con la dualidad de un metabolismo mixótrofo (Caron, 2000). En la Laguna de Macapule no se ha cuantificado aún la existencia de estos grupos, ni mucho menos su impacto sobre otros componentes de la comunidad lo que ha generado un desconcierto sobre la participación del nanoplancton heterótrofo en el flujo de COP.

Hoy en día, se dispone de varios estudios sobre la abundancia, dinámica, factores de control y relación entre los diferentes grupos planctónicos (bacterioplancton, fitoplancton, nanozooplancton y virus) que integran los ecosistemas acuáticos especialmente de las zonas templadas. Gracias a ello, se sabe que las bacterias heterótrofas toman COD, originado principalmente por los productores primarios y consumidores (en forma de exudados y productos de excreción) y una parte significativa aportada por la actividad viral (producto de la lisis

celular de algas y bacterias), incrementando su biomasa (en número y tamaño). Posteriormente, estos microorganismos son consumidos por pequeños pastreadores como flagelados y ciliados, los cuales a su vez son depredados por grandes metazoos; de esta forma, este material orgánico, aparentemente perdido, es incorporado de nuevo en la red trófica. Este flujo de COD vía procariotas y pequeños pastreadores, es llamado el “ciclo microbiano” (Azam *et al.*, 1983). Recientemente, se propuso una extensión de este modelo denominado el corto circuito viral (Figura 1) a raíz del descubrimiento de que los virus eran muy abundantes en ecosistemas marinos y continentales. Algunos autores reportaron una actividad reguladora de las poblaciones microbianas por parte del virioplancton (Fuhrman & Noble, 1995; Suttle, 1994; Weinbauer, 2004; Bettarel *et al.*, 2003a y b), interfiriendo en la transferencia regular de materia y energía (Wilhelm & Suttle, 1999).

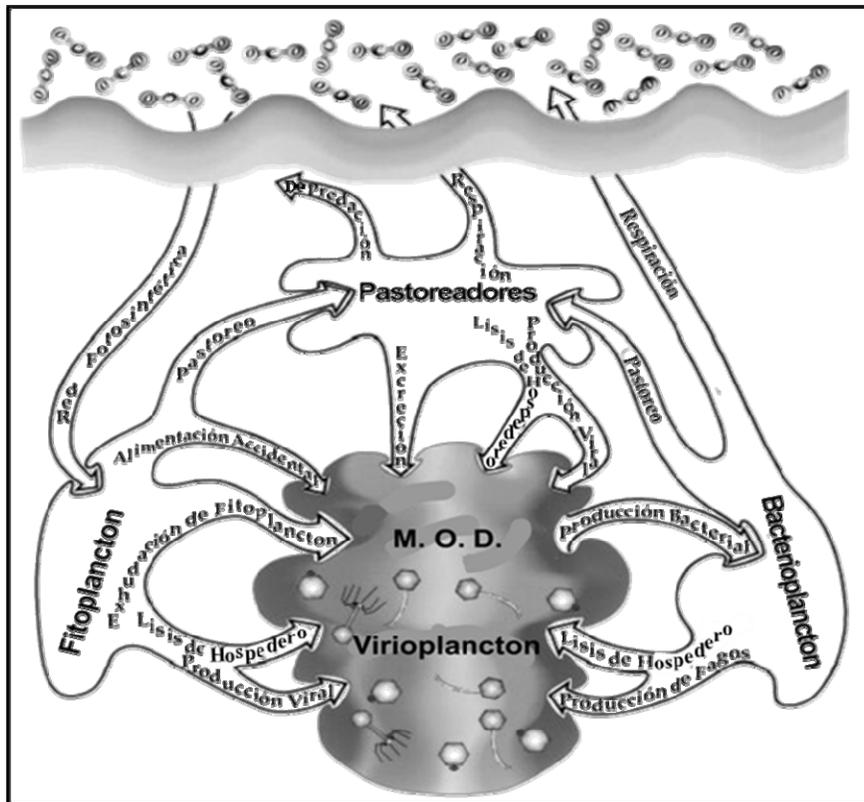


Figura 1. Inclusión de la participación de los virus en el modelo del bucle microbiano (Microbial Loop) (Tomado y modificado de Wommack & Colwell, 2000). MOD: Materia orgánica disuelta.

Como ya se mencionó en la introducción algunos esfuerzos han explorado la participación de las fracciones fitoplanctónicas pequeñas ($<0.3 \mu\text{m}$) en sistemas de la Corriente y en el norte del Golfo de California (Díaz-Hernández & Maske, 2000). Otros sin embargo, han estandarizado las metodologías necesarias, para cuantificar la abundancia del bacterioplancton en términos de densidad y biomasa mediante técnicas de microscopía de epifluorescencia combinadas con la aplicación de fluorocromos y análisis de imágenes en cultivos de muestras naturales (Ruiz-De La Torre, 2003). En el margen occidental de la Península de Baja California, Morales-Zamorano *et al.* (1991) evaluaron la abundancia y producción bacteriana de una laguna costera somera dentro de la Bahía de Todos Santos, en relación con los fenómenos físicos y químicos desencadenados por la dinámica del régimen de mareas. En este trabajo se encontró que tanto en condiciones de marea viva como muerta, la biomasa bacteriana es favorecida por la disponibilidad de COD que es resuspendido del sedimento. Igualmente, sugiere que bajo estas condiciones las vías microbianas sostienen la estructura trófica del sistema lagunar, en lugar de las vías herbívoras tradicionales que usualmente predominan como principal generador de COP durante la temporada de surgencia.

Investigaciones en sistemas controlados han demostrado cómo algunas variables del medio físico y la concentración de sustratos influyen las tasas respiratorias y de crecimiento en muestras de bacterioplancton de la Bahía de Ensenada; no obstante, carecen de argumentos para explicar la ausencia de variación de las abundancias en los sistemas de cultivo, y lo atribuyen al posible control por fagos (Jiménez-Mercado, 2004; Cajal-Medrano & Maske, 2005). Para esta misma zona, se ha evaluado la dinámica de bacterias y bacteriófagos también en modelos experimentales basándose en el empleo de técnicas con epifluorescencia y fluorocromos como DAPI para conteo de bacterias y SYBR Green I para bacterias y virus en bioensayos (González-Galindo, 2003). Los resultados reportaron una significativa porción de poblaciones bacterianas infectadas predominantemente por fagos lisogénicos, donde la fase lítica fue inducida al comienzo de la fase de crecimiento exponencial.

En cuanto a la interrelación de las diferentes comunidades de bacterioplancton, fitoplancton, virus y microzooplancton no se cuentan con trabajos para el área del Golfo de California. Lo más cercano geográficamente, son quizás algunos estudios en la Corriente de California (Cochlan *et al.*; 1993), el Golfo de México (Boehme *et al.*; 1993), y estuarios de Florida (Putland; 2005), donde muestran correlaciones significativas entre Clo_a , densidad viral y densidad bacteriana-densidad viral, lo que parece demostrar la dependencia de la infección viral sobre la presencia del bacterioplancton activo. Así mismo, encuentran una importante producción estacional alternada entre el picoplancton autótrofo (cianobacterias) y heterótrofo (bacterias), con implicaciones en la producción y consumo por parte del microzooplancton estuarino a lo largo de un gradiente de salinidad.

En la actualidad se dispone de información sobre el efecto de los bacteriófagos en el control de la abundancia y diversidad del bacterioplancton y el fitoplancton en ambientes marinos (e.g. Cottrell & Suttle, 1991; Boehme *et al.*, 1993; Culley & Welschmeyer, 2002; Nagasaki, 2008). Sin embargo, poco se sabe sobre la distribución en la columna de agua de los virus que infectan y producen patologías en macroinvertebrados acuáticos (camarones y otros crustáceos decápodos), debido principalmente a limitaciones técnicas. Numerosos avances metodológicos se han enfocado principalmente al diagnóstico de organismos enfermos, con el fin de tomar medidas oportunas para evitar pérdidas económicas en cuanto a la producción camaronera. Es claro que se conoce muy poco sobre la identificación y cuantificación de estos agentes infecciosos en la columna de agua, así como del reconocimiento de posibles vectores en las comunidades microbianas.

En las costas de Sinaloa, se realizan importantes actividades por parte de la industria camaronera, la cual no solo ha generado un daño directo sobre los ecosistemas adyacentes, como la disminución de áreas de bosques de manglar para la creación de complejos para el cultivo, sino que también han provocado el deterioro de la calidad del agua de la zona litoral adyacente, con la descarga de sus aguas de desechos ricas en nutrientes orgánicos e inorgánicos lo que a su vez podría estar

promoviendo la proliferación de enfermedades virales y pérdidas en la producción (Bilio *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 1999). Una de las amenazas más importantes para la industria camaronera ha sido la transmisión del síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV) (Lightner, 2005).

Solventando la necesidad de conocer más acerca de las rutas de infección del virus de la mancha blanca, Ramírez-Douriet (2005) hace por primera vez una detección molecular del mismo en grupos del macrozooplancton en el Sistema lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule (Sinaloa) y en algunos estanques de cultivo de camarón. Para ello se implementó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. En el trabajo anterior se detectó el virus de la mancha blanca en diferentes grupos del zooplancton. La identidad del virus se corroboró al clonar y secuenciar el fragmento de ADN amplificado al usar ADN extraído de los organismos zooplactónicos con oligonucleótidos específicos para WSSV y compararlo con el reportado para el virus en cuestión. Los grupos que resultaron positivos al virus de la mancha blanca fueron algunos géneros de copépodos, quetognatos, cladóceros y larvas de decápodos y peces. Al mismo tiempo, otros trabajos experimentales en el continente asiático, han atribuido al posible consumo de algunas poblaciones del microzooplancton como un posible vector de la infección viral a sistemas de cultivo de camarón. Estos organismos a su vez fueron expuestos a microalgas procedentes de cultivos inoculados con el virus estableciendo así una ruta por adhesión virus-fitoplancton (Zhang *et al.*, 2006). Aún más recientemente, Liu *et al.* (2007) corroboraron la posibilidad de que diferentes grupos taxonómicos de fitoplancton actuaran como vía de transporte del virus, así como su capacidad de mantener viable al WSSV hasta seis días después del contacto con el camarón enfermo. La posibilidad de que este virus pueda prevalecer también dentro del virioplancton es aún una interrogante actual.

III OBJETIVOS

III.1 OBJETIVOS GENERALES

- I. Describir la dinámica estacional de los componentes microbianos en la Laguna de Macapule, así como su relación con las variables ambientales.
- II. Detectar al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en las diferentes fracciones planctónicas microbianas de la laguna y del sistema de cultivo de camarón mediante PCR anidado y en tiempo real.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la abundancia de los componentes microbianos (bacterioplancton, nanozooplancton y virioplancton) y fitoplancton en la columna de agua.
- Conocer la variación temporal de los nutrientes y algunos parámetros físicos y químicos.
- Evaluar la influencia de los factores físicos y químicos sobre la variación temporal de las variables biológicas propuestas.
- Determinar posibles relaciones entre las abundancias de los componentes estudiados.
- Determinar si es posible Identificar y cuantificar al WSSV como componente del virioplancton y su posible asociación a algún otro elemento microbiano.

IV HIPÓTESIS

I. Condiciones limitantes por Nitrógeno para el crecimiento del microfitoplancton favorecen densidades altas de los componentes de la comunidad microbiana (nanoplancton, picoplancton y virioplancton) en la Laguna de Macapule.

II. La presencia del virus de la mancha blanca en la columna de agua está asociada al componente autotrófico de talla pequeña.

V ÁREA DE ESTUDIO

La laguna costera de Macapule esta ubicada en el estado de Sinaloa y forma parte de una de las lagunas del Complejo Costero de San Ignacio-Navachiste-Macapule (Figura 2). Se caracteriza por tener condiciones geológicas, geomorfológicas e hidrológicas que la hacen uno de los sistemas mas productivos en México tanto por la diversidad como por su aporte de individuos de importancia comercial (Contreras & Castañeda, 2003)



Figura 2. Sitios de colecta de muestras para este estudio dentro de la Laguna de Macapule (1 y 2) y complejo camaronero (3 y 4). 1. Boca norte laguna (25.37° N y 108.74° W). 2. Estero El Tortugón (25.39° N y 108.67° W). 3. Reservorio. 4. Estanque camaronero.

La laguna se encuentra semicerrada por una isla barrera de 22.7 km de longitud y 2.5 km de ancho paralela a la costa, que permite el intercambio con aguas del golfo por medio de las bocas del extremo norte y sur (Bocanita). En la parte sur, el sistema se estrecha dando lugar a un estero (El Esterón) que en realidad es un

canal paralelo a la isla, al cual llegan varios arroyos y drenes de la planicie costera (Lyle-Fritch, 2007).

La laguna posee una extensión aproximada de 38 km², caracterizándose por tener aguas someras (0.5- 9 m), con tipos de sustratos que van desde fangoso en las zonas internas hasta arenoso en áreas comunicadas al mar abierto. (Escobedo-Urías *et al.*, 2003; Ayala-Baldenegro, 2004; Magaña-Álvarez, 2004). La mayor parte del sistema se encuentra bordeado de vegetación de manglar, dentro de las que sobresalen especies como *Laguncularia racemosa*, *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*. La parte central de la laguna presenta un canal de navegación (12 m). En esta laguna se encuentran localizadas la mayor parte de las granjas camaroneras del sistema (H. Ayto. del municipio de Guasave, 1996; Lyle *et al.*, 2001)

El clima es generalmente cálido con altas tasas de evaporación y bajos porcentajes de humedad relativa; las precipitaciones oscilan alrededor de 579 mm concentrándose en los meses de junio-octubre (Vicencio, 1979; H. Ayuntamiento de Guasave, 1996). La región del Golfo de California se encuentra fuertemente influenciada por los vientos, que a su vez tienen efecto sobre la dirección de las corrientes; en invierno predominan los vientos procedentes del noroeste, mientras que en verano los del SE, siendo mas fuertes y menos húmedos los primeros (Bray, 1988). En verano la temperatura ambiental oscila entre 3 y 45 °C (H. Ayuntamiento de Guasave, 1996).

La laguna recibe la descarga directa de varios drenes (Los Morelos 29 +1000, 27 + 1000 y 35 + 1000), que recogen principalmente aguas producidas por la actividad agrícola y en menor proporción aguas residuales procedentes de la ciudad de Guasave y aquellas generadas por actividad pecuaria industrial (alimenticia y agroquímica) y la producción camaronera. Generalmente, sus vertimientos tienden a incrementarse en los meses de mayor precipitación (INEGI, 1998; Escobedo-Urías *et al.*, 1999).

VI MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 TRABAJO DE CAMPO

Se visitaron dos sitios en cada muestreo mensual durante un ciclo anual; uno cercano a la boca norte de la laguna y otro, en la entrada al estero El Tortugón que abastece la granja camaronera (Figura 2). Adicionalmente se muestrearon dos puntos de interés para la industria camaronera, correspondientes al reservorio y al estanque camaronero; estos se efectuaron mensualmente desde marzo de 2008, previamente al inicio del ciclo de cultivo hasta la cosecha (octubre de 2008) (Figuras 2 y 3).

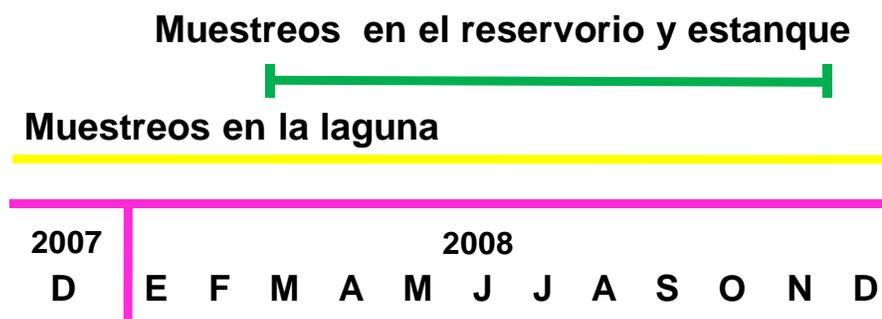


Figura 3. Periodicidad de los muestreos en sus respectivas estaciones.

En síntesis para el desarrollo de este trabajo se realizaron trece muestreos en la sección lagunar y siete en la granja camaronera. Las muestras se recolectaron con un tubo segmentado, el cual permite tomar una sección integrada de tres metros de columna de agua; para estaciones muy someras se procuró no alcanzar la interface agua-sedimento. Las variables biológicas relacionadas con la densidad de los componentes de la trama trófica microbiana (virus, bacterioplancton, picoplancton y nanoplancton) y microfitoplancton se tomaron y analizaron por triplicado en las estaciones de la laguna. Las del complejo camaronero únicamente se procesaron para todos los componentes planctónicos en el primer muestreo (marzo de 2008), exceptuando virus y bacterioplancton que fueron cuantificados aunque por duplicado hasta el final del ciclo de cultivo. Para la detección y cuantificación del WSSV se

tomaron también muestras por triplicado durante el periodo designado en la figura 3 para todas las estaciones de muestreo; sin embargo, esto se hizo sólo con el propósito de tener un volumen considerable de muestra según los requerimientos de las técnicas empleadas.

En cuanto a las variables ambientales, algunas se determinaron *in situ*, como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto mediante un medidor de calidad de agua marca *Horiba* modelo U-10, y la transparencia del agua se midió utilizando el disco Secchi. La concentración de los nutrientes (amonio, nitrato, nitrito, urea, fósforo reactivo, ácido silícico, Nitrógeno y Fósforo total) y clorofila *a* se analizaron en el laboratorio del CIIDIR (Unidad Sinaloa). Adicionalmente se contó con datos meteorológicos de precipitación, humedad relativa, temperatura ambiente, irradiancia solar y rapidez y dirección de los vientos, proporcionados por las estaciones climatológicas de El Tortugón (cortesía del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa), Las Glorias (cortesía del CIAD, Unidad Mazatlán) y la Comisión Nacional del Agua (CNA).

Todas las muestras obtenidas en el campo fueron transportadas en refrigeración y protegidas de la luz al laboratorio del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, en donde se fijaron de acuerdo a los protocolos estándar (Caron, 1983; Sherr & Sherr, 1993; Kepner & Pratt, 1994; Eaton *et al.*, 1995). Para bacterioplancton y nanoplancton, las muestras se preservaron con glutaraldehído buferado, mientras que las de virioplancton con formalina boratada (20 g de borato de sodio en 1 L de formalina al 37%), ambas llevadas a una concentración final de 1%. Las muestras de microfitoplancton se preservaron con lugol concentrado acidificado hasta una concentración final del 1% (Lund *et al.*, 1958). Las muestras para análisis del WSSV fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

VI.2 TRABAJO DE LABORATORIO

VI.2.1 Determinación de nutrientes

Para el análisis de nutrientes inorgánicos y Clo *a* se emplearon las técnicas propuestas en el manual de análisis químicos para aguas marinas (Strickland & Parsons, 1972), mientras que para urea se basó en el método desarrollado por Mulvenna & Savidge (1992). Las determinaciones de amonio, nitratos, nitritos, fósforo reactivo, ácido silícico y urea se realizaron por colorimetría y espectrofotómetro a partir de muestras filtradas a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F. Para la cuantificación de Clo *a*, las muestras se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F. Estos filtros se almacenaron a -20 °C en un congelador hasta su posterior análisis. La extracción de pigmentos se efectuó en una solución de acetona al 90% y se cuantificó también por espectrofotometría; el cálculo de Clo *a* se hizo según la ecuación descrita por Jeffrey & Humphrey (1975). Adicionalmente, a partir de las muestras sin filtrar se detectaron las concentraciones de Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (FT) por el método de digestión propuesto por Valderrama (1981) y teniendo en cuenta algunas consideraciones finales según Strickland & Parsons (1972).

VI.2.2 Recuento total de Microorganismos

VI.2.2.1 Recuento total de microplancton

Para este propósito se aplicó el método de recuento por microscopia invertida sugerido por Lund *et al.* (1958), Utermöhl (1958) y Herbert (1990). En el procedimiento se adicionó un volumen determinado de muestra bien homogenizada en la cámara de sedimentación. Cada muestra se dejó precipitando por un período no menor a 24 horas en una superficie plana y horizontal para no alterar la distribución de los microorganismos en el fondo de la cámara. Para esta variable biológica se realizó un conteo de todos los individuos en el fondo de la cámara con

morfologías claramente fitoplanctónica con tamaño entre los 20 - 200 μm , haciendo una diferenciación e identificación hasta nivel de clase. Adicionalmente, se cuantificaron los organismos del Phylum Ciliophora (ciliados y tintínidos), especificando el número del componente heterotrófico (CH) y el autotrófico (CA) que se diferenciaron por su morfología. Este último estuvo representado exclusivamente por *Myrionecta rubra* (= *Mesodinium rubrum*).

Para la obtención de número total de fitoplancton por litro, se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Células} \cdot \text{mL}^{-1} = N / V \quad (1)$$

En donde:

N = Número de total células en el fondo de la cámara.

V = Volumen sedimentado (mL).

VI.2.2.2 Recuento total de nanofitoplancton (NF) y nanozooplancton (NZ)

Para el recuento de organismos nanoplanctónicos, se utilizó el método con microscopía de epifluorescencia descrito por Caron (1983) y Sherr *et al.* (1993) usando como fluorocromo la primulina, que a diferencia de otros, tiene afinidad por los lípidos de las membranas celulares. Una característica de esta técnica es que permite el conteo de organismos autótrofos y heterótrofos en la misma preparación cambiando el juego de luz de excitación en el microscopio de epifluorescencia.

Se empleó una solución de primulina a una concentración de $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua destilada con M-Trizma-hydrochloride 0.1 M a un pH de 4.0. Esta se filtró a través de membranas de $0.22 \mu\text{m}$ antes de su uso. Un volumen de la muestra (10 a 50 mL) se filtró en un sistema de filtración de 25 mL de capacidad a través de una membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro y $0.8 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, previamente humedecida con 2 ml de una solución de lavado (Tris-HCl 0.1 M); posteriormente, se lavó el embudo de filtración con agua destilada estéril para

arrastrar los organismos que hubiesen quedado en las paredes del embudo. Posteriormente, el embudo de filtración se quitó y el soporte con la membrana se inundó con la solución de Primulina sin aplicar presión de vacío dejándola reaccionar por 15 minutos; después se filtró el fluorocromo y el exceso de colorante en la membrana se lavó con 2 mL de la solución de lavado. Una vez que la membrana estuvo seca se retiró con pinzas, se extendió sobre un portaobjetos y finalmente se llevó a cabo el montaje colocando un cubreobjeto y usando aceite de inmersión de baja fluorescencia. Las preparaciones fueron analizadas inmediatamente o almacenadas en oscuridad y bajo refrigeración hasta su conteo.

Como referencia para el conteo de microorganismos se empleó una retícula (1.0 cm²) colocada en el ocular del microscopio. Se enumeraron un mínimo de 200 células por filtro en campos elegidos aleatoriamente. Se consideraron todas las células de morfología definida y con tamaños entre 2 a 20 µm; así como, todos los individuos que quedaron en los bordes de la retícula, siempre y cuando más del 50% de su estructura se encontrara dentro de la misma. El recuento total de nanoplancton (N_T) y nanofitoplancton (NF) se realizó por medio de un microscopio de epifluorescencia (*Olympus* BX60) a una amplificación de 100X y bajo emisión de un filtro multibanda entre 360 - 730 nm. La fracción total (N_T) estuvo compuesta por todas las morfologías celulares fluorescentes, mientras que las segundas (NF) correspondieron a aquellas con fluorescencia roja-naranja por la presencia de clorofila *a*. En el caso de que la morfología celular fuese difícil de detallar, se cambió el espectro de banda a emisión azul (λ: 460 – 490 nm) para su conteo.

Para ésta técnicas la densidad de organismos N_T y NF se determinó con la ecuación (2), con los respectivos ajustes para microscopia de epifluorescencia como se muestra a continuación:

$$\text{Células} \cdot \text{mL}^{-1} = N \times F \times D / V \quad (2)$$

En donde:

N = Número de células promedio por retícula.

F = Número de veces que cabe el área de la retícula en el área efectiva de filtración del filtro.

$$\text{Área de filtración} = \pi \cdot r^2 \text{ (20106 mm}^2\text{)}$$

$$\text{Área retícula} = (0.01 \text{ mm}^2 \text{ en } 100X)$$

D = Inverso de la dilución (aporte del fijador).

V = Volumen filtrado de la muestra (mL).

A partir de la diferencia entre ambas densidades (N_T y N_F) se obtuvo la abundancia de nanozooplankton (NZ), de acuerdo a la siguiente ecuación (3):

$$\text{Abundancia de NZ (Células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = N_T \text{ (Células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} - N_F \text{ (Células} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} \quad \mathbf{(3)}$$

VI.2.2.3 Recuento de picoplancton autótrofo (PA)

A diferencia del componente heterotrófico, los organismos fotosintéticos pueden ser visualizados simplemente por la autofluorescencia roja de la *Clo* a bajo emisión de longitudes de onda del azul y el violeta (λ : 420-440nm) (MacIsaac & Stockner, 1993). De esta forma, los organismos son concentrados en una membrana de policarbonato de 0.2 μm de diámetro de poro, sin llevar a cabo alguna tinción con fluorocromo (Booth, 1993). Durante la filtración se tomó entre 2 y 6 mL de muestra de agua fijada con glutaraldehído buferado. Posteriormente, se lavó la torre de filtración con agua destilada estéril filtrada para recuperar posibles organismos adheridos a las paredes. Para la elaboración y montaje de las láminas se tuvo en cuenta las mismas indicaciones del componente anterior. Se contó un mínimo de 200 células en campos aleatorios (Kepner & Pratt, 1994), cuyas morfologías correspondan a una esfera u óvalo menores a 2.0 μm y de fluorescencia roja. Para los cálculos de densidad se empleó la ecuación (2).

VI.2.2.4 Recuento total de bacterioplancton (BP) y virioplancton (PSV)

Para el recuento total de procariotas planctónicos (tanto autótrofos como heterótrofos) y virioplancton se siguió el método de microscopía de epifluorescencia con el fluorocromo SYBR Gold (específico para ácidos nucleicos), según la metodología descrita por Noble & Fuhrman (1998), Chen *et al.* (2001) y Chen & Wang (2007) con algunas adecuaciones realizadas en el laboratorio de microbiología de CICIMAR-IPN.

Las muestras se procesaron filtrando un volumen de muestra a través de un filtro ANODISC de óxido de aluminio de 0.02 μm usando un filtro de soporte de acetato de celulosa de 0.45 μm . El volumen a filtrar dependió de una serie de pruebas preliminares de acuerdo al número de virus contados por campo en la retícula. Posteriormente a la filtración, los filtros se secaron cuidadosamente sobre un paño protegiéndolos de la luz.

Una vez secos, los filtros se colocaron sobre portaobjetos donde previamente se agregó de 100 μl del fluorocromo SYBR Gold (concentración final 2.5X). Estos se dejaron en contacto con el colorante por un tiempo de 15 minutos protegidos de la luz. Pasado el tiempo de tinción los filtros se secaron al aire y se montaron para su observación en portaobjetos usando como líquido de montaje Citifluor o en su defecto aceite de inmersión de baja fluorescencia o con una solución preparada con 50% de Glicerol y 50% de solución Tris-HCl (10 nM) y EDTA (1 mM). Los filtros teñidos fueron inmediatamente analizados por microscopía de fluorescencia para evitar pérdida de la fluorescencia o almacenados temporalmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para el recuento se empleó luz de excitación azul y se siguieron las indicaciones ya mencionadas acerca de los campos aleatorios. Los virus o partículas similares a virus (PSV) como suelen ser reportados en la literatura, se visualizaron como puntos fluorescentes verdes, que se diferenciaron de otras partículas de tamaño similar por el brillo intenso y de las células procariotas, las cuales poseen sus morfologías típicas (bacterianas) y mayor tamaño. Se contó un total entre 400 a 800 partículas similares a virus (PSV) y entre 250 a 600 células con morfologías y

tamaños acordes al picoplancton ($>0.2 \mu\text{m}$). La densidad de partículas similares a virus (PSV) y procariotas se determinó con la ecuación (2).

Para el cálculo del componente bacterioplanctónico (BP) se realizó la sustracción de la densidad de PA a la densidad de picoplancton total teñido con SYBR Gold, de acuerdo a la ecuación (2) expresada para nanoplancton.

VI.2.2.5 Detección del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una muestra de agua fraccionada

Extracción de ADN. Previo a este procedimiento las muestras de agua se dejaron descongelando a temperatura ambiente. Con el propósito de retener cada una de las fracciones planctónicas del micro, nano, pico y femtoplancton, cada muestra de agua fue pasada a través de un tamiz ($20 \mu\text{m}$) y posteriormente filtrada por membranas con diámetros de poro de $1.2 \mu\text{m}$ (GF/C, VWR. Cat. No. 516-0081), $0.2 \mu\text{m}$ (Policarbonato, Whatman. Cat. No. 110606) y $0.02 \mu\text{m}$ (tipo ANODISC, Whatman. Cat. No. 6809-6002), respectivamente. El volumen de agua filtrado para microfitoplancton y nanoplancton fue alrededor de 150 - 1,000 mL, mientras que para picoplancton y femtoplancton fluctuó entre 20 - 80 mL debido a la saturación de la membrana. Para la extracción de ADN se utilizó el reactivo DNAzol (INVITROGEN; No. Cat. 10503-027) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Cada membrana se introdujo en un tubo eppendorf con 500 a 1000 μL de DNAzol y se maceró con un pistilo estéril para potencializar la ruptura de material celular y lisis de las partículas virales. Luego, cada muestra se centrifugó (10,000 rpm por 10 minutos) a un nuevo tubo, se agregó un volumen de etanol al 100% y se mezcló por inversión para inducir la precipitación del ADN. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 4,000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado dos veces con etanol (75%). Finalmente, la pastilla de ADN fue secada al aire por tres minutos y resuspendida en 50 μL de agua ultrapura (Millipore).

Detección preliminar por PCR anidada. La aplicación de ésta técnica molecular para la detección del WSSV en las fracciones de los componentes microbianos se realizó preliminarmente en extractos de fracciones de una muestra de agua procedente de un estanque de camarón durante un evento infeccioso registrado en junio del 2007. Para este propósito se tuvo en cuenta la metodología empleada por Ramírez-Douriet (2005) de acuerdo a las indicaciones de la técnica original (Kimura *et al.*, 1996).

Control de ADN en los extractos. Con el fin de tener una aproximación sobre la presencia y calidad de ADN en los extractos fraccionados de las muestras de agua previo a la detección del WSSV, se realizaron amplificaciones por PCR sencillo para un fragmento específico para bacterias de una región que codifica para el ARN mitocondrial 16S. Esta consideración se efectuó asumiendo la posibilidad de obtener productos positivos por lo menos en las tres primeras fracciones (micro, nano y picoplancton) de todas las muestras de agua, ya que en estas fracciones podrían contener ADN bacteriano. En las tabla 1 y 2 se describen los juegos de oligonucleótidos universales empleados así como las condiciones del programa de PCR utilizado

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para PCR sencillo y anidada. F y R se refieren al sentido de los oligonucleótidos; F (Forward, sentido); R (Reverse, antisentido).

| Nombre de oligonucleótidos | Secuencia (5' - 3') | Tipo PRC | Tamaño del producto (pb) | Referencia |
|----------------------------|----------------------|----------|--------------------------|-----------------------------|
| F2C (F) | AGAGTTTGATCATGGCTC | Sencillo | 1400 | Shi <i>et al.</i> (1997) |
| C (R) | ACGGGCGGTGTGTAC | | | |
| WSSV 1OUT (F) | ATCATGGCTGCTTCACAGAC | Sencillo | 910 | Kimura <i>et al.</i> (1996) |
| WSSV 2OUT (R) | GGCTGGAGAGGACAAGACAT | | | |
| WSSV 1IN (F) | TCTTCATCAGATGCTACTGC | Anidada | 550 | Kimura <i>et al.</i> (1996) |
| WSSV 2IN (R) | TAACGCTATCCAGTATACCG | | | |

Detección del WSSV por PCR sencillo y anidada. Para este fin se empleó la metodología de Kimura *et al.* (1996), basada en el fundamento de la PCR anidada. Esta técnica consiste principalmente en la detección de una secuencia generalmente pequeña de ADN, la cual es amplificada a partir de un producto de mayor tamaño obtenido de un primer PCR sencillo. Los juegos de oligonucleótidos empleados para la detección de WSSV por PCR sencillo y anidada del ciclo de muestreo completo se ilustran en las tabla 1; así mismo, en la tabla 2 se detallan las condiciones de PCR programadas en el termociclador (BIO-RAD) para cada juego de oligonucleótidos.

Tabla 2. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de ADN bacteriano (control) y del WSSV.

| Paso | Temperatura (°C) / Tiempo (min) oligonucleótidos | | |
|------------------------------|---|------------------------|-----------------------|
| | Bacteria (PCR sencillo) | WSSV (PCR sencillo) | WSSV (PCR anidada) |
| | F2C/C | wssv1out/wssv2out | wssv1in/wssv2in |
| 1. Desnaturalización inicial | 95°C/4 min | 95°C/4 min | 95°C/4 min |
| 2. Desnaturalización | 95°C/0.5 min | 95°C/0.5 min | 95°C/0.5 min |
| 3. Hibridación | 60°C/0.5 min | 55°C/0.5 min | 55°C/0.5 min |
| 4. Elongación | 72°C/2 min | 72°C/1 min | 72°C/0.05 min |
| No. de ciclos (pasos 2 al 4) | 32 | 30 | 35 |
| 5. Elongación final | 72°C/5 min | 72°C/5 min | 72°C/5 |

Mezcla de reacción para PCR en punto final: Se prepararon reacciones de 12.5 y 25 µl con la siguiente mezcla de reacción: 1.0X del buffer PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0.5 mM de los dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) (Invitrogen, Cat. No.10297.018), 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Cat. No. 11615-010) y 1 - 2 µL de extracto de ADN.

Se emplearon como controles positivos, ADN extraído de camarones enfermos y productos de PCR de amplificaciones anteriores realizadas en el laboratorio de acuacultura del CIIDIR-IPN (Unidad Sinaloa).

Electroforesis y Foto-documentación. Todos los productos amplificados fueron mezclados con un buffer de carga (0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xilene cianol FF, 30% glicerol en agua) y cargados en pozos de un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X (Tris-Acetato 20 mM, 0.5 mM EDTA y ácido acético glacial, pH 8.3) con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Junto con las muestras de productos de amplificación se cargó un marcador molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen Cat. No. 10787-018) con el fin de estimar el tamaño del fragmento amplificado. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 0.5X durante 45 minutos a 70 - 80 Voltios. La visualización de los productos de ADN en gel fue fotodocumentada en un sistema Chemidoc de BIO-RAD.

VI.2.2.6 Concentración de muestras por ultra-filtración

Las muestras de agua fueron concentradas con el fin de incrementar la probabilidad de detección del WSSV, en caso de encontrarse en muy bajas concentraciones en la columna de agua. Se tomaron dos muestras de agua del estero durante marzo de 2009. Una de ellas fue inoculada con 2 mL de un homogenizado de tejido de camarón infectado con WSSV, con el fin de observar la efectividad del método para concentrar y purificar la muestra. Previo a la ultrafiltración la muestra de agua fue tamizada primero por 100 y 20 μm para retirar las fracciones mayores; cada una de estas fue almacenada para análisis posteriores.

La muestra prefiltrada fue pasada a través de un dispositivo de ultrafiltración tangencial (Dializador Fresenius Hemoflow) de aproximadamente 0.02 μm de tamaño de poro en sus fibras. Las partículas dentro de la muestra de agua fueron concentradas hasta un volumen aproximado de 400 mL mediante una recirculación y

eliminación constante de líquido ($20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), el cual es impulsado por la acción de una bomba peristáltica (Manostat Carter, No. Cat. MFX07536-04).

Cada muestra de agua fue filtrada como se realizó anteriormente para obtener las fracciones planctónicas del nano y picoplancton. Para retener el femtoplancton se empleó un sistema de ultrafiltración (Stirred ultrafiltration cell, Millipore) con membrana de 10,000 Da (Millipore ultrafiltration membrana. Regenerated cellulose, 76 mm) acoplado a un sistema de gas Nitrógeno a presión. De cada fracción incluyendo este último filtrado, se llevó a cabo la extracción de ADN y PCR en punto final siguiendo las condiciones descritas previamente. Adicionalmente, se agregó 1/10 de volumen de acetato de amonio (5 M) del filtrado $< 0.02 \mu\text{m}$ como un procedimiento alternativo para la precipitación del ADN. La mezcla fue incubada a -20°C por 30 min y centrifugada a 14,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado dos veces con etanol al 75%, secado al aire por 5 minutos y resuspendido en $10 \mu\text{L}$ de agua ultrapura para ser utilizado como templado en reacciones de PCR.

Confirmación y cuantificación molecular del WSSV en tejido de camarón.

Los procedimientos que se describen a continuación fueron realizados con el apoyo y bajo la supervisión técnica de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) de la ciudad de Tepic (Nayarit), en las instalaciones del centro multidisciplinario de investigaciones científicas (CEMIC).

Extracción de ADN. Se utilizaron los protocolos proporcionados por los Kits de extracción para PCR cuantitativo en tiempo real (IQ_{REAL}TM WSSV) y semi-cuantitativo anidada (IQ₂₀₀₀TM WSSV) para diagnóstico del WSSV según las especificaciones de la casa comercial. Los camarones presuntivos de la infección fueron proporcionados por la colección de muestras del CEMIC. En la tabla 11 se muestran los códigos de los animales muestreados y con su respectivo método de extracción.

A cada camarón presuntivo para WSSV se le realizó una extracción de ADN a partir de un par de pleópodos. Una vez confirmados por las técnicas de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996), cuantitativo (IQ_{REAL}TM WSSV) y semi-cuantitativo (IQ₂₀₀₀TM WSSV), se procedió a realizar un extracto con la mezcla de tres pares de pleópodos, correspondientes a los camarones identificados con los números 154, 190 y 272.

Purificación y obtención de concentrado de partículas virales. Este procedimiento se basó en el método por centrifugación realizado por Liu *et al.* (2007), el cual utilizó la solución fisiológica buffer de peneido (PPB, por sus siglas en inglés) sugerida por Huang *et al.* (1999). Inicialmente, se realizó una mezcla peso/volumen del tejido de camarón y solución PPB en una proporción 1:4 (60 mg de tejido en 240 µL de solución). El tejido de camarón como se mencionó, estuvo compuesto de un total de 6 pleópodos procedentes de tres camarones confirmados para WSSV.

La mezcla contenida en un tubo eppendorf fue homogenizada primero a bajas revoluciones (3,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C) para sedimentar el material celular grueso. Posteriormente se centrifugó a 9,600 rpm (9,820 g aprox.) por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo a partir del cual se realizó una nueva centrifugación a 12,000 rpm (15,300 g aprox.) durante 75 minutos a 4 °C. El líquido fue decantado y el botón resuspendido en 1.5 mL de PPB. Cada una de las fracciones descartadas (tejido y primer sobrenadante) incluyendo el producto final purificado, fueron recuperadas con el propósito de evaluar por PCR cuantitativo la recuperación de partículas virales.

A cada camarón presuntivo para WSSV se le realizó una extracción de ADN a partir de un par de pleópodos por cada animal. Una vez confirmados por las técnicas de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996), cuantitativo (IQ_{REAL}TM WSSV) y semi-cuantitativo (IQ₂₀₀₀TM WSSV), se procedió a realizar un extracto con la mezcla de tres pares de pleópodos, correspondientes a los camarones con infección severa identificados con los números 154, 190 y 272 (Tabla 11).

El concentrado viral fue dividido en dos volúmenes de 500 µL, uno de ellos fue filtrado a través de una membrana ANODISC de 0.02 µm de diámetro de poro. A ambas porciones del concentrado (filtrado y sin filtrar), junto con las fracciones descartadas del proceso de purificación (tejido y sobrenadante) se destinaron para extracción (kit comercial IQ₂₀₀₀TM WSSV) y análisis de detección y cuantificación de ADN del WSSV. Los resultados de las pruebas anteriores se describen en el anexo 2.

Detección molecular y cuantificación de WSSV por PCR

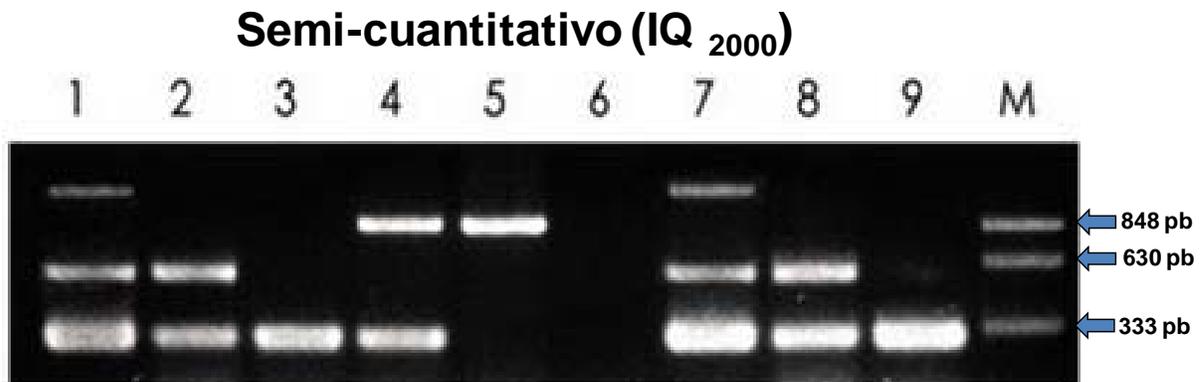
Con el propósito de corroborar la carga viral del purificado del WSSV obtenido de animales enfermos se llevaron a cabo pruebas con la PCR anidada ya mencionada anteriormente, y otros dos métodos de PCR de carácter semi-cuantitativo y cuantitativo que se describirán a continuación. Adicionalmente, estas mismas pruebas fueron aplicadas también con algunas fracciones del micro y nanoplancton de extractos del ciclo de muestreo de 2008.

PCR anidada (Kimura *et al.*, 1999): este método para detección fue descrito previamente en el apartado VII.2.2.5 de la metodología; las condiciones empleadas para la amplificación se mencionan en la tabla 2.

PCR Anidada semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀TM). Así como el método anterior, esta técnica se fundamenta en una PCR anidada. Es usada para diagnóstico rápido de animales y puede diferenciar cuatro grados de infección: muy ligera, ligera, moderada y severa que equivalen respectivamente a $<10^2$, 10^3 , 10^4 y 10^5 copias de ADN del WSSV por 10^4 copias de ADN de camarón⁻¹ (Figura 4). Para la elaboración de la primera mezcla de reacción se uso por cada reacción 7.5 µL de una pre-mezcla de reacción (provista por el fabricante), a la cual se adicionó 0.5 µL de la IQzima DNA polimerasa ($2U \cdot \mu L^{-1}$) y 2 µL de extracto de ADN. En el segundo paso, se agregó

al tubo con el primer producto, la pre-mezcla de la PCR anidada y 1 μL de la IQzima DNA polimerasa ($2\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

Los programas de amplificación del termociclador para ambas PCR fueron diferentes. Primera reacción: se llevó a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s; $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, repitiendo por 5 ciclos; luego $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s; $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s, repetir 15 ciclos; posteriormente, como ciclo final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s; $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30. Segunda reacción: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s; $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, se repitió 25 ciclos; y finalmente un ciclo de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s.



- 1: muestra con infección severa del WSSV
- 2: muestra con infección mediana del WSSV
- 3: muestra con infección ligera del WSSV
- 4: muestra con infección muy ligera del WSSV
- 5: Muestra con infección negativa del WSSV
- 6: Agua tridestilada
- 7: WSSV P(+) estándar, 2000 copias/reacción
- 8: WSSV P(+) estándar, 200 copias/reacción
- 9: WSSV P(+) estándar, 20 copias/reacción
- M: marcador del peso molecular, 848 pbs, 630 pbs, 333 pbs.

Figura 4. Productos de PCR de muestras con diferente grado de infección y estándares de concentración de ADN de WSSV amplificados por el método IQ₂₀₀₀TM para PCR semi-cuantitativo (Tomado de manual del kit IQ₂₀₀₀TM).

PCR cuantitativa (IQ_{REAL}TM). Para este propósito se empleó la técnica de PCR en tiempo real, que determina el número de amplicones o productos de PCR conforme la reacción progresa. Para esta detección el equipo posee un sistema óptico que mide la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación. De esta manera la

cantidad de fluorescencia generada es proporcional a la cantidad de producto de amplificación obtenido, de acuerdo a una curva de calibración realizada con estándares de concentración conocida de número de copias del genoma del WSSV.

La mezcla de reacción se llevó a cabo teniendo en cuenta una proporción de 21 μL de reactivo pre-mezcla para tiempo real, 2 μL de IQzima DNA polimerasa ($2\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 2 μL de extracto de ADN o estándar de ADN de concentración conocida. Las condiciones de PCR fueron: 93 °C por 15 s, 60 °C por 60 s, se repitió por 40 ciclos y luego se llevó a 93 °C por 15 s; 60 °C por 60 s, y esto se repitió 40 ciclos.

En la figura 5 se muestra la curva de calibración realizada por la plataforma SDS (por sus siglas en inglés Sequence Detection Software) para el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems), a partir de los tres estándares de ADN plasmídico del WSSV y de un gen endógeno de camarón de concentración conocida (100,000, 10,000 y 1,000 copias de $\text{ADN}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Hay que mencionar que los estándares de 10 y 100 copias de $\text{ADN}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ fueron eliminados de este análisis debido a la alta dispersión de sus réplicas y ausencia de un buen ajuste lineal.

VI.3 ANÁLISIS DE DATOS

Para facilitar el manejo de la información obtenida en laboratorio, ésta se organizó en matrices utilizando el programa *Microsoft Excel*[®]. Los resultados presentados en este documento incluyen el registro de cada una de las abundancias de los componentes microbianos y microfitoplancton, así como los datos físico-químicos determinados correspondientes a los cinco primeros meses de muestreo (diciembre de 2007 a septiembre de 2008), para las estaciones del sistema lagunar (estero El Tortugón y boca de Macapule). A partir del análisis exploratorio de los datos, se realizaron gráficas de líneas para observar el comportamiento temporal de las variables consideradas.

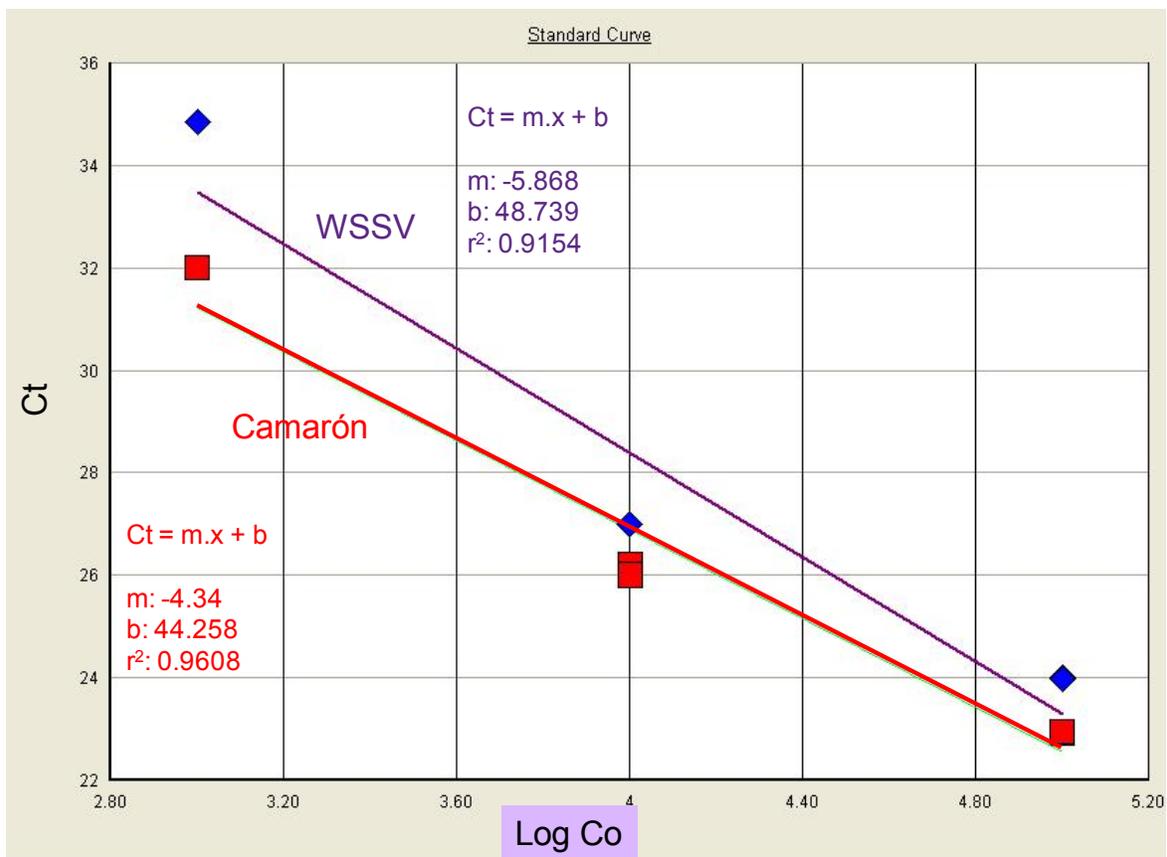


Figura 5. Curva de calibración de estándares de concentración conocida (100.000, 10.000 y 1000 copias de ADN· μL^{-1}). Ct: (Threshold cycle) número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral de detección. Log Co: logaritmo de la concentración de ADN.

Debido a la falta de homocedasticidad en la matriz general de datos ambientales y biológicos se emplearon algunas pruebas no paramétricas a través del paquete estadístico STATISTICA 8.0. Con el propósito de visualizar diferencias entre ambas series de tiempo de cada sitio de muestreo en la laguna se efectuaron algunas pruebas pareadas de Wilcoxon. Se establecieron relaciones entre y dentro de ambos tipos de variables por medio de correlaciones de Spearman (Zar, 2009). Así mismo, para encontrar una mejor explicación de la influencia ambiental sobre los componentes microbianos se efectuó un análisis multivariado de correspondencia canónica (ACC). Previo al ACC, se realizaron algunas transformaciones tanto de las variables ambientales como de los componentes microbianos, que atenuaron las

diferencias observadas (varios ordenes de magnitud) dentro de las concentraciones y las abundancias. Los datos ambientales fueron normalizados con la función logarítmica ($\text{Log}_{10} [x+1]$). A los biológicos, en cambio, se les aplicó una relativización con respecto al máximo valor de cada variable ($X_{ij}/X_{\text{max}j}$), según sugerencias dadas por el paquete estadístico *PC-ord* versión 4 para análisis multivariados de datos ecológicos. Para el análisis general (incluyendo ambos sitios de muestreo) se tomaron quince componentes biológicos y trece variables ambientales; en cada sitio de muestreo, en cambio, se disminuyó el número de estas últimas variables a 12, debido a restricciones del software acerca de exceder el número de observaciones (trece). Dentro del análisis se hicieron 1000 iteraciones de Montecarlo para observar la significancia de los ejes.

En el caso particular de las comunidades microbianas se aplicaron algunos cocientes tales como virus:microorganismo (Wommack & Colwell, 2000), bacterioplancton:nanozoplancton (Sanders *et al.*, 1992) y microorganismo:ciliados heterótrofos, con el fin de inferir posibles acoplamientos y relaciones entre componentes tróficos (depredación, pastoreo y parasitismo)

VII RESULTADOS

VII.1 VARIABLES AMBIENTALES

VII.1.1 Datos meteorológicos

La mayor parte de los datos meteorológicos presentados corresponden a promedios mensuales, exceptuando precipitación pluvial y dirección de los vientos, en los cuales se visualizaron niveles mensuales acumulados y el valor modal mensual, respectivamente. En el caso de los datos de irradiancia solar, se tuvieron en cuenta únicamente aquellos correspondientes a las horas de luz (7:00-19:00 h).

VII.1.1.1 Precipitación pluvial

Durante el estudio la mayor parte de la precipitación se concentró en dos periodos. El primero se registró en diciembre del 2007 y acumuló el 21 % del agua precipitada (102.2 mm), mientras que el segundo periodo correspondiente a julio-septiembre de 2008 alcanzó el 77 % (357 mm). Durante este último, los mayores niveles se registraron en septiembre, representando un 40 % del total de la lluvia (184.4 mm) en el ciclo estudiado (Figura 6a).

VII.1.1.2 Irradiancia solar

Para esta zona latitudinal, la irradiancia solar tiene una marcada fluctuación estacional, que incluye también la influencia negativa por la nubosidad asociada al incremento en los valores de precipitación de agua. Los mínimos promedios mensuales se reportaron consistentemente en los meses de diciembre de 2008 y 2009 (77.3 y $80.0 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente) y en enero de 2008 ($84.6 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y los maximos ($114.5 - 132.8 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en el periodo comprendido entre marzo-julio de 2008 (Figura 6a).

VII.1.1.3 Humedad relativa

Los valores promedio mensuales registraron un intervalo de variación entre 59.0 y 75.1 % a lo largo de año. La tendencia temporal de esta variable presentó acentuados decrementos entre abril - mayo de 2008 y máximos niveles (> 70 %) entre diciembre de 2007 - febrero de 2008, agosto - septiembre de 2008 y en diciembre del mismo año (Figura 6b).

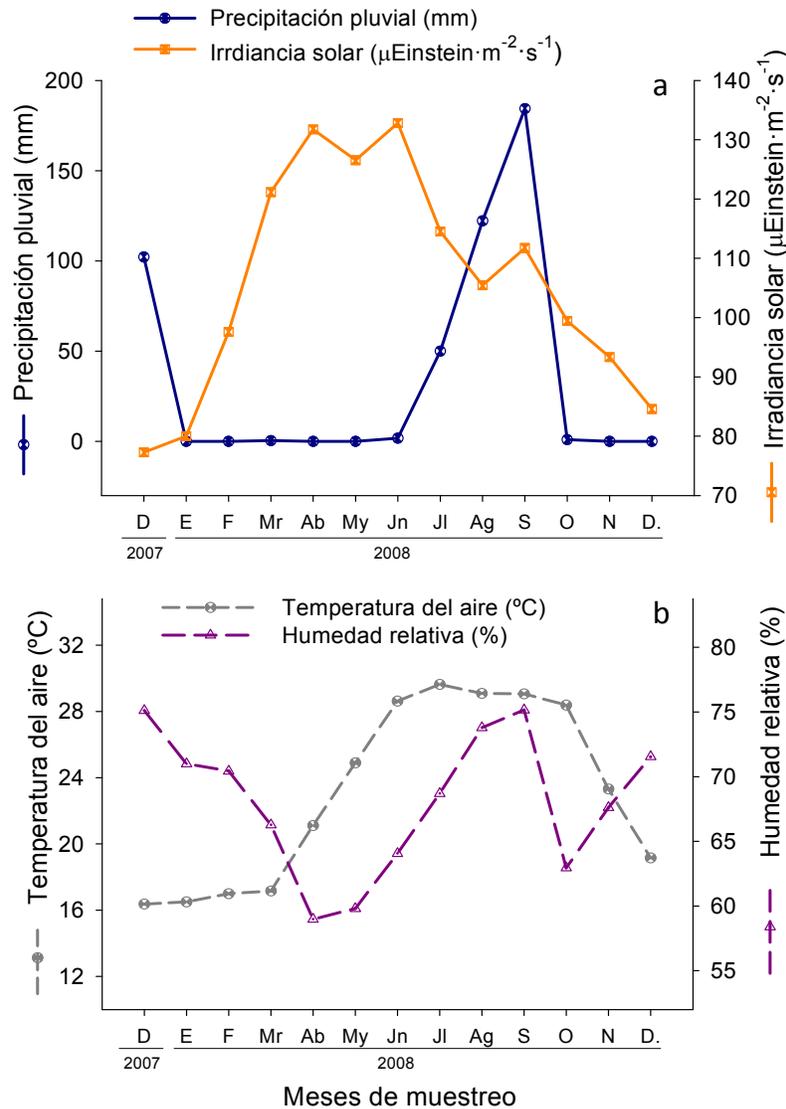


Figura 6. Variación temporal de a) Precipitación de agua e irradiancia solar y b) Temperatura del aire y humedad relativa entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Los valores de temperatura ambiental, humedad relativa e irradiancia son promedios mensuales; los de precipitación corresponden a niveles acumulados mensuales. Datos proporcionados por las estaciones meteorológicas Las Glorias (CIAD-Mazatlan) y El Tortugón (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa).

VII.1.1.4 Temperatura ambiental

Se reportaron valores promedios mensuales entre 16.4 - 29.6 °C durante el ciclo de muestreo. Estos datos revelaron una marcada variación estacional con valores mínimos durante diciembre - marzo de 2008 (16.4 - 17.2 °C) y diciembre de 2007 (19.2 °C), así como máximos entre junio - octubre del mismo año (28.4 - 29.6 °C) (Figura 6b).

VII.1.1.5 Dirección y rapidez del viento

La tendencia temporal reveló un predominio de los vientos del NO y NE e durante los periodos de diciembre de 2007 - febrero de 2008 y marzo - mayo de 2008, respectivamente, con intervalos entre 9.3 - 11.0 km·h⁻¹. No obstante, los máximos valores de rapidez para todo el ciclo de muestreo (11.6 - 13.5 km·h⁻¹) fueron detectados entre junio - julio de 2008 procedentes del SE. Excepto el mes de septiembre, los últimos cinco meses de muestreo registraron vientos procedentes del NE (Figura 7).

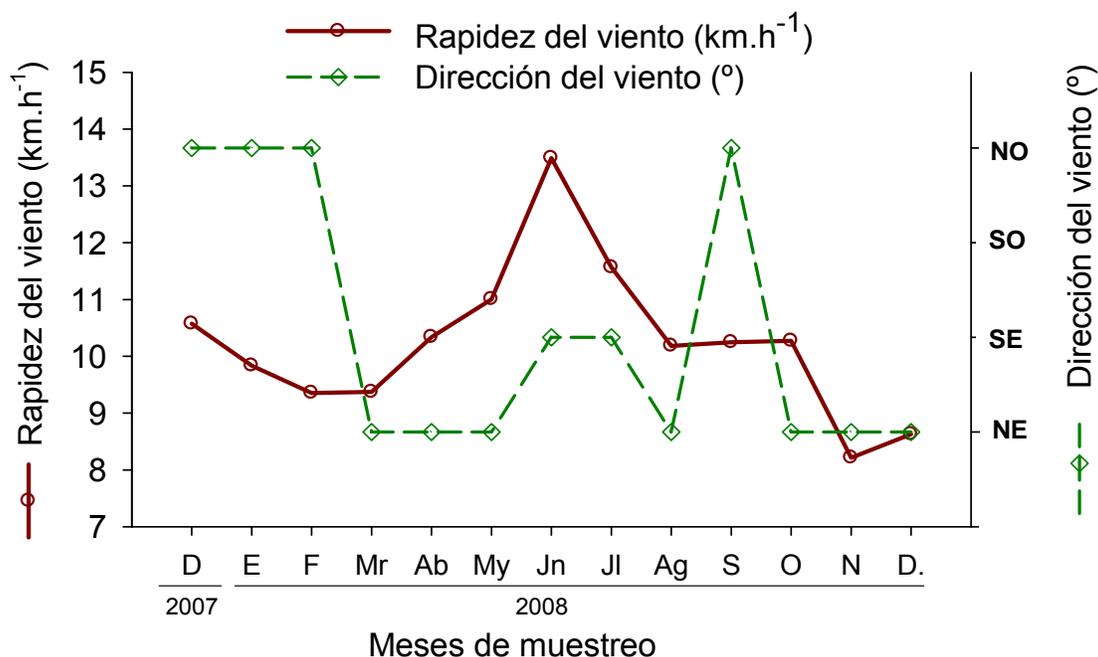


Figura 7. Variación temporal de la velocidad y dirección de los vientos en la zona de estudio entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Noroeste (NO); suroeste (SO); suroeste (SE); noreste. Datos proporcionados por las estaciones meteorológicas Las Glorias (CIAD-Mazatlan), CNA Guasave y El Tortugón (CIIDIR-Sinaloa).

VII.1.2 Hidrografía

Debido a la ubicación de ambos puntos de muestreo, se reconocieron diferencias evidentes en algunas de las características hidrográficas que podrían haber influido en la toma de muestra con el tubo segmentado. La boca de Macapule se encuentra ubicada al noroeste de la laguna y está descrita como una de las entradas más importantes de agua procedente del Golfo de California. A través de ésta, corre un canal estrecho que se continúa a lo largo del sistema y comunica con la boca sur o Bocanita. La constante entrada y salida de agua al sistema debida al flujo y reflujo en concordancia con el ciclo de marea mixta semidiurna, determina las condiciones favorables para que en la boca de Macapule se presenten las mayores profundidades del sistema. El estero El Tortugón, se encuentra al costado noreste, adyacente al canal central de navegación, y es relativamente somero y bordeado por abundante vegetación de manglar. En este estudio, la profundidad de El Tortugón generalmente se mantuvo alrededor de los 1.3 y 4.5 m; en cambio, en la boca de Macapule fluctuó entre los 3.5 y 7 m.

VII.1.3 Medio físico-químico

La temperatura superficial del agua fue generalmente mayor en el estero El Tortugón que en la boca de Macapule, excepto durante diciembre de 2007 y 2008 y octubre de 2008 (Figura 8a). Los intervalos de variación de temperatura tanto en el estero (17.9 °C - 32.6 °C) como en la boca (16.5 °C y 31.8 °C) fueron consistentes con temperatura ambiental (Spearman; $p < 0.05$) y las estaciones climáticas durante el ciclo anual. La temperatura superficial del agua registro una tendencia a incrementar sus valores a partir de enero del 2008 hasta julio del mismo año, manteniendo niveles altos hasta septiembre; los meses siguientes se caracterizaron por un descenso gradual hasta diciembre. Los incrementos más importantes fueron reportados entre febrero-marzo y mayo - junio de 2008. Con base en estos datos de temperatura superficial se definió una temporada climática fría comprendida entre diciembre de 2007 - mayo de 2008 caracterizada por niveles inferiores a los 25 °C y una cálida entre mayo - noviembre de 2008 (Figura 8a).

El pH presentó niveles entre 7.6 - 8.2, registrando una tendencia estacional marcada en la boca con valores menos alcalinos durante los meses fríos (diciembre de 2007 - mayo de 2008). En el estero el comportamiento del pH fue fluctuante, sin una estacionalidad definida, y con un intervalo menor de variación. Los máximos valores no se observaron simultáneamente para ambos sitios (marzo y junio en el estero y la boca, respectivamente), no obstante, coincidieron en algunos repuntes (Figura 8b).

Los niveles de salinidad observados a lo largo del ciclo anual, indicaron el predominio de condiciones marinas (Figura 8c). Su oscilación fue independiente en ambos puntos de muestreo, aunque menos fluctuante en la boca (34 - 39 ups) con relación al estero (33 - 40 ups). Los máximos valores correspondieron a diciembre de 2007 y junio de 2008 en el estero y julio de 2008 en la boca (Figura 8c). Durante el período cálido se observó cierta tendencia a la disminución de la salinidad en ambos puntos de muestreo, lo que aparentemente es coherente con el periodo de mayor precipitación.

La profundidad del disco Secchi mostró fuertes diferencias espaciales y temporales, indicando menores transparencias del agua en el estero El Tortugón, especialmente en los lapsos de tiempo comprendidos entre abril - junio de 2008 y septiembre - octubre del mismo año (< 0.65 m). Este último periodo coincidió también con las menores transparencias en la boca (< 1.15 m), junto con enero - marzo de 2008 (Figura 8d). En términos de la profundidad de la capa fótica, la irradiación solar abarcó casi toda la columna de agua, excepto en los meses de enero y marzo en ambas estaciones, y entre septiembre - octubre en la boca (Anexo 1).

La concentración de oxígeno disuelto en ambas estaciones fluctuó de manera similar durante los meses cálidos, con valores generalmente mayores en la boca que en el estero, exceptuando diciembre de 2007 y marzo de 2008 (Figura 8e). Los niveles más altos en la boca se registraron durante enero - marzo ($6.6 - 7.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y septiembre de 2008 ($7.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); igualmente, máximas concentraciones en el estero fueron observadas este último mes ($6.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) junto con diciembre de 2007 ($6.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). El porcentaje de saturación de oxígeno siguió una tendencia similar a los

niveles de concentración de oxígeno disuelto, sin embargo, los valores se incrementaron considerablemente en los meses cálidos (Figura 8f).

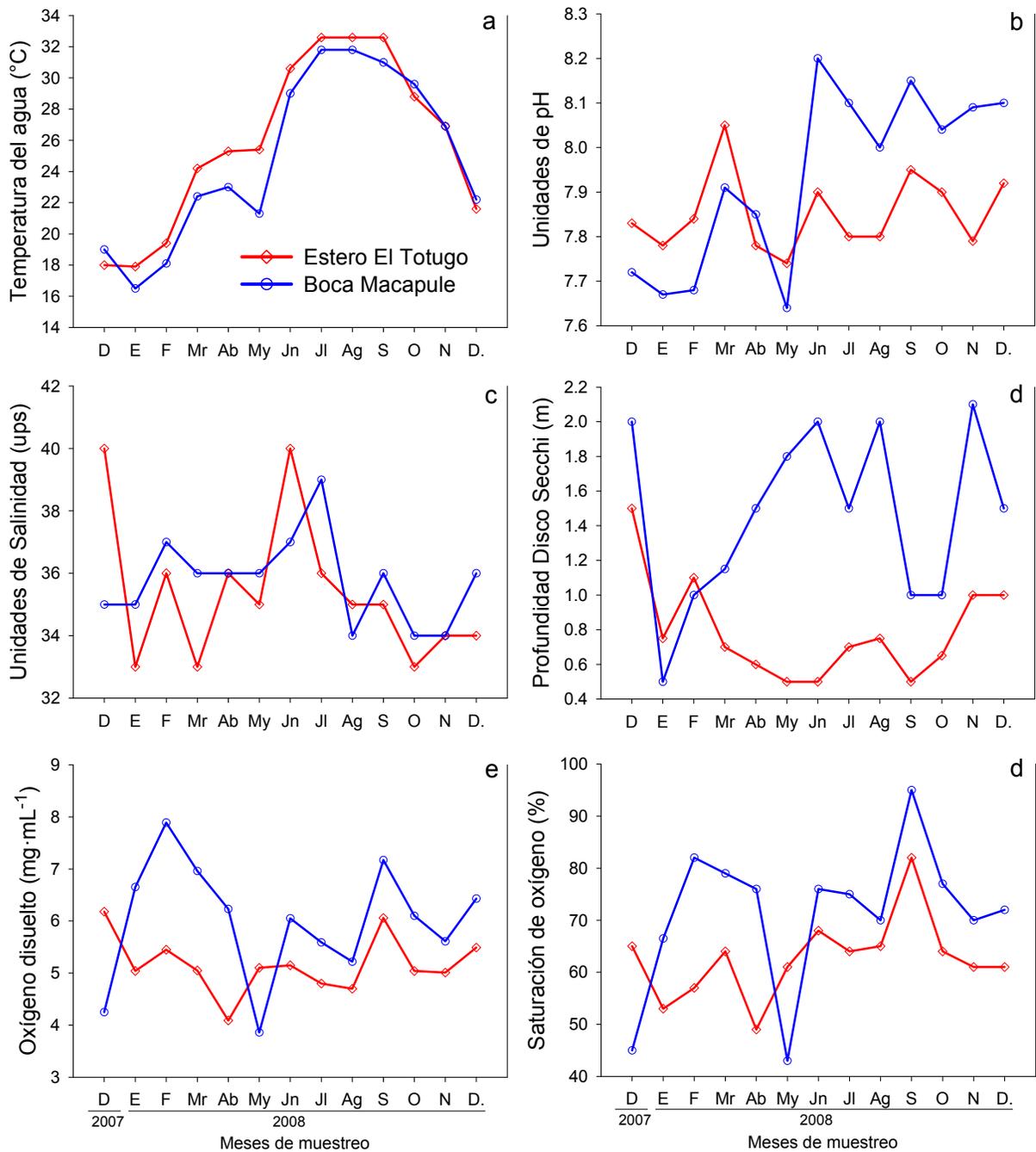


Figura 8. Variación temporal de: a) temperatura; b) pH, c) salinidad; d) profundidad del disco Secchi; e) concentración de oxígeno y f) porcentaje de saturación de oxígeno en las estaciones del estero El Tortugón y la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008.

VII.1.4 Nutrientes inorgánicos disueltos

La mayor parte de las especies de especies de nutrientes inorgánicos disueltos presentaron mayores niveles durante los meses más fríos (Figura 7). La dinámica temporal de cada elemento (N, P y Si) fue diferente. Particularmente, se observó una correlación negativa del NID con los valores de temperatura superficial del agua (Spearman= -0.56; $p < 0.05$) y positiva con la dirección e intensidad de los vientos procedentes del NO (Spearman= -0.55; $p < 0.05$). Las diferencias entre las concentraciones de ambos lugares carecieron de significancia (Wilcoxon; $p > 0.05$), exceptuando la concentración de ácido silícico y la proporción Nitrógeno:Sílice (N:Si) (Figura 9b, c).

VII.1.4.1 Nitrógeno

El Nitrógeno inorgánico disuelto (NID), fue generalmente alto en el período frío (diciembre de 2007 – abril de 2008) con respecto al cálido (mayo – noviembre de 2008), excepto tal vez por un bajo valor observado en marzo en la estación del estero (4.6 μM) (Figura 9a). La mayor concentración de NID fue detectada en diciembre (estero: 21.1 μM ; Boca: 17.7 μM) debido al aporte de altas concentraciones de la forma reducida y especialmente de las oxidadas. Bajas concentraciones en ambas estaciones se detectaron en junio (estero: 2.9 μM ; boca: 1.7 μM) y también en mayo y en agosto del 2008 para la boca (1.5 μM) y el estero (2.4 μM), respectivamente.

El amonio fue la forma nitrogenada predominante a lo largo del estudio, siguiendo un patrón similar al del NID, con excepción de algunos meses en los que las formas oxidadas fueron más importantes (Figura 9a). Los máximos niveles de amonio se reportaron en enero de 2008 (estero: 14.5 μM ; boca: 11.1 μM), sin embargo, se observó un repunte importante en la boca durante abril (12.4 μM). Las menores concentraciones de amonio en ambos sitios de muestreo se registraron en

los meses cálidos, fluctuando desde el rango de indetectable ($<0.1 \mu\text{M}$) en mayo de 2008 hasta niveles de 6.8 (septiembre) y $2.7 \mu\text{M}$ (agosto) en el estero y la boca, respectivamente (Figura 9a). Los nutrientes oxidados no fueron la excepción a la tendencia estacional, presentando rasgos similares en ambos sitios de muestreo con máximos valores únicamente en diciembre del 2008 (estero: $12.2 \mu\text{M}$; Boca: $9.8 \mu\text{M}$) y mínimos concentrados en los meses cálidos ($< 3.8 \mu\text{M}$) (Figura 9a).

VII.1.4.2 Fósforo reactivo

El anión PO_4^- también denominado como Fósforo inorgánico disuelto (FID) difirió temporalmente del patrón estacional observado para el NID, caracterizándose por altos valores al final del periodo frío e inicios del cálido. En la mayoría de los muestreos los niveles fueron superiores en el estero El Tortugón, exceptuando el pico más relevante en la boca durante mayo ($2.7 \mu\text{M}$) que precedió al máximo valor detectado para El Tortugón en junio ($3.4 \mu\text{M}$). A pesar de estas diferencias, ambos sitios coinciden con menores niveles ($<1.9 \mu\text{M}$) durante el resto del ciclo de muestreo (Figura 9b).

VII.1.4.3 Silicio

La variación del ácido silícico registró mayores concentraciones en el estero que en la boca de Macapule. Sin embargo, ambos lugares mostraron una tendencia mas o menos similar hasta mayo de 2008, con máximos niveles en marzo del mismo año que fueron aproximadamente dos veces más elevados en el estero ($138.5 \mu\text{M}$) que en la boca de Macapule ($72.3 \mu\text{M}$). A partir de mayo los niveles de este ión en la estación de la boca se mantuvieron constantes y bajos con un mínimo en diciembre de 2008 ($1.2 \mu\text{M}$); por otra parte, dos importantes repuntes fueron observado en el estero para junio ($94.9 \mu\text{M}$) y noviembre ($94.9 \mu\text{M}$) de 2008 (Figura 9b).

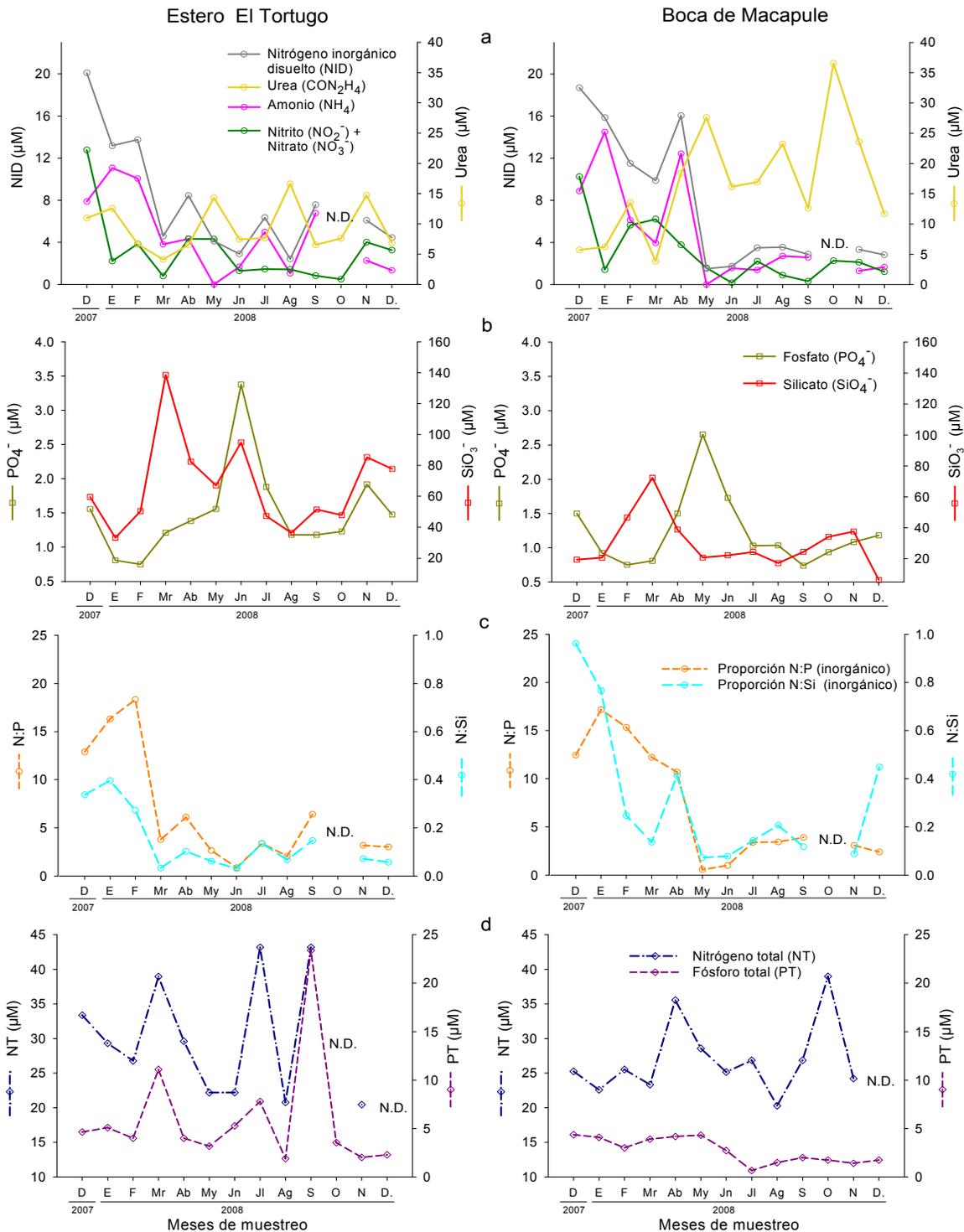


Figura 9. Variación temporal de: a) Amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) + nitrato (NO_3^-), Nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y urea; b) fosfatos (PO_4^-) y ácido silícico (SiO_3^-); c) Proporciones N:P y N:Si. d. Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (PT) en el estero El Tortugón y la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. N.D.= No hay dato.

VII.1.4.4 Razón N:Si:P (inorgánico)

En cuanto a las proporciones de los nutrientes inorgánicos Nitrógeno:Fósforo (N:P) y Nitrógeno:Sílice (N:Si), en todos los casos se presentó limitación por Nitrógeno (<16:1 y <1:1, respectivamente), exceptuando los meses de enero y febrero de 2008, que revelaron aparentemente un estado de equilibrio y/o ligera limitación por fósforo (Figura 9c). Estacionalmente, la condición más limitante se observó durante el período cálido y en el mes de marzo 2008 en el estero, coherentemente con los mínimos niveles de NID y máximos a medios valores de fosfatos y ácido silícico registrados (Figura 9b).

VII.1.5 Nutrientes orgánicos disueltos

Muchos compuestos orgánicos importantes, tales como aminoácidos, ácidos nucleicos y expolímeros, entre otros, se encuentran constituyendo una gran proporción del Carbono y Nitrógeno disuelto en ambientes acuáticos. En este trabajo particularmente, no se determinaron las concentraciones de Carbono orgánico disuelto y/o Nitrógeno orgánico disuelto. Sin embargo, fue posible el análisis de urea, que es una fracción importante y altamente labil del Nitrógeno disuelto para el crecimiento de algunos organismos osmotróficos en en este tipo de sistemas. Las principales fuentes de este compuesto son las aguas procedentes de actividad agrícola, aguas municipales, la remineralización de la materia orgánica y la excreción de invertebrados y protozoarios.

VII.1.5.1 Urea.

Las tendencias de este compuesto orgánico fueron particularmente diferentes en ambas estaciones (Wilcoxon; $p < 0.05$) a diferencia de los patrones de la mayoría de los nutrientes inorgánicos. En el estero los valores fluctuaron sinusoidalmente entre 4.1 y 14.7 μM , con altos valores en enero, mayo, agosto y noviembre de 2008 alternados con meses de menores concentraciones que alcanzaron el mínimo valor

en marzo (Figura 9a). Por otra parte, la boca de Macapule mostró registros elevados con respecto al lugar anterior; sin embargo, sus bajos niveles ($<13.5 \mu\text{M}$) se concentraron en los meses más fríos (diciembre de 2007 – marzo de 2008) y subsecuentemente los altos en los cálidos. Dentro de este último periodo se resaltaron algunos meses como mayo, agosto octubre y noviembre por sus máximos niveles alcanzados (Figura 9a).

VII.1.6 Nitrógeno y Fósforo total

Las concentraciones de NT y FT presentaron mayores fluctuaciones y magnitudes en el estero El Tortugón que en la boca de Macapule (Figura 7d), aunque estadísticamente las diferencias entre ambas estaciones de muestreo sólo fueron significativas para FT (Wilcoxon; $p < 0.05$). Concentraciones máximas y mínimas de NT y FT siguieron una tendencia común en el estero detectándose altos valores en marzo (NT: $39.0 \mu\text{M}$; FT: $11.1 \mu\text{M}$), julio (NT: $43.2 \mu\text{M}$; FT: $7.8 \mu\text{M}$) y septiembre de 2008 (NT: $43.2 \mu\text{M}$; FT: $23.4 \mu\text{M}$) alternados con periodos de notables disminuciones (Figura 7d). En la boca de Macapule en cambio, los picos más sobresalientes de NT se reportaron en abril ($34.5 \mu\text{M}$) y octubre de 2008 ($39.0 \mu\text{M}$). Para esta misma estación, el FT registró valores ligeramente bajos y poco fluctuantes con respecto al estero, sin embargo, en los meses fríos éstos fueron ligeramente superiores ($3.9 - 4.4 \mu\text{M}$) que en el periodo contemplado entre junio y diciembre de 2008 ($< 2.7 \mu\text{M}$) (Figura 9d).

La fracción del NT libre de la porción inorgánica disuelta (NID), es decir la fracción orgánica más la inorgánica particulada, tuvo meses cálidos de ambos sitios de muestreo. Un comportamiento ligeramente opuesto fue observada con la fracción del FT exenta de Fósforo inorgánico disuelto (FID), predominando proporciones mayores al 64 % durante los meses más fríos (Figura 10a, b).

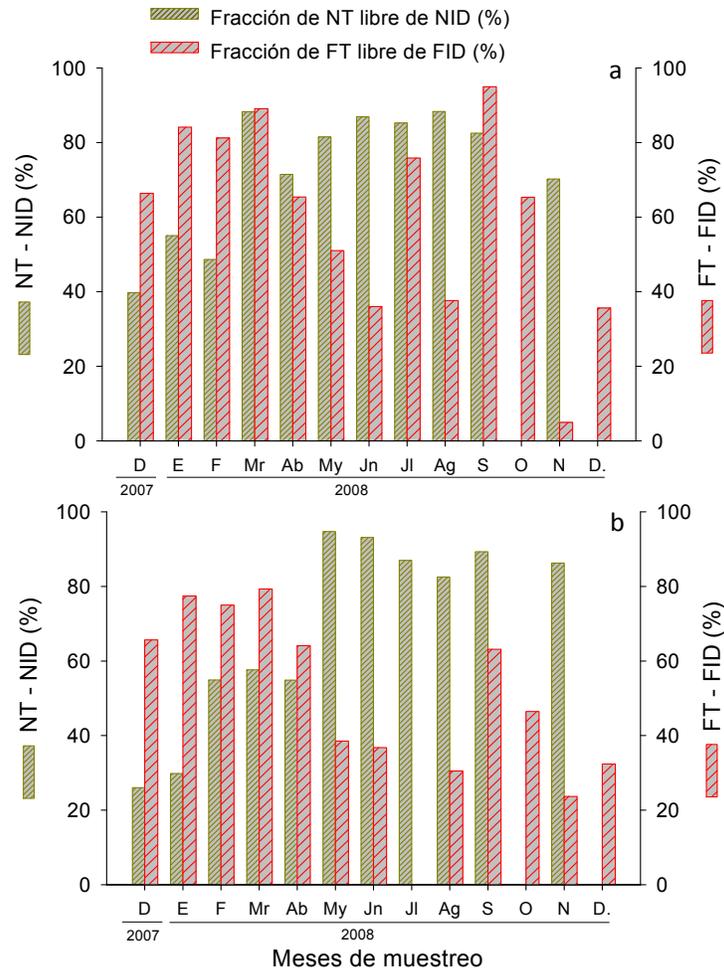


Figura 10. Variación temporal de la fracción del Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (FT) libre de las porciones inorgánicas disueltas (NID y FID) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008.

altas contribuciones en la mayoría de los muestreos. Sin embargo, estacionalmente presentó una tendencia a encontrar porcentajes superiores al 81.5 % del NT en los Densidad de componentes microbianos

VII.1.7 Virioplancton, bacterioplancton y picoplancton autótrofo

En general las densidades de picoplancton autótrofo (PA), bacterioplancton (BP) y virioplancton (PSV) fluctuaron alrededor de un orden de magnitud a lo largo del período de estudio (Figura 11a, b). BP y PSV fluctuaron conjuntamente (Spearman= 0.51; $p < 0.05$), presentando valores altos durante la temporada fría con respecto a los meses más cálidos, sin embargo, diciembre de 2007 fue la excepción reportando las menores densidades junto con septiembre de 2008. Esta tendencia

fue quizás menos pronunciada para BP en la boca de Macapule, registrando bajas concentraciones entre diciembre del 2007- febrero de 2008 y en diciembre de 2008. Altas abundancias se observaron en marzo (estero: $1.49 \times 10^7 \pm 2.46 \times 10^5$ cél·mL⁻¹; boca: $1.53 \times 10^7 \pm 9.63 \times 10^4$ cél·mL⁻¹) y máximas durante octubre ($1.65 \times 10^7 \pm 1.04 \times 10^6$ cél·mL⁻¹) y noviembre de 2008 ($1.63 \times 10^7 \pm 8.42 \times 10^5$ cél·mL⁻¹) en el estero siendo este último mes coherente también con un importante repunte en la boca de Macapule ($1.33 \times 10^7 \pm 8.94 \times 10^4$ cél·mL⁻¹) (Figura 11a, b).

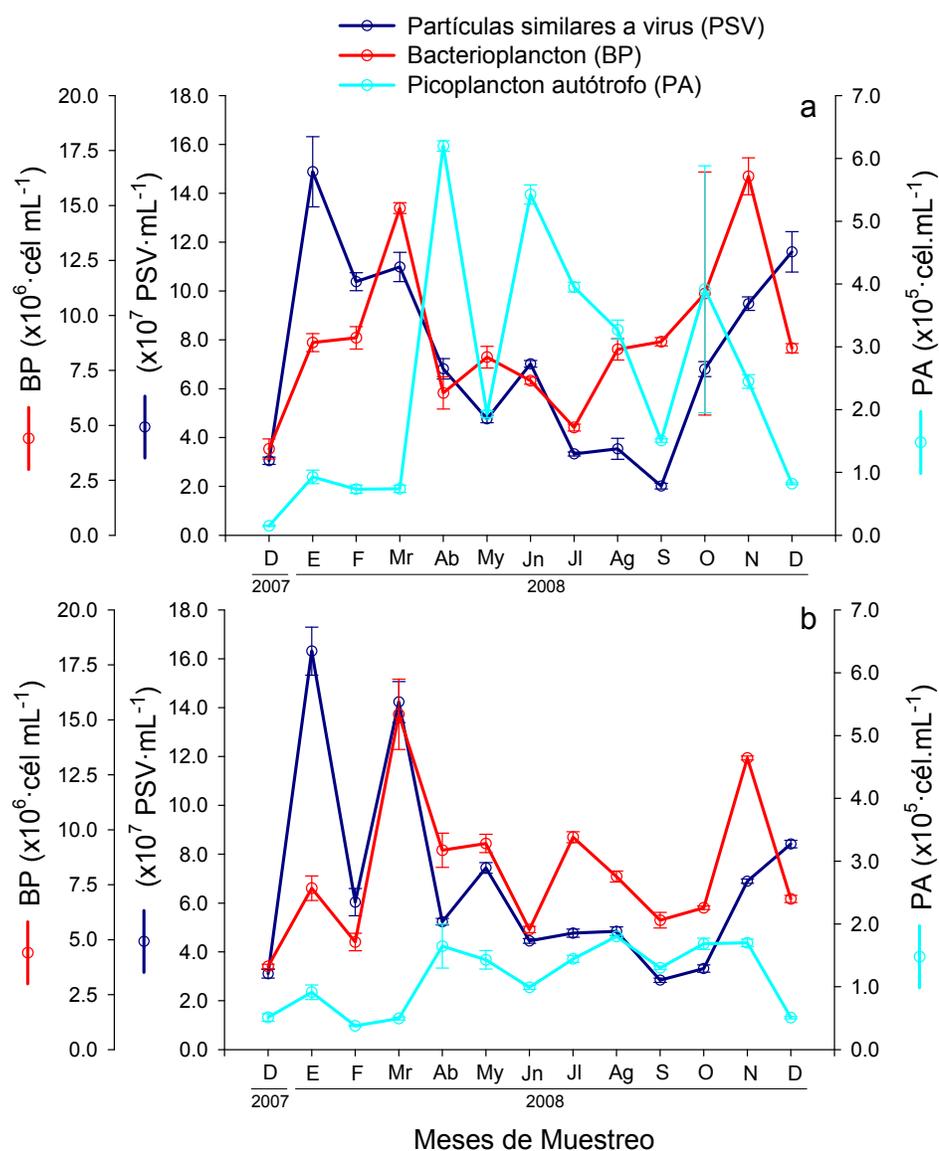


Figura 11. Variación temporal de la densidad de virioplancton (PSV), bacterioplancton (BP) y picoplancton autótrofo (PA) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

Los mayores registros de PSV para ambos sitios de muestreo se observaron en enero de 2008 (estero: $1.49 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^7$ PSV·mL⁻¹; boca: $1.63 \times 10^8 \pm 9.82 \times 10^6$ PSV·mL⁻¹) con algunos repuntes importantes en marzo del mismo año (estero: $1.10 \times 10^8 \pm 6.01 \times 10^6$ PSV·mL⁻¹; boca $1.42 \times 10^8 \pm 8.40 \times 10^6$ PSV·mL⁻¹) y diciembre de 2008 en el estero ($1.16 \times 10^8 \pm 8.29 \times 10^6$ PSV·mL⁻¹) (Figura 11a, b).

Durante todo el estudio el PA estuvo dominado por cianobacterias cocoides, sin embargo, algunos pico-eucariontes fueron detectados en altas abundancias durante julio y octubre. A diferencia del PSV y BP, este componente presentó un patrón estacional opuesto, así como marcadas disimilitudes entre ambos sitios de muestreo (Wilcoxon= 2.76; $p < 0.05$) relacionadas principalmente con sus magnitudes. Sus abundancias fueron relativamente bajas (1.5×10^4 - 9.3×10^4 cél·mL⁻¹) y poco fluctuantes en el período más frío comprendido entre diciembre de 2007 y marzo de 2008, observándose valores ligeramente superiores en el estero. A partir de abril de 2008, fueron registrados incrementos de alrededor de un orden de magnitud que fueron sostenidos hasta noviembre de 2008. Durante este período cálido las densidades fueron considerablemente más altas y fluctuantes en el punto del estero con relación a la boca. Para diciembre de 2008, las concentraciones de PA llegaron a ser muy similares a las observadas al inicio del ciclo de muestreo (Figura 11a, b).

VII.1.8 Nanoplancton autótrofo y heterótrofo

Las concentraciones promedio de nanofitoplancton (NF) y nanozooplancton (NZ) difirieron en ambas estaciones (Wilcoxon; $p < 0.05$) y fueron generalmente mayores en la estación del estero El Tortugón (NF: 9.77×10^3 cél·mL⁻¹; NZ: 1.77×10^3 cél·mL⁻¹) que en la boca (NF: 6.0×10^3 cél·mL⁻¹; NZ: 2.62×10^3 cél·mL⁻¹), con excepción de enero, marzo y julio de 2008 para NF y este último mes también para NZ (Figura 12a, b).

Temporalmente, ambos componentes nanoplanctónicos siguieron tendencias diferentes, registrándose mayores densidades para el NF durante todo el estudio. El NZ en cambio, presentó una disminución progresiva hasta abril de 2007 manteniendo bajos valores hasta el final del ciclo de muestreo (Figura 12a, b). Durante el periodo de estudio varias proliferaciones de NF fueron detectadas, siendo las más importantes en magnitud las correspondientes a los meses de julio y octubre del 2008 en ambas sitios de muestreo y en noviembre del mismo año para el estero; todas ellas correspondieron a pequeños nanoflagelados (<5 μm) del género *Pyramimonas* (Prasinophyta). Así mismo, se reportaron proliferaciones en marzo de 2008 de pequeñas diatomeas céntricas (<20 μm) y nanoflagelados del género *Heterosigma* (Raphidophyta) para la boca y el estero, respectivamente. Para este último lugar, la densidad de la proliferación alcanzó $4.60 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y coincidió también con los máximos niveles de clorofila *a* detectados ($201.1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) en este estudio (Figura 12a y 15a).

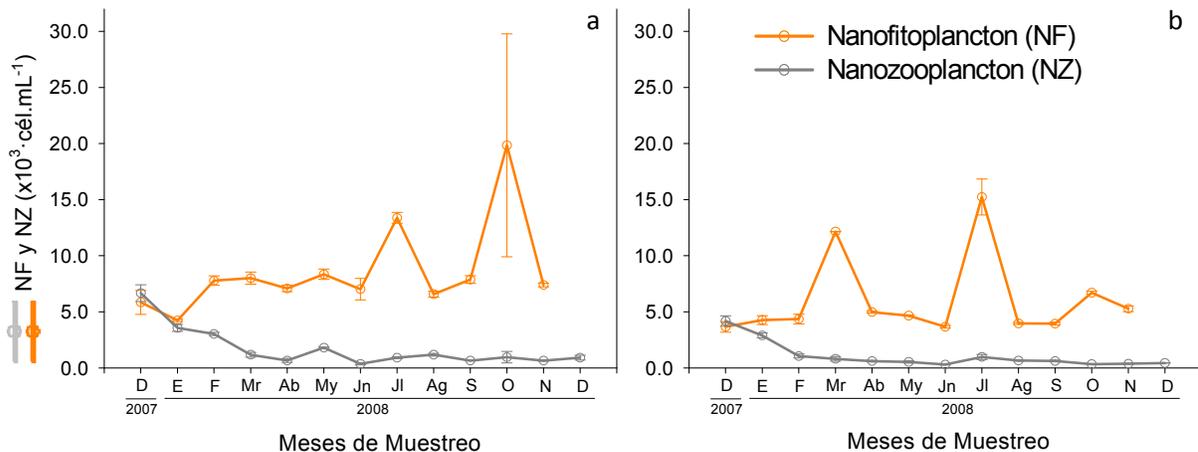


Figura 12. Variación temporal de la densidad de nanofitoplancton (NF) y nanozooplancton (NZ) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

El NZ que presentó mayores abundancias al principio del ciclo de muestreo (estero: $6.67 \times 10^3 \pm 7.42 \times 10^2 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$; boca: $4.19 \times 10^3 \pm 4.61 \times 10^2 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$), reportó una disminución progresiva de aproximadamente un orden de magnitud hasta junio

de 2008, manteniendo bajas y moderadas densidades hasta el final del muestreo ($<1.43 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 12a, b).

Es importante resaltar que en la estación de la boca durante abril, fueron registrados tricomas cortos de cianobacterias de aproximadamente 1 a 2 μm de ancho y de longitud variable (hasta de 25 μm aproximadamente), cuyas densidades alcanzaron $7.86 \times 10^3 \pm 1.28 \times 10^2 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas fracciones fueron observadas únicamente en 1000X, sin embargo, no fueron incluidas dentro del NF, ni los tricomas del componente microplanctónico.

VII.2 DENSIDAD DE COMPONENTES MICROPLANCTÓNICOS

VII.2.1 Microfitoplancton

En general el microfitoplancton total (MF) siguió la variación temporal del componente silicio, es decir el grupo compuesto por diatomeas (CE: centrales; PE: penales) y silicoflagelados (SF) que fue el más abundante dentro del período de estudio, excepto en marzo y junio de 2008, siendo el grupo de los dinoflagelados el predominante en ambas estaciones. A pesar de que cianobacterias en tricomas fueron evidentemente más numerosas en el estero durante los meses cálidos (junio-octubre de 2008), estos componentes no fueron considerados en el total del MF (Figura 13a).

Las densidades del componente silicio registraron diferencias temporales en ambos sitios de muestreo (Wilcoxon= 2.41; $p < 0.05$). Éstas radicaron principalmente en los altos números observados en la boca entre febrero - abril de 2008 ($4.27 \times 10^2 - 1.45 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) y entre noviembre y diciembre del mismo año ($7.58 \times 10^2 - 1.22 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$); así como por un incremento en el estero hacia finales del periodo cálido, que alcanzó máximos valores en septiembre ($1.47 \times 10^3 \pm 9.6 \times 10^1 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 11a). Durante este periodo las densidades del estero llegaron a ser casi tres veces superiores que en la boca y la estructura comunitaria del grupo silicio fue

notablemente diferente, caracterizándose por un predominio de diatomeas pequeñas y poco silicificadas de los géneros *Pseudonitzschia* y *Cylindrotheca* (Figura 13b).

Ambas estaciones coincidieron con altas densidades de dinoflagelados (DF) entre marzo - abril de 2008, con valores superiores en la boca de Macapule. Durante el periodo cálido las densidades de DF fueron ligeramente superiores en el estero, exceptuando junio que corresponde a un importante repunte en la boca (Figura 13b). A pesar de las tendencias observadas entre ambos sitios, no se registraron diferencias significativas (Wilcoxon= 0.10; $p > 0.05$) (Figura 13a).

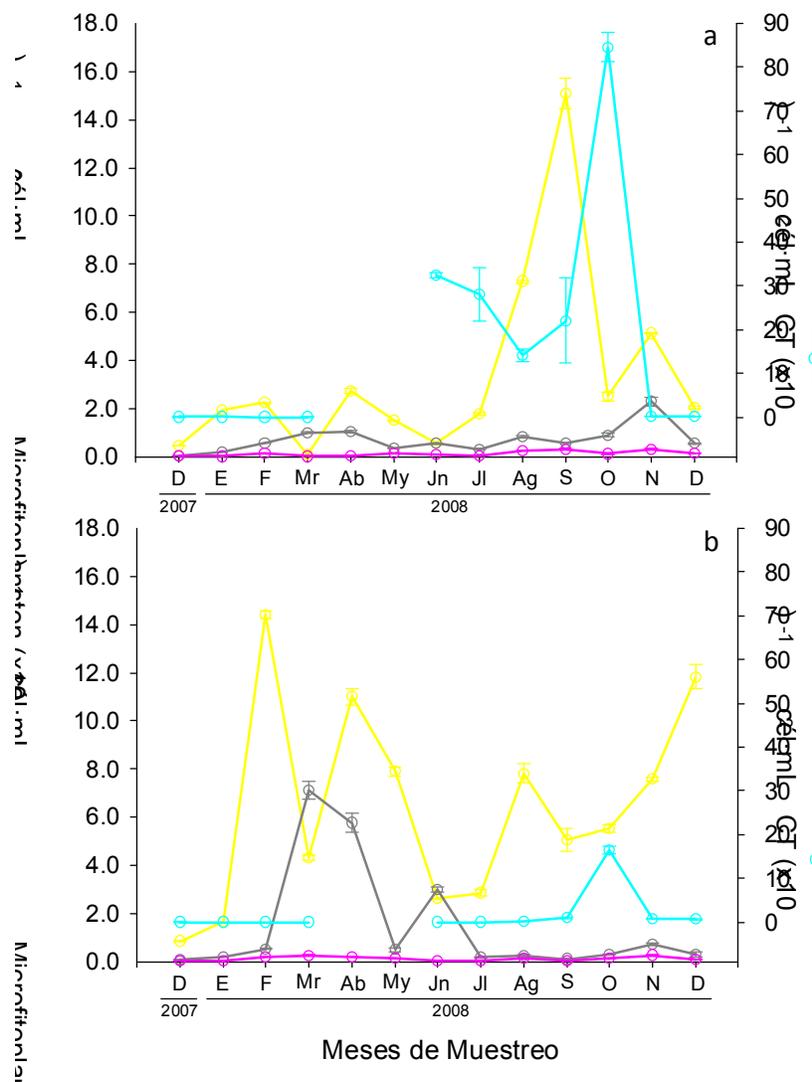


Figura 13. Variación temporal de la densidad de los componentes microfitoplanctónicos en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

El grupo de los fitoflagelados (FF), por otra parte, mantuvieron valores de abundancia bajos y menos fluctuantes con respecto a los demás componentes del microfitoplancton. A pesar de ello, ambas estaciones mostraron máximas densidades en noviembre, así como entre marzo - abril y agosto-septiembre de 2008 del mismo año, en la boca y el estero, respectivamente. La densidad de cianobacterias en tricomas (CT) fue generalmente mayor en el estero El Tortugón durante la mayor parte del periodo cálido (junio - octubre de 2008) y eventualmente ausente en el periodo frío para la boca (Figura 13a, b).

VII.2.2 Grupo Ciliophora

En general, la mayor proporción de organismos microzooplanctónicos estuvo representada por organismos unicelulares del Phylum Ciliophora. No obstante, dentro de este grupo también fue cuantificado por separado la especie *Myrionecta rubra*, caracterizado por su simbiosis obligada con una alga crisófitas que le confiere su capacidad mixótrofa (Taylor *et al.*, 1969; Lindholm, 1985). De este último componente (CA) se registraron densidades relativamente bajas ($<23 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante el periodo de estudio, exceptuando una proliferación observada en enero de 2008 para ambos sitios (estero: $1.18 \times 10^2 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$; boca: $77 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 14). Adicionalmente, se observaron pequeños incrementos en el estero entre agosto y noviembre de 2008 (Figura 12a, b), los cuales posiblemente contribuyeron a la variabilidad observada entre ambos sitios de estudio (Wilcoxon= 0.87; $p < 0.05$).

A diferencia de *M. rubra*, la densidad de ciliados heterótrofos (CH) registró mayores fluctuaciones en la boca de Macapule, así como algunas diferencias estacionales entre ambas estaciones; contradictoriamente, estas diferencias no fueron significativas (Wilcoxon= 3.06; $p > 0.05$). Las mayores densidades en la boca de Macapule se concentraron entre marzo-mayo de 2008 y noviembre del mismo año, con máximos valores en el primer mes ($1.22 \times 10^2 \pm 1.0 \text{ ind}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 14b). Densidades menores de CH fueron registradas en el estero, sin embargo altas

abundancias se detectaron en los meses cálidos, principalmente en junio (48 ± 1.9 ind·mL⁻¹) y septiembre (49 ± 3 ind·mL⁻¹) y noviembre (49 ± 5 ind·mL⁻¹) (Figura 14a).

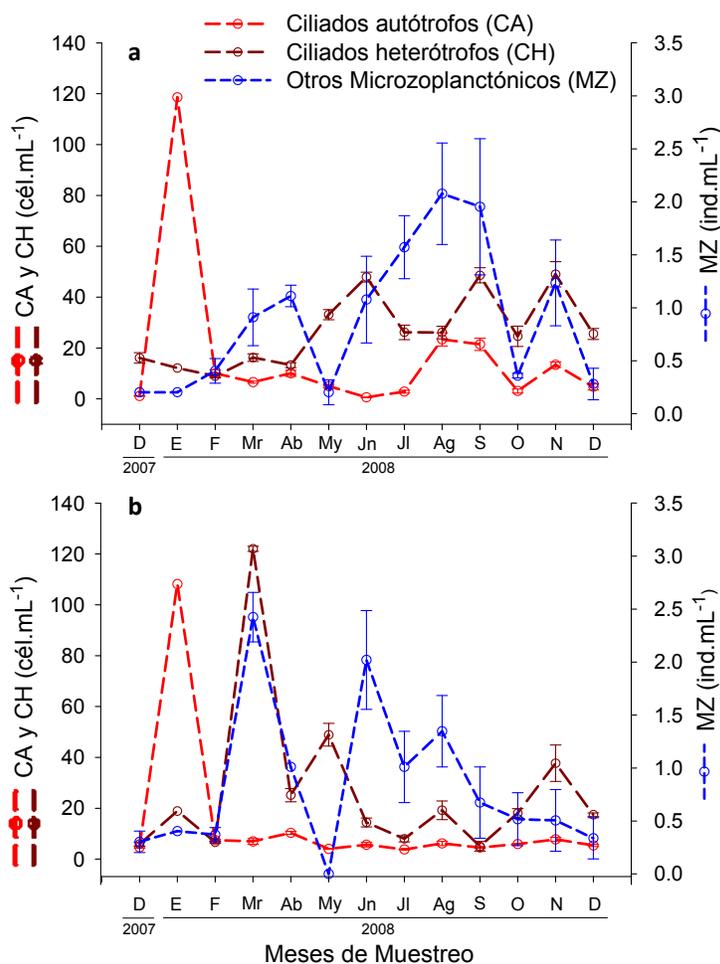


Figura 14. Variación temporal densidad de los ciliados autótrofos (CA), ciliados heterótrofos autotróficos (CH) y otros grupos microzooplanctónicos (MZ) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

VII.2.3 Otros grupos microzooplanctónicos

Simultáneamente al recuento de microfitoplancton y ciliados, se enumeraron otros organismos microzooplanctónicos (MZ), que en su mayoría pertenecieron a pequeños estadios larvarios de microcrustáceos (Nauplio), de algunos copépodos y

eventualmente rotíferos. El comportamiento y magnitud de MZ en ambas estaciones de muestreo fue diferente, sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas (Wilcoxon= 0.38; $p > 0.05$). Se registraron tres periodos con altas densidades en cada estación de muestreo. En el estero estos incrementos correspondieron a marzo-abril, junio-septiembre y noviembre de 2008 (Figura 12a); mientras que en la boca se presentaron como esporádicos repuntes en marzo, junio y agosto del mismo año (Figura 14b). No obstante, hay que resaltar que las máximas densidades se presentaron en el primer y segundo periodo para la boca y el estero, respectivamente, siendo este último el más prolongado y abundante en el periodo cálido.

VII.3 CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES FOTOSINTÉTICOS

VII.3.1 Clorofila a

Esta variable presentó ligeras diferencias temporales entre ambos sitios de muestreo, sin embargo no fueron estadísticamente significativas (Wilcoxon= 0.24; $p > 0.05$). La concentración más sobresaliente fue registrada en el estero El Tortugón ($201.1 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) durante marzo de 2008; con excepción de este valor y los observados entre septiembre y noviembre ($13.4 - 21.9 \cdot \text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$), los demás meses fueron más bajos y poco fluctuantes ($< 7.8 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) (Figura 15a, b). La estación de la boca de Macapule, a diferencia de la anterior, mostró un patrón estacional más claro detectándose mayores niveles durante los meses fríos. Dentro de este periodo, el máximo incremento se observó en febrero de 2008 ($17.6 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) seguido de un descenso continuo que alcanzó mínimos valores en agosto ($3.7 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$), y finalmente repunto en diciembre ($11.6 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$) (Figura 15a, b).

La mayor densidad de los componentes fotosintéticos tanto en el estero como la boca fue aportada por el PA, cuyos órdenes de magnitud se encontraron alrededor de 10^1 a 10^2 y 10^2 a 10^3 veces más grandes que NF y MF, respectivamente (Figura 16a, b). Este comportamiento fue recurrente casi todo el período de estudio y representó en casi todos los muestreos más del 90% de los organismos

fotosintéticos. El NF mostró generalmente una contribución superior a la del total de autótrofos en el estero El Tortugón. Las mayores proporciones de NF se observaron en diciembre de 2007 (28.1%) y 2008 (14.2 %) en el estero, y entre febrero-marzo de 2008 (8.3-14.3 %) en la boca; no obstante, este último periodo junto con diciembre de 2008 también coincidieron con las mayores contribuciones de MF. La proporción del MF fue casi siempre mayor en la boca, y rara vez superó el 1% del total de componentes autotróficos en ambas estaciones (Figura 16a, b).

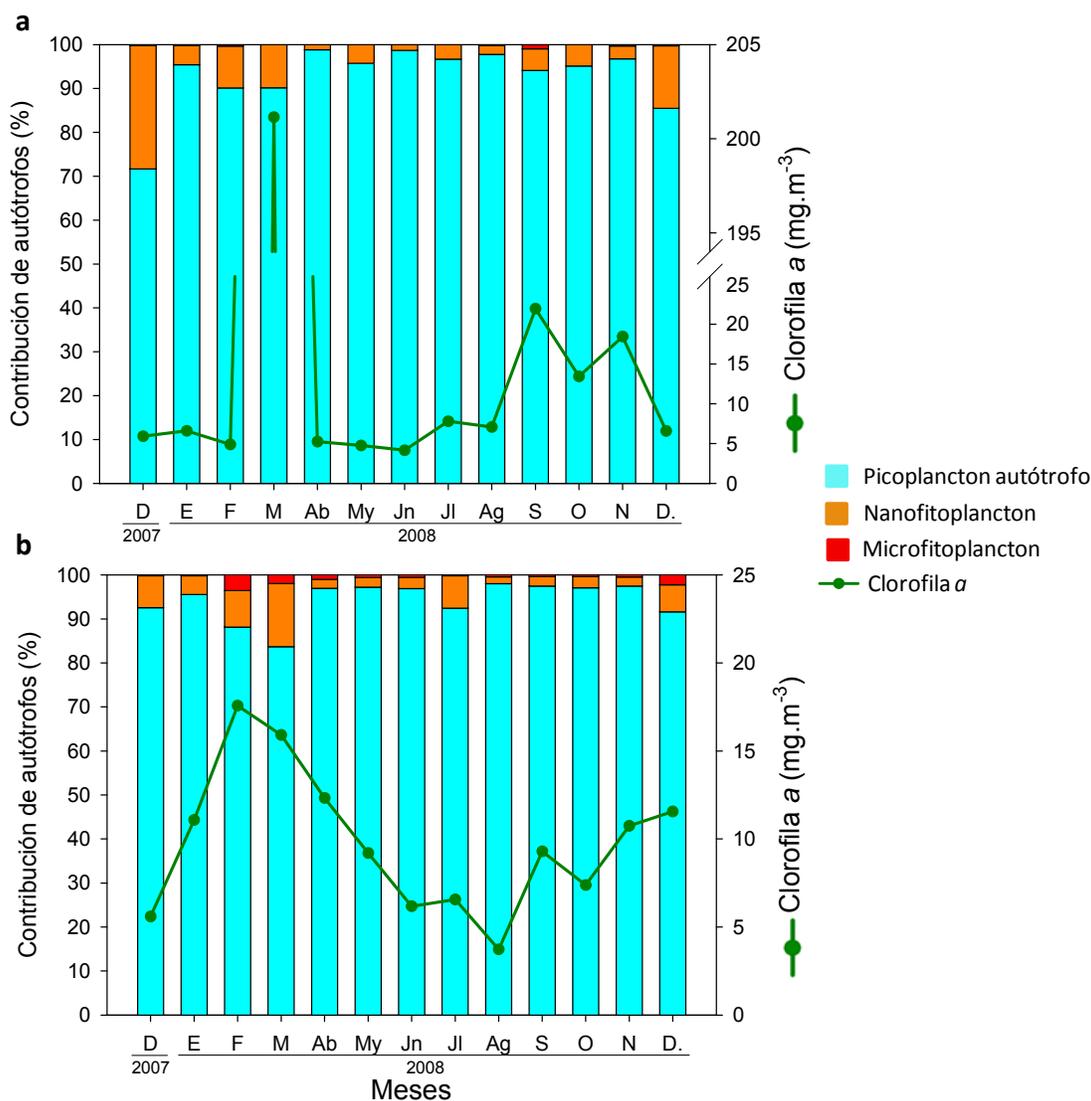


Figura 15. Variación temporal de la clorofila a y la contribución porcentual de los componentes autotróficos (PA, NF y MF) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

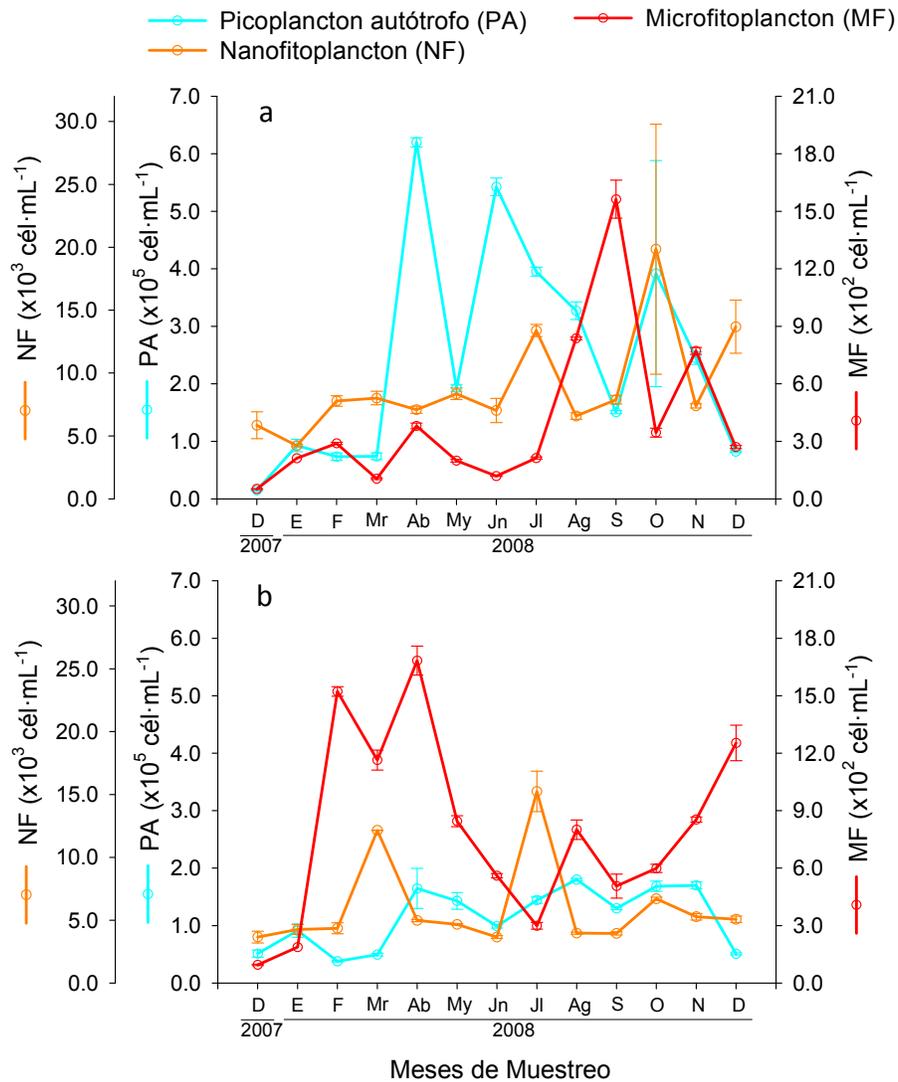


Figura 16. Variación temporal de la densidad de los componentes autotróficos (PA; NF y MF) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

Las mayores concentraciones de Clo a estuvieron al parecer asociadas al componente autotrófico de mayor tamaño. No obstante, el máximo valor detectado durante marzo de 2008 en el estero, fue posiblemente la señal de la proliferación del nanoflagelado de género *Heterosigma* (Figura 15a).

VII.4 RELACIONES ENTRE LOS COMPONENTES PLANCTÓNICOS

VII.4.1 Control viral

A través de la razón virus:microorganismo, se ha inferido en varios trabajos la presión del control por lisis viral sobre algunos componentes microbianos. A pesar de que el BP es el hospedero potencial más abundantes en la columna de agua, muchos virus que infectan y controlan a varios grupos de eucariotas planctónicos, llegan también a alcanzar densidades importantes. En este trabajo, los mayores valores de razón virus:bacterioplancton (RVB) se presentaron durante los meses fríos de 2008, incluyendo noviembre-diciembre, con un máximo en enero para ambas sitios de muestreo. De igual manera, esta tendencia fue repetitiva con las razones calculadas a partir de virus:nanofitoplancton (RVN_F) y virus:picoplancton autótrofo (RVP_A) (Figura 17a, b).

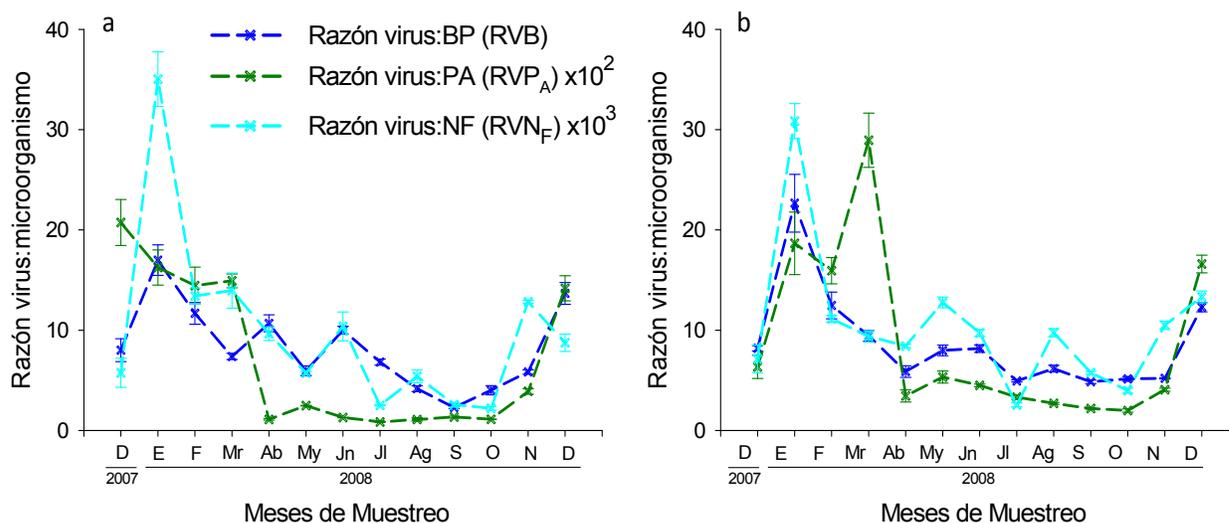


Figura 17. Variación temporal de las razones virus:microorganismo ($V:BP$, $V:P_A$ y $V:N_F$) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

VII.4.2 Depredación por nanozooplancton

Valores de la proporción bacterioplancton:nanozooplancton (RBN_Z) cercanos a $10^3:1$ fueron observadas en ambos sitios durante los primeros tres muestreos y entre el

periodo noviembre-diciembre de 2008 únicamente en la boca (Figura 18a, b). A partir de marzo de 2008 y abarcando la mayor parte de la temporada cálida, los cocientes llegaron a alcanzar en algunos meses valores de un orden de magnitud superior a los del inicio del ciclo de muestreo ($> 10^4:1$); generalmente, menos fluctuantes RBN_Z fueron reportados en la boca de Macapule para este periodo (Figura 18a, b).

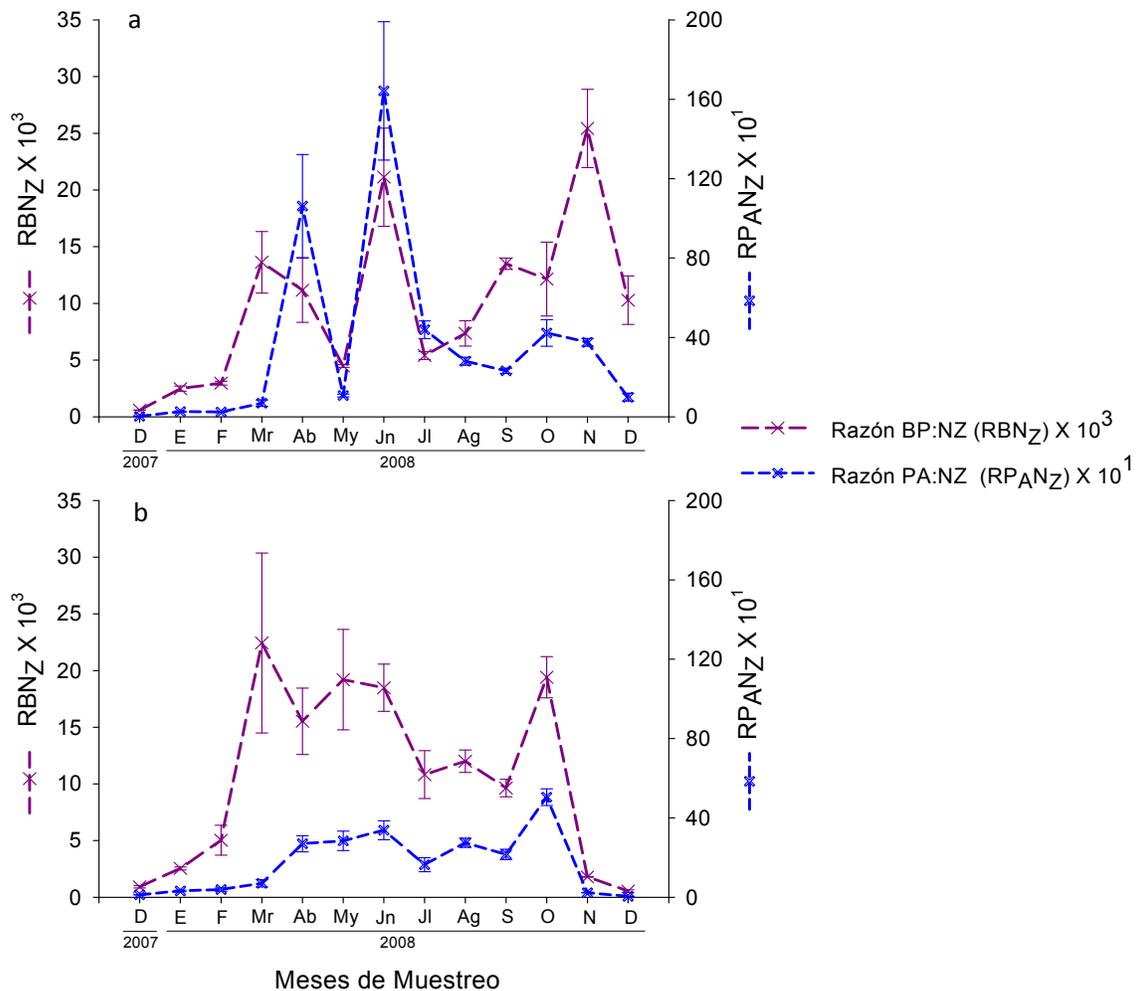


Figura 18. Variación temporal de las razones bacterioplancton:nanozooplancton (RBN_Z) y razones picoplancton autótrofo:nanozooplancton (PAN_Z) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

En este trabajo fue también calculada la razón picoplancton autótrofo:nanozooplancton ($RPAN_Z$), tratando de explorar posibles conexiones entre ambos componentes, partiendo de la consideración de que el NZ es también

depredador activo de los componentes del PA. El comportamiento del RP_{AN_Z} fue más o menos similar al observado en RBN_Z , sin embargo, esta proporción fue mucho menor en la boca. Así mismo, diferencias de aproximadamente dos ordenes de magnitud fueron observados en abril y junio de 2008 en el estero, con respecto a los bajos niveles del inicio del ciclo de muestreo (Figura 19a, b).

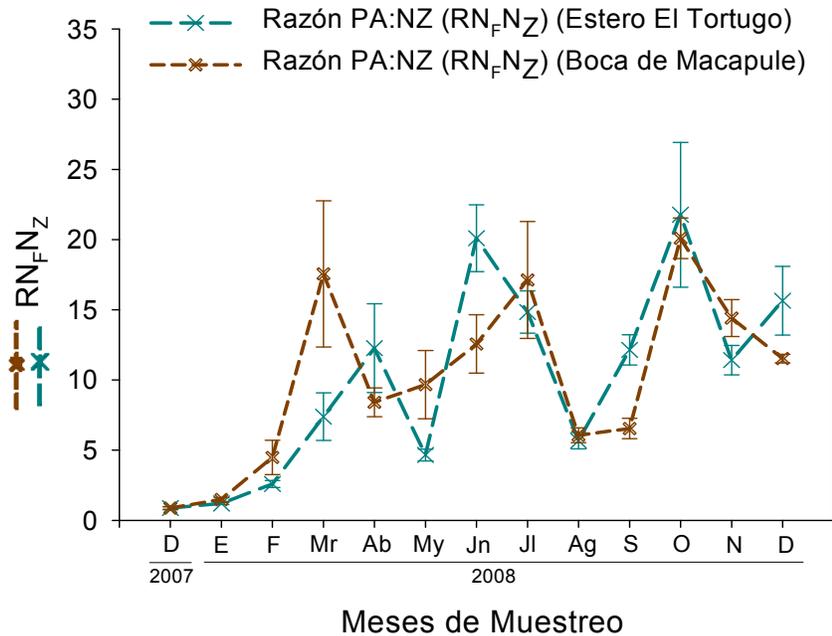


Figura 19. Variación temporal de las razones nanofitoplancton:nanozooplancton ($RN_{F}N_{Z}$) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule (b) entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

En cuanto a la relación nanofitoplancton:nanozooplancton $NF:NZ$ ($RN_{F}N_{Z}$), ambas estaciones reportaron patrones diferentes en cuanto a la variación temporal de los cocientes $RN_{F}N_{Z}$, sin embargo se distinguió un aumento desde el inicio del ciclo de muestreo en el período frío hasta junio y julio de 2008 en el estero y la boca, respectivamente. En cada punto de muestreo se observaron tres importantes repuntes, que en el caso de la boca fueron coherentes con las proliferaciones de NF en marzo, julio y octubre de 2008 (Figura 19b); el estero en cambio, solo este último mes coincidió con la máxima densidad de NF, mientras que los demás incrementos del cociente estuvieron asociados a fuertes descensos en la densidad de NZ en abril y junio de 2008 (Figura 19a, b).

VII.4.3 Depredación por ciliados heterótrofos

Tratando de comprender el posible control por depredación por parte de CH se calcularon algunos cocientes a partir de las densidades de los grupos microbianos (Figura 20a, b).

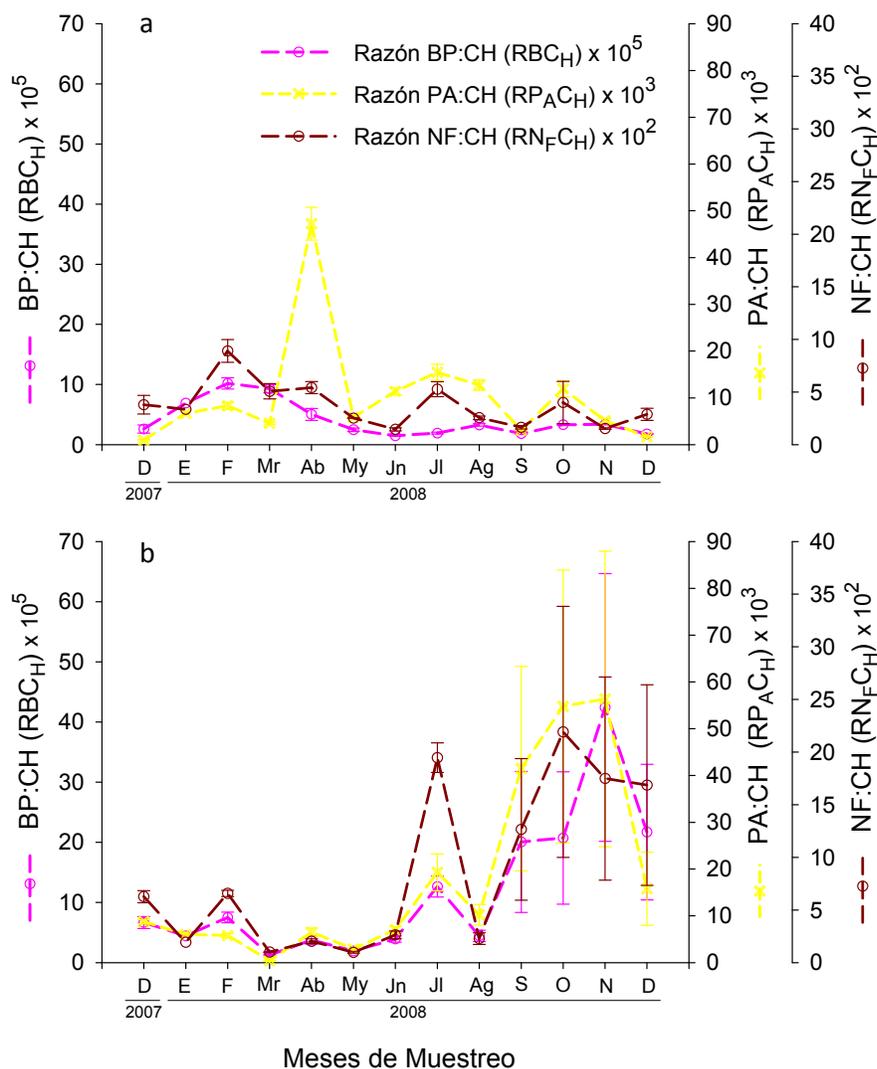


Figura 20. Variación temporal de las razones microorganismo:ciliados heterótrofos (BP:CH, PA:CH y NF:CH) en: a) el estero El Tortugón y b) la boca de Macapule (b) entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Las barras indican el error estándar.

La dinámica temporal de estas proporciones estimadas a partir de CH con BP (RBC_H), PA ($RP_{A_C H}$) y NF ($RN_{F_C H}$) fueron diferentes entre puntos de muestreo. En la boca de Macapule los menores valores, es decir posibles incrementos en la presión por pastoreo, fueron detectados en primavera y comienzos del verano (marzo-junio); mientras tanto, en el estero El Tortugón ésta misma condición fue observada en los meses cálidos excepto con $RP_{A_C H}$ (Figura 20). A diferencia de este último sitio, la boca registró valores generalmente altos y fluctuantes, con números altos a finales del periodo cálido e inicios del periodo frío indicando en general fuerte variabilidad estacional en el control de CH sobre los componentes planctónicos pequeños (Figura 20b).

VII.5 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LOS COMPONENTES MICROBIANOS Y MICROPLANCTÓNICOS

Disponiendo de las matrices de datos tanto biológicos como ambientales evaluados en este trabajo, se pudo llevar a cabo un análisis de correspondencia canónica (ACC) con el fin de evaluar el comportamiento de los componentes microbianos y microplanctónicos en relación con características físicas y químicas imperantes del sistema lagunar.

Considerando los datos de ambas estaciones de la Laguna de Macapule, los dos primeros ejes explicaron alrededor del 32 % de la varianza total de los grupos microbianos y las condiciones ambientales, correspondiendo 19.2 % para el primer eje. De acuerdo a la prueba de Montecarlo solo este último eje fue estadísticamente significativo (Tabla 3). La gran mayoría de los muestreos correspondientes al periodo frío se agruparon en el cuadrante izquierdo del primer eje en el diagrama de ordenación. Estos meses se ubicaron en función a las altas concentraciones de nutrientes nitrogenados inorgánicos y mayores cocientes N:P y N:Si. En el sentido opuesto, es decir en la magnitud positiva del primer eje, la temperatura superficial del agua reveló la mayor correlación, seguida por el FID y el pH. Como era de esperarse, los muestreos del periodo cálido estuvieron asociados a los mayores niveles de temperatura, sin embargo, esta tendencia fue más clara para los datos del estero.

Algunos meses correspondientes a periodos de transición como abril, mayo, noviembre y diciembre del 2008 en ambas estaciones y marzo del mismo año en la boca, no mostraron una clara diferenciación entre temporada cálida y fría (Figura 21).

Tabla 3. Porcentajes de la varianza explicada y acumulada de los primeros tres ejes de ordenación obtenidos del ACC a partir de los datos del estero El Tortugón, la boca de Macapule y el total de datos de la Laguna de Macapule. * Según la prueba de Montecarlo no hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel del 95% ($p > 0.05$). VE: Varianza explicada. VA: Varianza acumulada.

| Sitio de muestreo | Varianza (%) | | | | | |
|---|--------------|------|-------|-------|-------|-------|
| | Eje 1 | | Eje 2 | | Eje 3 | |
| | VE | VA | VE | VA | VE | VA |
| Estero El Tortugón | 25.2 | 25.2 | 20.2 | 45.5 | 16.3 | 61.8 |
| Boca de Macapule | 26.5 | 26.5 | 22.0 | 48.6 | 14.6 | 63.2 |
| Laguna de Macapule (todos los datos) | 19.2 | 19.2 | 13.0* | 32.2* | 7.9* | 40.1* |

En la figuras 22 a la 23 se representan a través de diagramas de ordenación la visualización gráfica de estas correlaciones entre los componentes planctónicos y las variables ambientales evaluadas para cada sitio muestreo.

Para el estero El Tortugón y la boca de Macapule los dos primeros ejes explicaron un 45.5 % y 48.6 % de la variabilidad total, respectivamente. A diferencia del ACC anterior (con todos los datos de la laguna), los tres primeros ejes fueron significativos para cada sitio de muestreo según la prueba de Montecarlo (Tabla 3). El estero, siguió aparentemente el patrón general para el primer eje de ordenación presentado anteriormente, aunque con mayores valores de correlación de las variables ambientales (temperatura, FID, nutrientes nitrogenados inorgánicos y proporciones N:P y N:Si). La variación explicada en éste primer eje para el estero (25 %) reflejó mayor importancia a las abundancias de CH, MZ, PA, CT, NZ, PSV, CA y CE, siendo estos cuatro primeros grupos, aquellos que presentaron una ubicación

hacia el costado derecho del plano, dominado por la influencia de niveles positivos del vector temperatura del agua y FID (Figura 20).

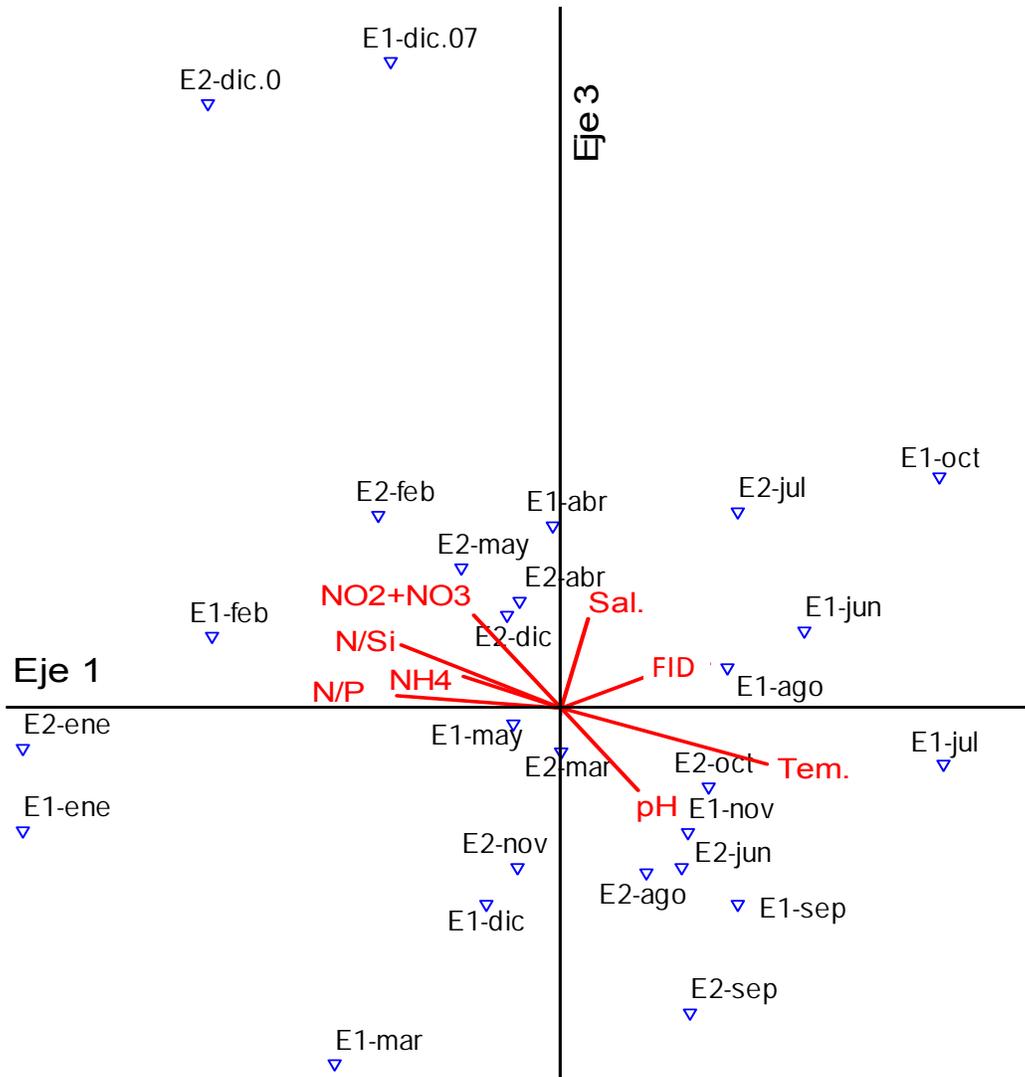


Figura 21. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los meses de muestreo (triángulos azules) y las variables ambientales (vectores) en el espacio del primer y tercer ejes de ordenación para la Laguna de Macapule. E1 y E2 hacen referencia al estero El Tortugón y la Boca de Macapule, respectivamente.

El primer eje del plano de ordenación para la boca de Macapule no fue excepción a este patrón general, sin embargo presentó ligeras diferencias. Aparentemente los nutrientes nitrogenados oxidados no tuvieron participación en

este eje. Sin embargo, se incluyeron otras variables como NT y urea en el extremo positivo que influyeron junto con la temperatura del agua en la agrupación estacional de los componentes biológicos de afinidad cálida. Durante este periodo los componentes CT, SF, DF y PE respondieron positivamente a estas variables mencionadas (Figura 22b). Por otra parte, la concentración NH_4^+ y las razones N:Si y N:P exhibieron mayor influencia sobre los grupos con alta participación en el periodo frío (NZ y CA y PSV).

En el estero El Tortugón, la tendencia de la urea y la proporción N:Si explicaron la distribución de las abundancias de diatomeas (PE y CE), SF y CA para el sector positivo del segundo eje del plano de ordenación. En este mismo sitio, la concentración de Clo *a* junto con las densidades de CT y NF estuvieron directamente influenciadas por la variabilidad del NT y SiO_3 en el extremo opuesto del eje. Para la boca de Macapule, el sector negativo del segundo eje estuvo representado por SF, DF y MZ que a su vez estuvieron definidos por el comportamiento de la salinidad y el FT. Para el extremo positivo del segundo eje, los componentes de CT y CA estuvieron aparentemente afectados por la urea y el NT (Figura 22a).

Para los resultados del estero, el tercer eje reveló que la salinidad y la concentración de FID rigen la distribución de CT, PA y ambas fracciones del nanoplancton (NA y NZ) en el cuadrante positivo del plano de ordenación (Figura 23a). En el extremo opuesto, en cambio, las densidades de SF y la concentración de Clo *a* estuvieron influenciadas por el SiO_3^- . En el costado negativo de la boca, los nutrientes inorgánicos oxidados rigieron el comportamiento de las abundancias de CE y FF en del tercer eje. En el sentido opuesto, en cambio, las densidades de CA, CT y SF fueron mejor correspondidas por la variabilidad del NH_4^+ , NT y la temperatura del agua (Figura 23b).

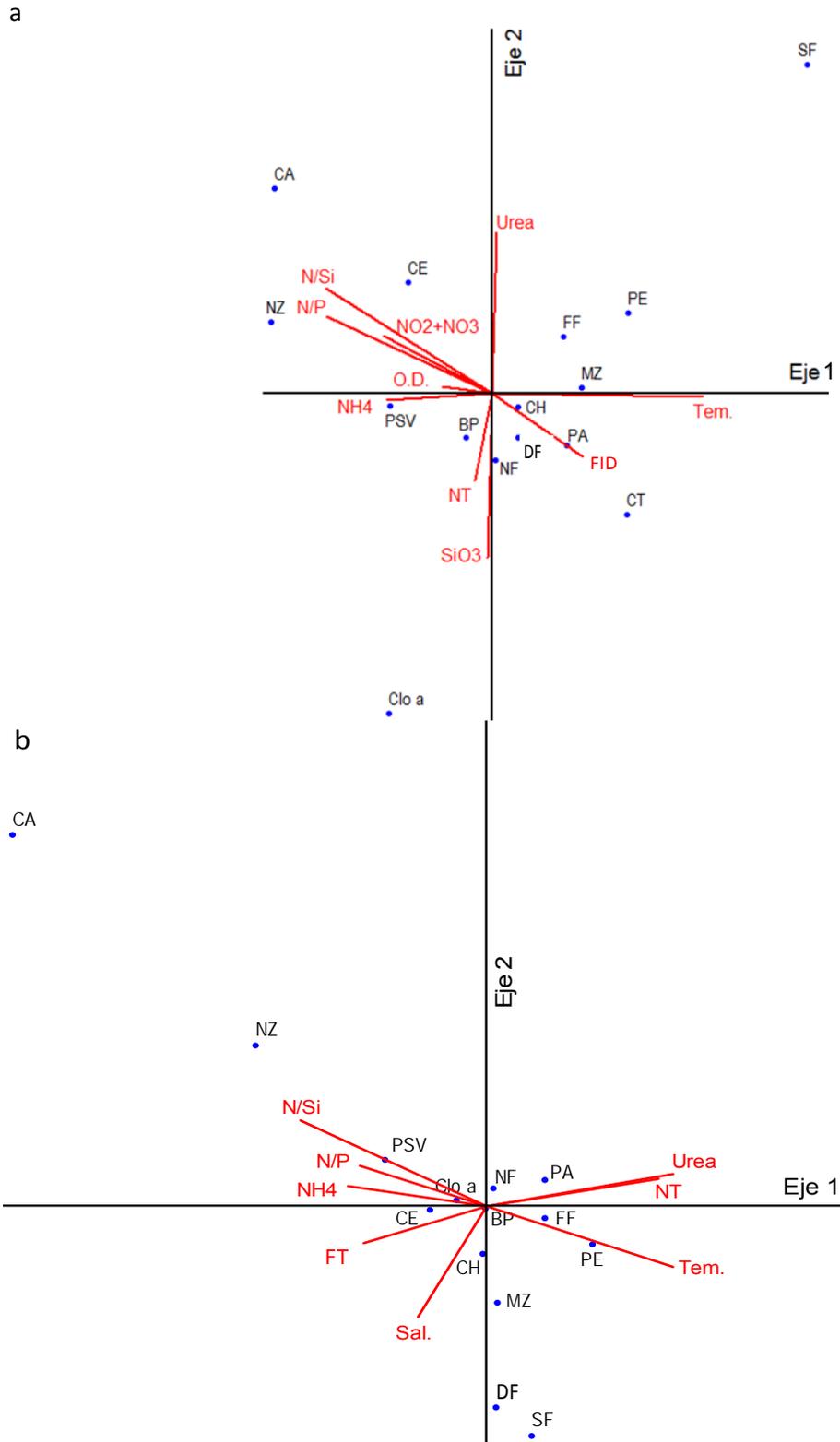
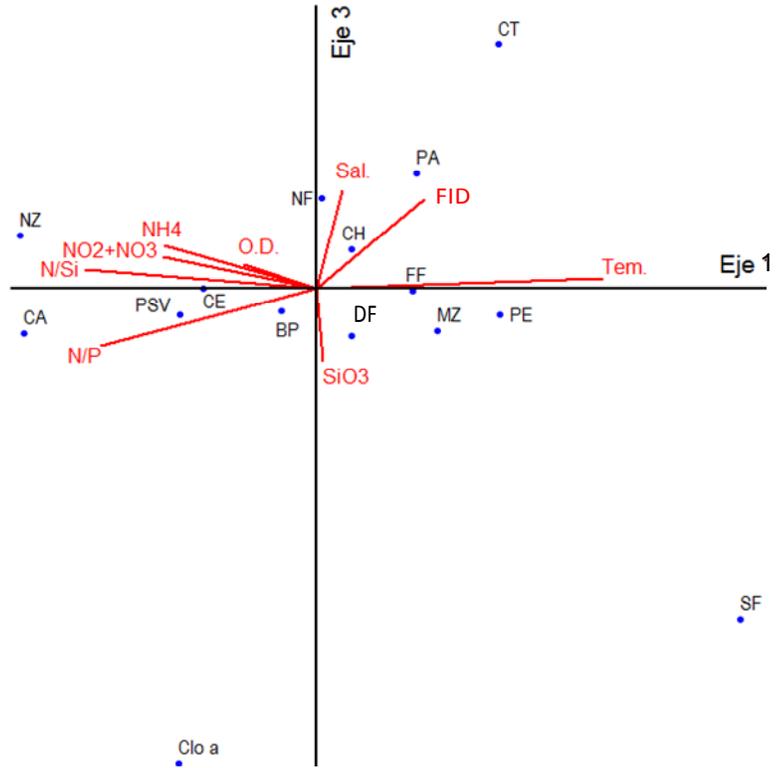


Figura 22. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los grupos microbianos y microplañctónicos (puntos azules) y las variables ambientales (vectores) en el espacio de los dos primeros ejes de ordenación para (a) el estero El Tortugón (b) y la boca de Macapule.

a



b

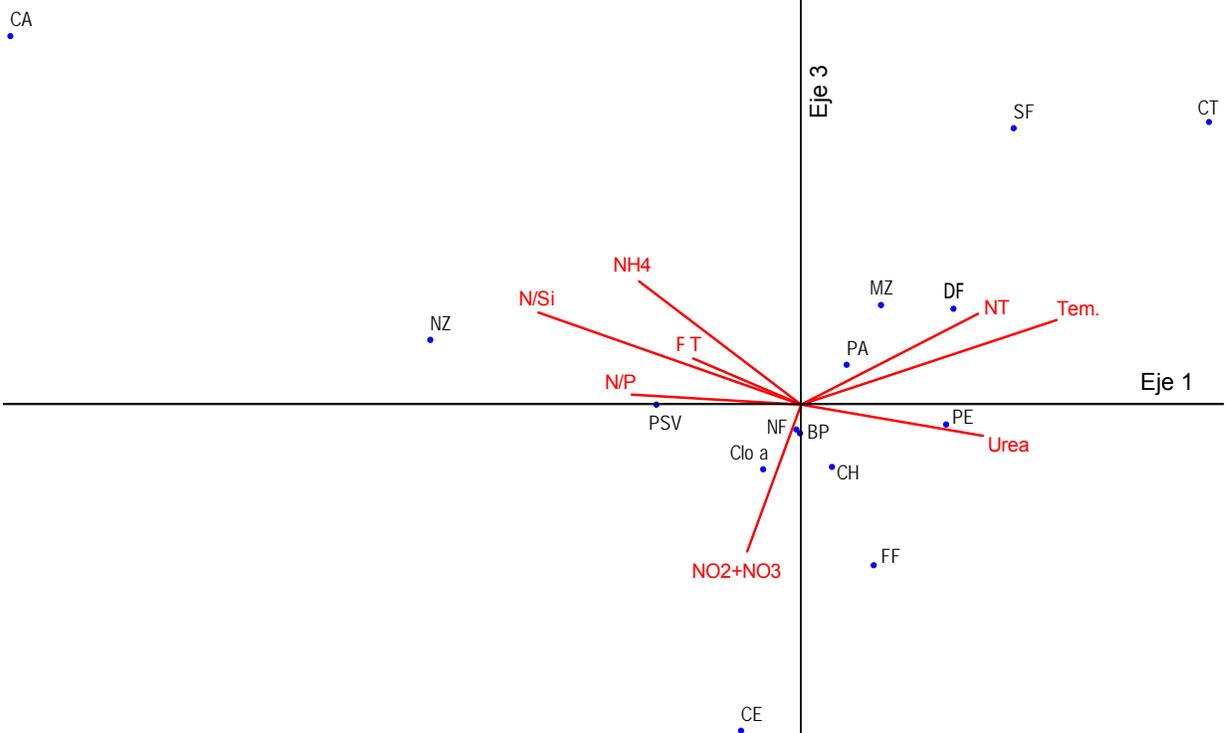
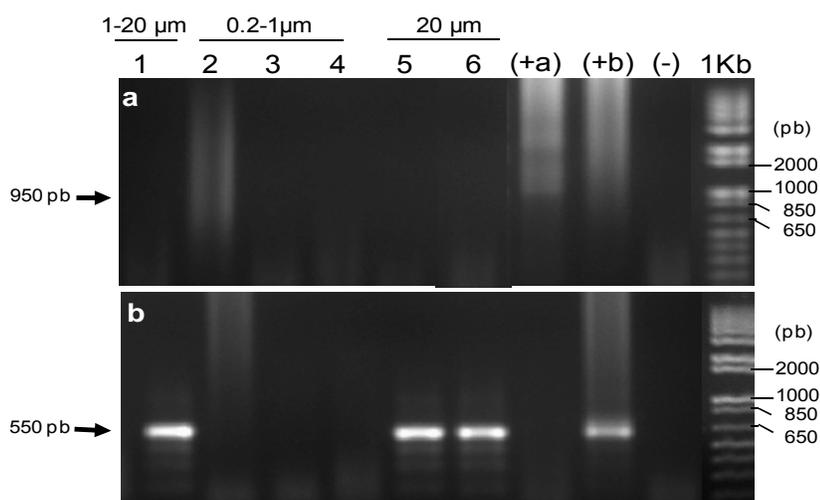


Figura 23. Diagrama de ordenación del análisis de correspondencia canónico (ACC) para los grupos microbianos y microplanctónicos (puntos azules) y las variables ambientales (vectores) en el espacio del primer y tercer ejes de ordenación para (a) el estero El Tortugón (b) y la boca de Macapule.

VII.6 DETECCIÓN DEL WSSV

VII.6.1 Resultados preliminares del PCR sencillo y anidado en una muestra de agua de un estanque infectado durante un evento infeccioso en junio de 2007

El empleo de la PCR sencillo y anidado para la detección del WSSV reveló diferencias importantes en la documentación de bandas en los geles de electroforesis. No se observaron productos amplificados en PCR sencillo en las fracciones de las muestras de agua e incluso en los controles positivos, indicando la posibilidad de inadecuadas condiciones de amplificación y/o muy baja concentración de ADN en los extractos (Figura 24).



Fracciones:

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. 1.2-20 μm (150 ml) filtro GFC | 1Kb Marcador molecular de 1 kilobase. |
| 2. 0.2-1.2 μm (50 ml) membrana PC | (+a) Control positivo (extracto ADN camarón infectado con WSSV) |
| 3. 0.2-1.2 μm (50 ml) (1/2 filtro) | (+b) Control positivo (reacción de PCR positiva a WSSV) |
| 4. 0.2-1.2 μm (50 ml) (1/2 filtro) | (-) Control negativo (agua ultrapura) |
| 5. >20 μm (150 ml) (1/2 filtro) | |
| 6. >20 μm (150 ml) (1/2 filtro) | |

Figura 24. (a) Productos de PCR sencillo (oligonucleótidos: wssv1out/wssv2out) de extractos de DNA obtenidos de diferentes fracciones planctónicas de una muestra de agua colectada en el estanque de cultivo durante evento infeccioso en junio de 2007. Carril (1) 1-20 μm; (2, 3 y 4) 0.2-1 μm; (5 y 6) 20 μm; (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracto de DNA de camarón infectado con WSSV); (+b) Control positivo (reacción de PCR sencilla positiva a WSSV); (-) Control negativo (en la reacción se sustituyó el DNA por agua ultrapura). (b) Productos de PCR anidado. Se usó como templado 1 μl de la reacción de PCR sencillo correspondiente. Los carriles están acomodados de acuerdo al panel superior. Las flechas negras indica la posición en el gel de los productos de PCR esperados. Datos no mostrados para la fracción 0.02 μm.

La foto-documentación de la amplificación con la PCR anidada, detectó bandas positivas en las fracciones entre 1.2 - 20 μm y >20 μm . Estas migraron a la misma distancia de la banda de uno de los controles positivos procedente de un producto amplificado previamente. Las bandas de los fragmentos observados correspondieron a un producto de 570 pb (Figura 24).

VII.6.2 Detección del WSSV por PCR anidada en las muestras de agua de la Laguna de Macapule y en los sitios de muestreo de la granja Doña Juana (diciembre de 2007 – diciembre de 2008)

VII.6.2.1 Calidad de los extractos de ADN

La foto-documentación de los productos amplificados con oligonucleótidos específicos para el ADN ribosomal 16S específico para el genoma procarionte (F2C/C), revelaron un patrón de bandas correspondientes al tamaño esperado de 1400 pb en todas las muestras de agua entre diciembre de 2007 y julio de 2008 (Figura 25). Esto significa la ejecución correcta de la técnica de extracción de ADN, así como la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR en la muestra y una integridad aceptable de las moléculas de ADN para su amplificación.

La mayoría de las muestras presentaron una mejor definición de bandas en la fracción del picoplancton (0.2 - 2.0 μm). No obstante, se esperaba la detección del genoma bacteriano ADN en todas las fracciones microbianas excepto en la viral, asumiendo la ubicuidad de estos procariontes y su posible asociación a organismos de fracciones mayores a ellos. Inesperadamente, ADN bacteriano en las muestras del primer muestreo (diciembre de 2007) fue detectado en la fracción viral de ambos sitios de la laguna y ausente en la boca; así mismo se reportó ausente en la fracción del picoplancton en el estero El Tortugón durante mayo de 2008 (Figura 25).

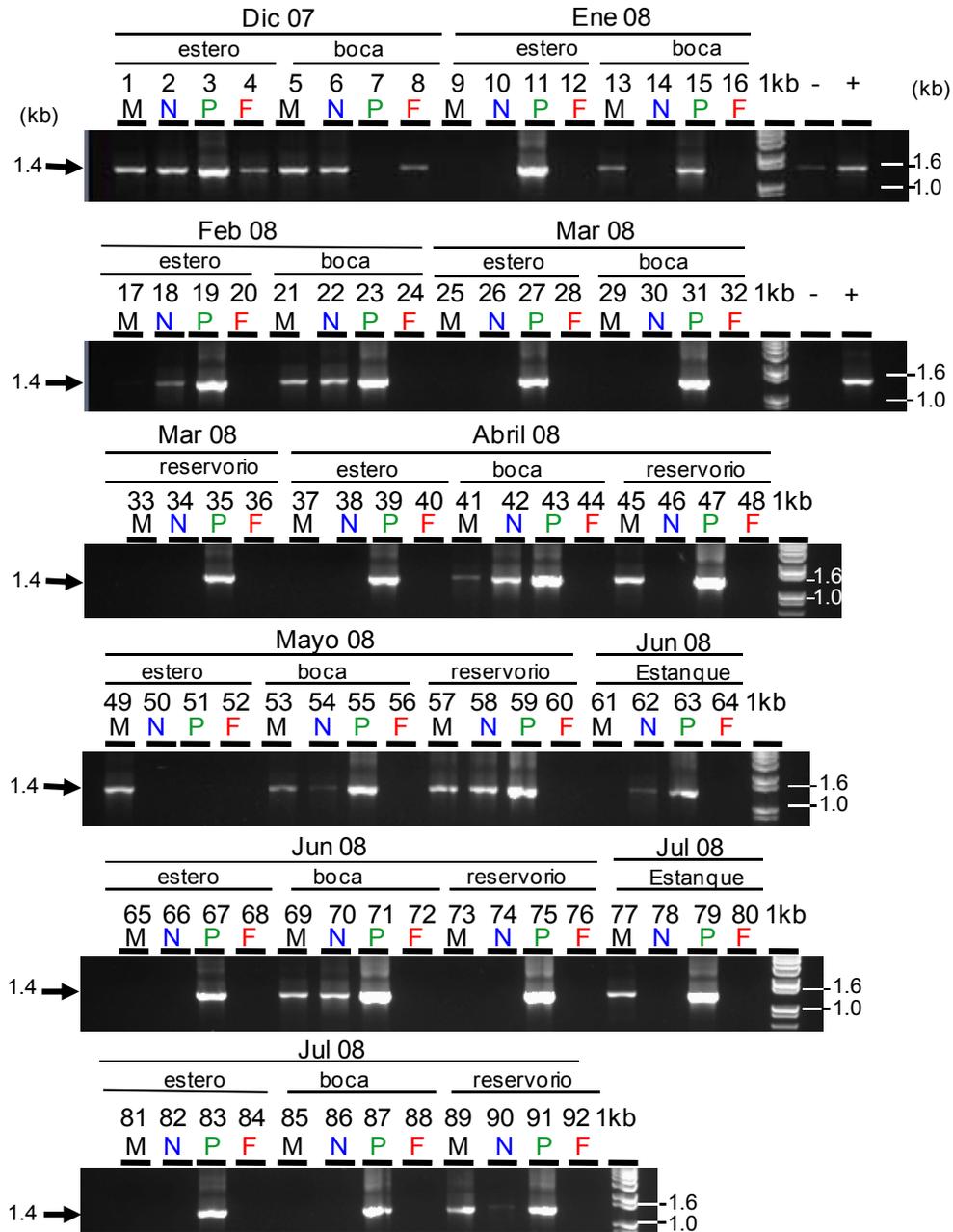


Figura 25. Productos de PCR sencillo amplificados con oligonucleótidos de procariontas (F2C/C) en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante diciembre de 2007 y julio de 2008. (1Kb) Marcador molecular; Control positivo (extracción DNA de bacteria) (+a) y (+b); Control negativo (agua ultrapura) (-). (M) Microplancton; (N) Nanoplancton; (P) Picoplancton; (F) Fentoplancton. Las flechas negras indican la posición en el gel de los productos de PCR esperados.

VII.6.2.2 Detección del WSSV.

A partir de las mismas condiciones de extracción de ADN y de la PCR anidada realizadas en la detección preliminar, se llevó a cabo el análisis en las muestras de agua fraccionadas procedentes de la laguna y el sistema camaronero entre diciembre de 2007 - diciembre de 2008 y marzo-octubre de 2008, respectivamente. No se visualizaron bandas positivas para WSSV de ningún producto en la fotodocumentación de los geles. Los controles positivos fueron claramente definidos en la amplificación correspondiente a las muestras 1 a la 92; sin embargo, estos controles escasamente visualizaron en el segundo juego de muestras amplificadas (97 y 172) (Figuras 26 y 27).

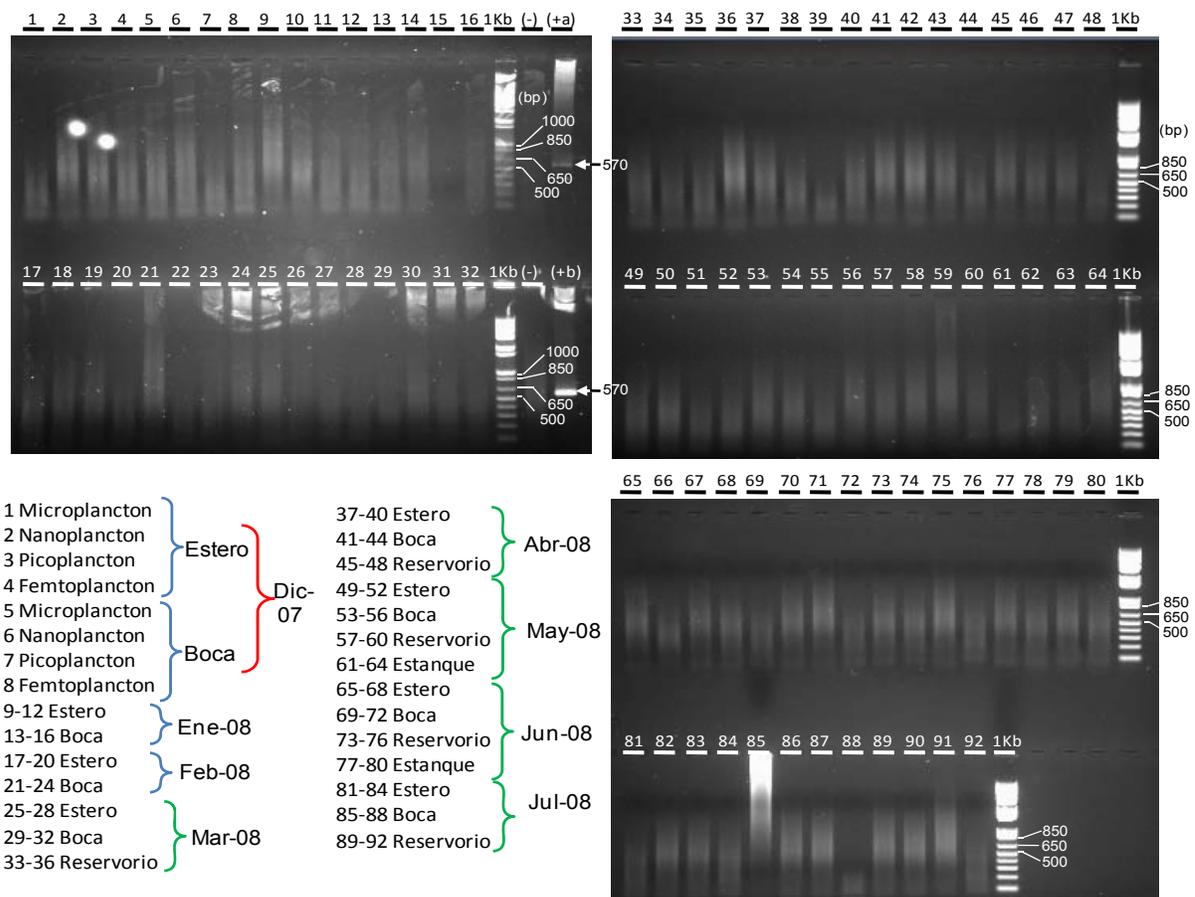


Figura 26. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante diciembre de 2007 y julio de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV); (-) Control negativo (agua ultrapura). Las flechas blancas indican la posición en el gel de los productos de PCR esperados.

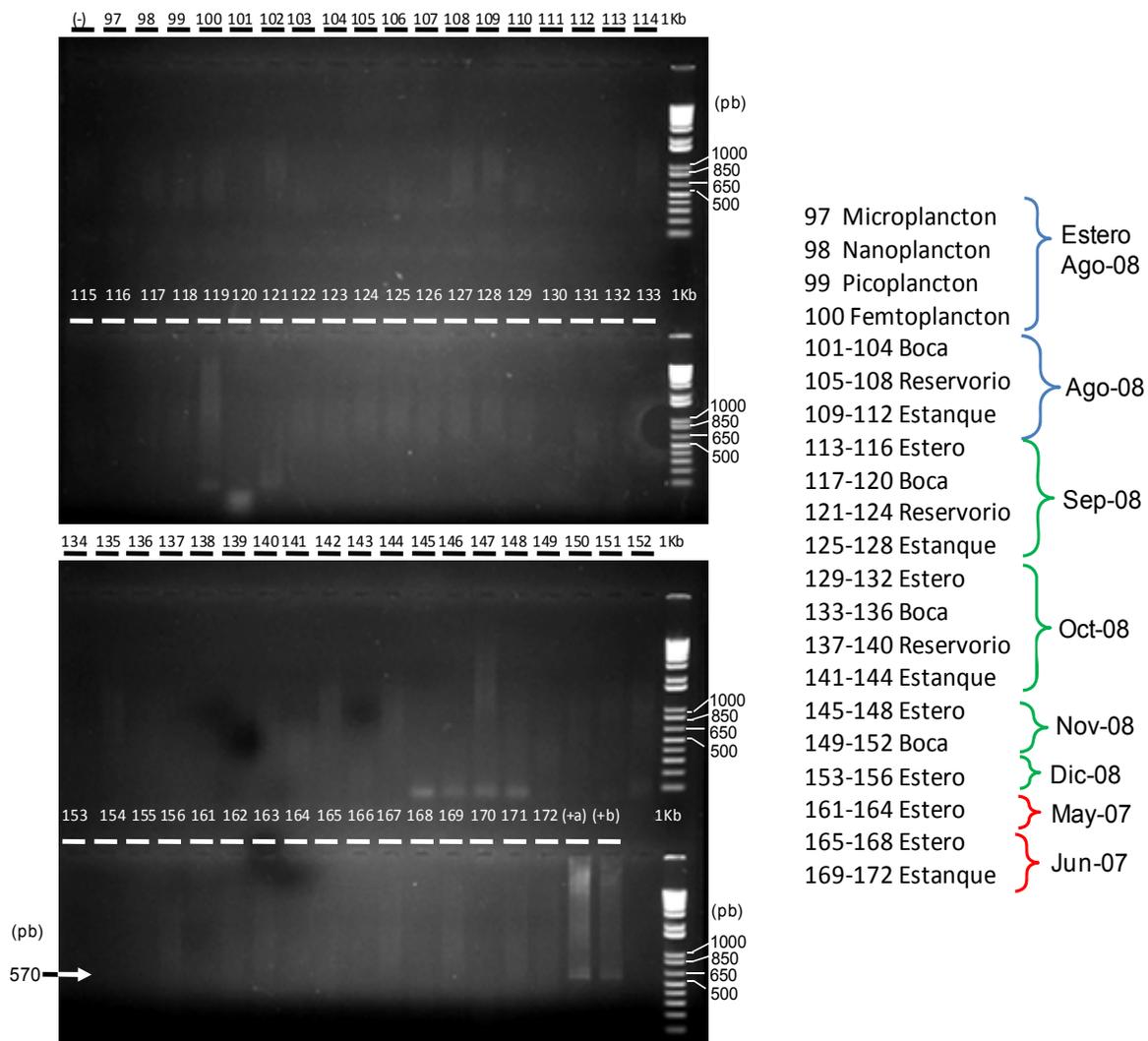


Figura 27. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante agosto de 2007 y diciembre de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV +); (-) Control negativo (agua ultrapura). La flecha blanca indica la posición en el gel del producto de PCR esperado.

VII.6.2.3 Detección del WSSV por PCR anidada a partir de las muestras de agua del estero El Tortugón - Laguna de Macapule - concentradas por ultra-filtración (febrero de 2009)

Los extractos de ADN para las diferentes fracciones del plancton procedieron de la concentración de dos muestras de agua de 12 L, una de ellas inoculada con un macerado de tejido de camarón infectado con WSSV. En la figura 28 se presenta los resultados del PCR sencillo y anidada para la detección del virus.

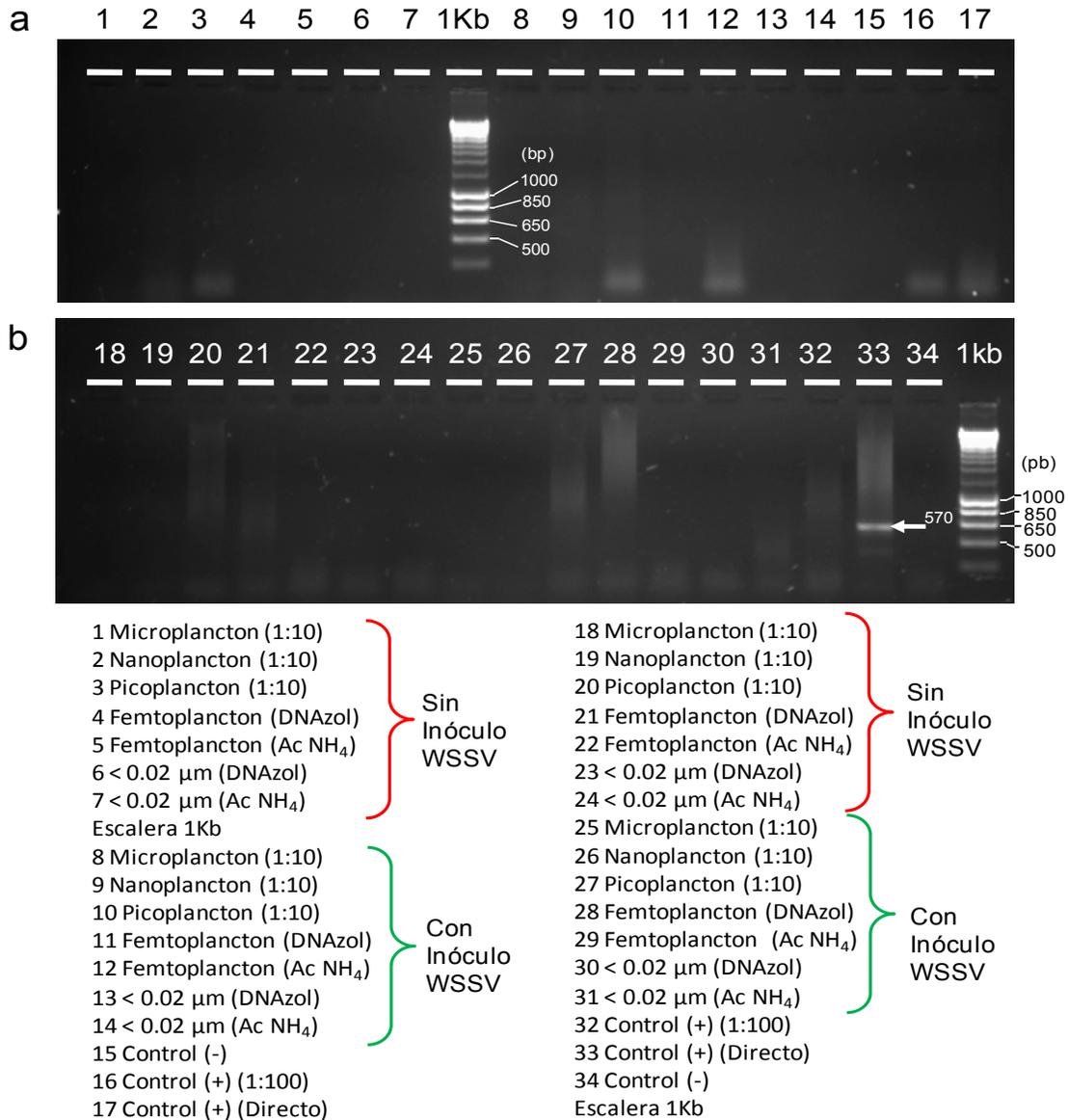


Figura 28. (a) Productos de PCR sencillo (oligonucleótidos: wssv1out/wssv2out) de extractos de DNA obtenidos de las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de agua del estero El Tortugón (con y sin inóculo de WSSV) concentradas por ultra-filtración durante marzo de 2009. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracto de DNA de camarón infectado con WSSV); (+b) Control positivo (reacción de PCR sencilla positiva a WSSV); (-) Control negativo (en la reacción se sustituyó el DNA por agua ultrapura). (b) Productos de PCR anidado. Se usó como templado 1 μl de la reacción de PCR sencillo. La flecha blanca indica la posición en el gel del producto de PCR esperado. (Ac NH₄) Muestras con extracción de ADN con acetato de amonio.

Todas las muestras fueron negativas para WSSV. Sin embargo, la presencia de una única banda en el gel correspondiente al control positivo (directo o diluido)

indica que se llevaron a cabo las condiciones adecuadas para la amplificación (Figura 28).

VII.6.3 Detección cuantitativa y semi-cuantitativa de WSSV a partir de los extractos de algunas muestras del estanque y reservorio

En la tabla 4 y las figuras 29 a la 30 se observan los resultados de la detección del WSSV realizada por los métodos de PCR anidada, semi-cuantitativo (IQ₂₀₀₀TM WSSV) y cuantitativo (IQ_{REAL}TM WSSV) realizados en la UAN (Tepic); estos últimos dos, permitieron la cuantificación del número de copias del genoma del WSSV y de un gen endógeno de camarón en los extractos de ADN de las muestras de agua fraccionadas.

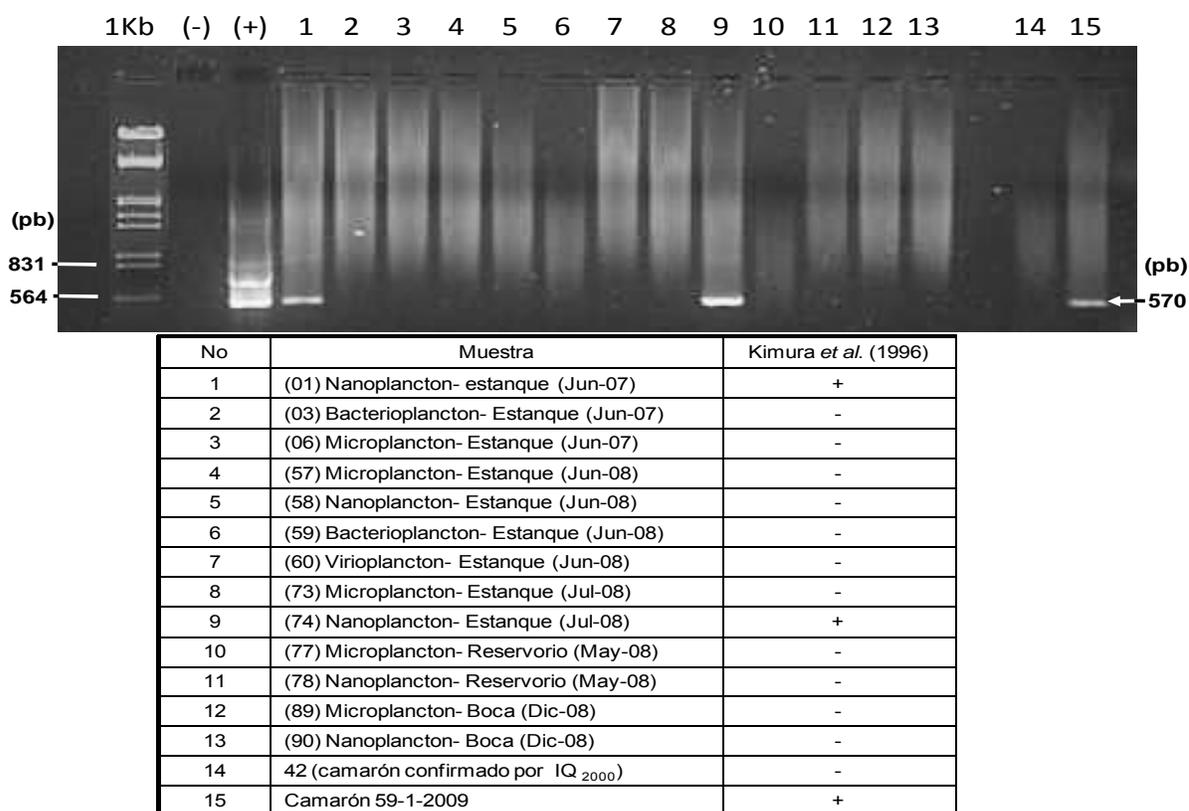
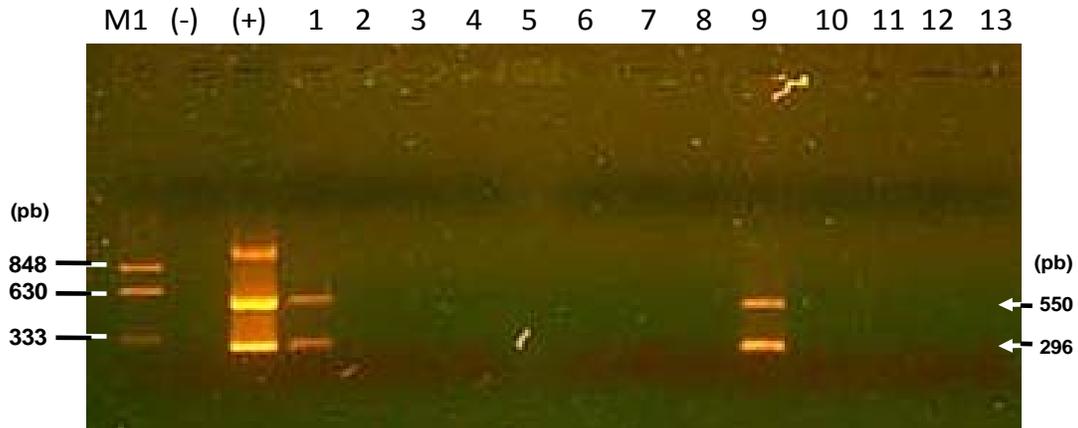


Figura 29. Productos de anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de las muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero durante agosto de 2007 y diciembre de 2008. (1Kb) Marcador molecular; (+a) Control positivo (extracción DNA camarón infectado WSSV); (+b) Control positivo (producto de PCR WSSV +); (-) Control negativo (agua ultrapura).



| No | Muestra | IQ ₂₀₀₀ |
|----|--|--------------------|
| 1 | Nanoplancton- estanque (Jun-07) | + (Moderada) |
| 2 | Bacterioplancton- Estanque (Jun-07) | - |
| 3 | Microplancton- Estanque (Jun-07) | - |
| 4 | (57) Microplancton- Estanque (Jun-08) | - |
| 5 | (58) Nanoplancton- Estanque (Jun-08) | - |
| 6 | (59) Bacterioplancton- Estanque (Jun-08) | - |
| 7 | (60) Virioplancton- Estanque (Jun-08) | - |
| 8 | (73) Microplancton- Estanque (Jul-08) | - |
| 9 | (74) Nanoplancton- Estanque (Jul-08) | + (Moderada) |
| 10 | (77) Microplancton- Reservorio (May-08) | - |
| 11 | (78) Nanoplancton- Reservorio (May-08) | - |
| 12 | (89) Microplancton- Boca (Dic-08) | - |
| 13 | (90) Nanoplancton- Boca (Dic-08) | - |

Figura 28. Productos de PCR anidada semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀) para detección de WSSV en las diferentes fracciones planctónicas de algunas muestras de la Laguna de Macapule y el sistema camaronero. (M1) Marcador molecular; (+) Control positivo para IQ₂₀₀₀; (-) Control negativo (agua ultrapura).

En general estos resultados corroboraron la presencia del WSSV en la fracción del nanoplancton en muestras del estanque durante un evento infeccioso en junio de 2007, así como la ausencia de detección del virus en todas las fracciones de algunas muestras analizadas del ciclo diciembre de 2007 - diciembre de 2008 (Figura 27 y 28). La única excepción a este último periodo, se observó en el extracto de la fracción nanoplanctónica obtenido del reservorio durante julio de 2008 (correspondiente al extracto número 74 de la Tabla 4). Ambas muestras positivas fueron detectadas por las PCR anidadas de Kimura *et al.* (1996) e IQ₂₀₀₀. Los niveles

alcanzados para ambos extractos estuvieron en el orden de 10^2 copias de ADN· μL^{-1} (10^5 copias de ADN· mL^{-1}) de WSSV en el extracto según el método semi-cuantitativo. Teniendo en cuenta la corrección debida al volumen total filtrado de las muestras originales, la densidad de ADN del WSSV fue aproximadamente de 10^3 y 10^2 copias de ADN· mL^{-1} para el estanque en junio de 2007 y julio de 2008, respectivamente (Figura 28). La cuantificación por IQ_{REAL} sólo pudo ser detectada en esta última muestra, revelando una concentración de 3.92×10^5 y 1.31×10^3 copias de ADN· mL^{-1} viral para el extracto y el volumen total filtrado, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de resultados de los métodos de detección y cuantificación por PCR para WSSV (PCR anidada y en tiempo real) empleados en algunas muestras de agua fraccionadas del evento infeccioso en junio de 2007 y durante el ciclo de muestreo diciembre de 2007-diciembre de 2008. (M) Microplancton; (N) Nanoplancton; (P) picoplancton.

| No. Nuestra | Fracción | Lugar | Fecha | Anidado (Kimura <i>et al.</i> , 1996) | Anidado Semi-cuantitativo (IQ ₂₀₀₀) | IQ _{Tiempo Real} | |
|-------------|----------|-------|--------|---------------------------------------|---|---|--|
| | | | | | | No. Copias ADN. mL^{-1} del extracto | No. Copias ADN. mL^{-1} en la muestra |
| I | M | E | Jun-07 | - | - | N.D. | N.D. |
| II | N | E | Jun-07 | + | + (Moderada) | N.D. | N.D. |
| III | P | E | Jun-07 | - | - | N.D. | N.D. |
| 6 | N | B | Ene-07 | - | - | N.D. | N.D. |
| 9 | M | T | Feb-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 38 | N | T | May-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 41 | M | B | May-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 57 | M | E | Jun-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 58 | N | E | Jun-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 59 | P | E | Jun-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 60 | F | E | Jun-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 73 | M | E | Jul-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 74 | N | E | Jul-08 | + | + (Moderada) | 3.92×10^5 | 1.31×10^3 |
| 77 | M | R | May-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 78 | N | R | May-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 85 | M | T | Dic-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 86 | N | T | Dic-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 89 | M | B | Dic-08 | - | - | N.D. | N.D. |
| 90 | N | B | Dic-08 | - | - | N.D. | N.D. |

VIII DISCUSIÓN

Los datos ambientales y biológicos evaluados entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008, indican que la Laguna de Macapule es un sistema altamente dinámico que se refleja en una estructura de la trama trófica microbiana muy heterogénea. Esta heterogeneidad está influenciada principalmente por las condiciones meteorológicas imperantes a lo largo del ciclo anual y la fuerte actividad agrícola de la región. Adicionalmente, la interacción entre los diferentes componentes microbianos, contribuyó de una manera determinante en esta variabilidad. Los datos de salinidad confirmaron el carácter de laguna marina que presenta Macapule. Condiciones cercanas a las de un estero solo se observaron próximas a las descargas de aguas residuales. Esta variable suele ser un poco más fluctuante en el estero El Tortugón con respecto a la boca, siendo el resultado de la influencia de los drenes 20 + 1000 y 29 +1000 que vierten aguas de origen agrícola y una mezcla de aguas municipales y de granjas camaronícolas, respectivamente. A pesar de estas particularidades, ambos sitios presentan características propias de un sistema anti-estuarino (Magaña-Álvarez, 2004), cuyas reducciones en los niveles de salinidad están dadas principalmente por el incremento en los niveles de precipitación de la región desde inicios del verano hasta octubre.

VIII.1 COMPONENTES PLANCTÓNICOS Y VARIABILIDAD AMBIENTAL

En general el ciclo de producción anual del fitoplancton en Macapule exhibió un régimen bimodal similar al reportado para sistemas estuarinos de zonas templadas (Valiela, 1995). No obstante, esta señal fue atribuida a la adición de los patrones estacionales particularmente opuestos de cada sitio de muestreo. Para la boca de Macapule, se registraron un máximo de producción estacional del MF durante invierno-primavera y un pequeño repunte en otoño, los cuales son consistentes con

la tendencia dominante en el Golfo de California y mares subtropicales oligotróficos (Longhurst, 1998). En contraste el máximo de abundancia fitoplanctónica, en el estero El Tortugón, hacia finales del otoño correspondió principalmente a la respuesta de PA, CT y algunas poblaciones de diatomeas pequeñas. A diferencia de la fuerte influencia de aguas exteriores en la boca de Macapule, el patrón de producción en el estero se encontró básicamente afectado por su cercanía al margen continental y la precipitación y escorrentías como ha sido observado previamente (De Silva-Dávila *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2007).

El intervalo de baja producción entre uno y otro pico estacional observado en este trabajo es similar al de sistemas estuarinos de zonas templadas. En estas regiones este intervalo ha sido atribuido principalmente al agotamiento de nutrientes y a un desfase con el incremento en la producción y depredación del zooplancton que suele acentuarse durante principios del verano (Valiela, 1995). De manera similar, en la Laguna Macapule esto podría estar asociado también a la intrusión de aguas oligotróficas tropicales de la corriente de Costa Rica (Badan-Dangon, 1997; Kessler, 2006) y a cambios en la taxocenosis del zooplancton a principios del verano (De Silva-Dávila *et al.*, 2006). En general, este patrón de producción coincidió con el reportado para sistemas costeros templados con elevados aportes de nutrientes, en donde las proliferaciones de fitoplancton en primavera llegan a ser cortas en amplitud, pero prolongadas y algunas veces más altas en verano (Cloern, 2001). Esta situación en Macapule obedece quizás a una mayor influencia de los componentes microbianos y una producción basada en los procesos de reciclaje de nutrientes.

En relación a las variables ambientales, los valores registrados para temperatura superficial del agua y otras variables físico-químicas (pH, salinidad y oxígeno disuelto) se encontraron en general dentro de los intervalos y la estacionalidad ya previamente reportada para el sistema (Magaña-Álvarez, 2004; Poot-Delgado, 2006) y algunos otros cuerpos de agua en la costa este del Golfo de California (Escobedo-Urías *et al.*, 1997; De Silva-Dávila *et al.*, 2006; López-Aguilar, 2006; Martínez-López *et al.*, 2007). De entre las variables consideradas,

particularmente la temperatura superficial del agua y la radiación solar, definieron dos periodos estacionales; uno frío (diciembre de 2007 - mayo de 2008) y otro cálido (junio - noviembre de 2008) que corresponden con los cambios estacionales del ciclo de producción de los componentes planctónicos mencionado con anterioridad. En este sentido la temperatura superficial del agua fue posiblemente el factor físico con mayor influencia sobre los componentes plantónicos. En este estudio, fuertes correlaciones con la temperatura superficial del agua fueron observadas con NZ, PSV, MZ y PA en ambos sitios de muestreo (Spearman; $p < 0.05$). Estos dos últimos componentes mostraron una correlación positiva de la temperatura, junto con CH y MF en el estero. La temperatura es considerada uno de principales factores que influye no solo en la dinámica de otros parámetros físicos y químicos en la columna de agua; sino que también ejerce control sobre la actividad metabólica de los microorganismos, regulando la velocidad de reacciones bioquímicas (actividad) y las tasas de crecimiento poblacional (e.g. Eppley, 1972; Shish & Ducklow, 1994; Montagnes & Franklin, 2001; Apple *et al.*, 2008). Al respecto, Cavender-Bares *et al.* (1999) reportaron para el Pacífico Ecuatorial que los incrementos en la temperatura es uno de los factores mas importantes que regulan los incrementos de las fracciones de la biomasa pico y nanofitoplanctónica, particularmente el nanofitoplancton se vió favorecido cuando esta variable superó los 26°C.

Aparentemente, esta relación positiva entre la temperatura del agua y las abundancias de algunos componentes planctónicos (diatomeas, flagelados y bacterias, entre otros) no fue detectada, a diferencia de lo reportado para varios modelos de crecimiento, trabajos en sistemas experimentales (e.g. Eppley, 1972; Goldman & Carpenter, 1974; Shiah & Ducklow, 1994; Autio, 1998) y en ambientes naturales (e.g. Cochran & Paul, 1998). Una posibilidad es que la resolución temporal de los datos no fue quizás lo suficientemente alta para detectar dichos cambios poblacionales en función de la variabilidad de la temperatura del agua, ya que usualmente éstos ocurren en el orden de horas, días y pocas semanas. Visto desde la escala evaluada, se fortalece la suposición de que algunas poblaciones en el sistema podrían estar reguladas estacionalmente por otros factores como la

disponibilidad de nutrientes y/o algunas relaciones ecológicas (depredación, parasitismo, mutualismo, etc.). Con respecto a esto último por ejemplo, el efecto de la temperatura superficial del agua quizás no se reflejó directamente en la densidad celular, debido a cambios simultáneos en los procesos metabólicos de los pastoreadores y su control por depredación. Así como en algunos modelos y trabajos experimentales, la presión por pastoreo podría enmascarar la respuesta de poblaciones planctónicas a un determinado conjunto de variables ambientales, cuya dependencia puede estar previamente establecida (Peters, 1994). Esta última posibilidad, sin embargo, se contemplará más adelante en lo relacionado a interacciones entre componentes microbianos.

VIII.1.1 Periodo frío

En cuanto a los nutrientes inorgánicos (NH_4^- y NO_3^- y NID), las magnitudes y la dinámica temporal observada fueron consistentes con los intervalos reportados previamente para este mismo sistema (Magaña-Álvarez, 2004; Poot-Delgado, 2006), para otros adyacentes como Topolobampo-Santa María-Ohuira y Navachiste (Páez-Osuna *et al.*, 2007; Ayala-Rodríguez, 2008) y algunos ambientes costeros subtropicales eutrofizados (e.g. Mortazavi *et al.* 2000b; Padayao & San Diego-McGlone, 2000). Parte de la dinámica temporal de los nutrientes se explica con la variabilidad de los vientos. Estos se observaron asociados negativamente (Spearman; $p < 0.05$) con la temperatura superficial del agua y ambiental. En este estudio los vientos procedentes del NO dominaron durante el periodo frío (entre diciembre 2007 y mayo 2008) registrando intensidades moderadas a altas. Su dinámica temporal señala su efecto en la remoción de calor de la superficie del agua así como un incremento en la mezcla de la columna de agua y su posible conexión con la variabilidad temporal del NID, como lo indica la relación positiva (Spearman; $p < 0.05$) de estos con la rapidez mensual promedio del viento procedente del NO, e inversa con la temperatura ambiental y superficial del agua e irradiación solar (Spearman; $p < 0.05$). De igual forma, al inicio del periodo cálido se observaron

mayores intensidades de vientos del SE en coherencia con altos valores de FID. Estos resultados corroboran que en ambientes someros la mezcla vertical generada por el viento es un de los mecanismos que podría modular las concentraciones de nutrientes en la columna de agua por resuspensión del sedimento (Baillie & Welsh, 1980; Vörösmarty & Loder, 1994; Oldham & Lavery, 1999).

Varios estudios proponen (e.g. Fischer *et al.*, 1979; Morales-Zamorano *et al.*, 1991) que la dirección e intensidad de los vientos son factores determinantes en la generación de varios fenómenos asociados con la estabilidad de la columna, tanto en mar abierto como en zonas costeras. Para la parte alta, media y baja de la costa este del Golfo de California se ha detectado que la intensificación y predominio de vientos del NO durante invierno-primavera favorece la incidencia de surgencias (Lluch-Cota, 2000). Aparentemente su ocurrencia tiene conexión con las lagunas costeras, ya que existen indicios de que una porción significativa de nutrientes provenientes de estos procesos de mesoescala ingresan a éstas e incrementan la producción y densidad de MF (Martínez-López *et al.*, 2008). Para la boca de Macapule la presencia de altos aportes de nutrientes nitrogenados oxidados y NID fue coherente con la estacionalidad documentada para estos fenómenos de surgencias, lo que apoya lo propuesto anteriormente.

Adicionalmente durante esta misma temporada otra fuente de nutrientes en Laguna Macapule deriva de la actividad antropogénica. Esta actividad, ha sido sugerida como una de los principales causas del enriquecimiento en los sistemas costeros de la zona (Magaña-Álvarez, 2004, Escobedo-Urías & Martínez-López, 2007; Ayala-Rodríguez, 2008), así como una causa del decremento en la calidad bacteriológica del agua (Escobedo-Urías *et al.*, 1999). Dentro de las principales fuentes que contribuyen a este enriquecimiento se encuentran incluidos los aportes de aguas municipales, los provenientes de granjas camaronícolas, de los drenes agrícolas y por escorrentía. Estos dos últimos, son quizás las fuentes que mayor contribución e impacto generan al sistema de Macapule, especialmente durante la época de intensa fertilización y riego del suelo para los municipios de Guasave y Ahome (Magaña-Álvarez, 2004).

La región en la cual está inmersa Macapule se caracteriza por ser una de las más importantes en términos de producción agrícola (Peña-Cabriales *et al.*, 2002; Páez-Osuna *et al.*, 2007). Esta actividad incluye dos periodos a lo largo de un ciclo agrícola. El correspondiente al de otoño-invierno, es el más importante en términos de producción. Durante éste se ha registrado la mayor extensión de áreas de cultivo (41,413 Ha) y la fertilización e irrigación más intensa en la zona (Cortesía de la Comisión Nacional del Agua -CNA-, 2009), lo cual es consistente con los mayores niveles de NID en la Laguna de Macapule. (Magaña-Álvarez, 2004; Poot-Delgado, 2006; Escobedo-Urías, 2008). La cantidad y los tiempos de aplicación de fertilizantes nitrogenados e irrigación es similar a la reportada por Riley *et al.* (2001) para el Valle del Yaqui. Allí se emplean en promedio $250 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de Nitrógeno por ciclo de cultivo principalmente en forma de amonio anhidro. Usualmente, se llevan a cabo dos aplicaciones; una tres semanas antes y otra cinco semanas después de la siembra, cada una seguida de irrigación. La implementación de estas prácticas, aparentemente sustenta la presencia de altas concentraciones de NID, en especial de las formas reducidas tanto en la boca como el estero en este periodo del año.

Durante la persistencia de los vientos del NO, también se observaron mayores fluctuaciones y concentraciones de oxígeno disuelto en la boca de Macapule con respecto al estero, indicando la presencia activa de mecanismos físicos, químicos y biológicos relacionados con el intercambio gaseoso con la atmósfera (Wanninkhof, 1992; Wallace & Wirrick, 1992), la naturaleza reactiva del oxígeno (e.g. Rose & Waite, 2006.) y la actividad fisiológica de autótrofos y heterótrofos (consumo y producción de esta molécula) (e.g. York *et al.*, 2001; Laferla *et al.*, 2006). Las tendencias del oxígeno disuelto y su porcentaje de saturación, oscilaron independientemente a la temperatura y a otros factores ambientales. La concentración de oxígeno se asoció negativamente al FID y al PA en ambos sitios de Macapule; sin embargo, en la boca se asociaron positivamente al pH y la Clo a (Spearman; $p < 0.05$). En términos de saturación de oxígeno, se mantuvieron correlaciones significativas con FID y pH, sin embargo, a estas se sumó una correspondencia directa con la abundancia de MF (Spearman= 0.52; $p < 0.05$). A

pesar de que estos resultados no son concluyentes, es evidente que estas variables están asociadas a la actividad autotrófica y al máximo de producción estacional del MF en la boca. Aunado a esto, la participación de los vientos dominantes en el periodo frío, también ha sido otro argumento discutido previamente por Ulloa (2005) y Ayala-Rodríguez (2008) para explicar dichos incrementos en la concentración de oxígeno disuelto para la zona externa al sistema lagunar y otras lagunas de Sinaloa, respectivamente.

Las particularidades de la composición fitoplanctónica del periodo frío, caracterizado por la mayor abundancia de MF constituido principalmente por diatomeas, responden a una mayor disponibilidad de nutrientes inorgánicos, así como una menor presión por pastoreo sobre las células grandes que pudieran estar fuera de los rangos de ingestión del mesozooplancton (Kjørboe, 1993; Irigoien *et al.*, 2005). Su abundancia difirió significativamente entre ambos sitios (Kruscall-Wallis= 0.66; $p > 0.05$). Las mayores densidades en la boca fueron observadas a finales del invierno-primavera, mientras que en el estero se presentaron a finales del verano-otoño. Así mismo, la estructura comunitaria y de tamaños fue aparentemente diferente en ambos periodos (datos no mostrados). Durante el primer incremento del ciclo de producción se registró una mayor contribución de géneros de diatomeas centrales, dentro de los que sobresalen *Chaetoceros*, *Guinardia*, *Skeletonema* y *Rhizosolenia*. Sin embargo, también fueron abundantes el grupo de los dinoflagelados con algunas proliferaciones del género *Prorocentrum*.

VIII.1.2 Periodo cálido

Durante la temporada cálida del año, el patrón del viento presentó un comportamiento regularmente opuesto al periodo frío, muy similar al documentado para varios lugares del Golfo de California (Bray, 1988). Sin embargo, la magnitud de los vientos del SE fue elevada en junio en comparación de los del NO, y la ocurrencia de estos últimos persistió en un mes del periodo cálido (septiembre). Según el

trabajo de Parés-Sierra *et al.* (2003) con series de tiempo de tres años, la dirección de los vientos procedentes del SO y SE pueden registrar una inversión efímera de su dirección durante junio, julio y septiembre y durante cortos periodos en agosto para la región sur del Golfo de California. Esta apreciación corrobora que lo observado en Macapule no es parte de un comportamiento totalmente anómalo, y quizás esta alteración responde al patrón de circulación de vientos locales a lo largo del ciclo diario.

De la misma manera, a como se observó en la boca en invierno-primavera, los incrementos en el porcentaje de saturación de oxígeno a finales del periodo cálido, son tal vez atribuidos a la producción fotosintética relacionada con la incidencia de proliferaciones de MF y fracciones menores (Ayala-Rodríguez, 2008). A diferencia de varios estudios previos en la zona de estudio y sistemas contiguos (Ulloa, 2005; Magaña-Álvarez, 2004; Ayala-Rodríguez, 2008), los valores de saturación de oxígeno en Macapule son notablemente inferiores (< 95%). Esta particularidad quizás está relacionada con la poca profundidad del sistema y el continuo aporte de la materia orgánica y el subsecuente proceso de oxidación por actividad microbiana. No obstante, algunas tendencias temporales son persistentes, como por ejemplo altos valores de saturación de oxígeno disuelto en verano para ambas estaciones y en primavera únicamente para la boca.

Para la época cálida se registró un incremento en la frecuencia de diatomeas penadas de talla pequeña y poco silicificadas en relación al aumento de la temperatura superficial del agua, el cual fue mucho más acentuado en el estero. Este comportamiento ha sido previamente reportado en Macapule (Poot-Delgado, 2006), en sistemas del norte de Sinaloa (Ayala-Rodríguez, 2008) y en ambientes templados (Eppley, 1972; Harrison & Platt, 1980; Levasseur *et al.*, 1984; Agawin *et al.*, 1998). Los géneros *Cylindrotheca* y *Pseudo-nitzschia* que también fueron abundantes en el periodo frío, presentaron las mayores densidades y contribuciones al total del MF, junto con otras diatomeas penadas, como *Asterionellopsis* y *Thalassionema* (datos no mostrados). Algunas explicaciones acerca de esta estructura fitoplanctónica han sido enunciadas en torno a posibles ventajas frente a pérdidas por hundimiento o

limitación por nutrientes. Montagnes & Franklin (2001) argumentaron que en sistemas de cultivo esta miniaturización de las generaciones de diatomeas puede disminuir su tasa de sedimentación y por consiguiente persistir más tiempo en la columna de agua. Otra explicación propuesta por los autores anteriores, indica que la relación inversa entre la viscosidad y la temperatura del agua puede también favorecer la pérdida de partículas por hundimiento durante estos periodos. Thompson *et al.* (1992) por otra parte, sugiere que las variaciones de temperatura suelen alterar también la composición de las células en términos del contenido C:N por unidad de volumen (Thompson *et al.*, 1992) y por consiguiente cambios en la densidad citoplasmática; sin embargo, varios estudios con diferentes especies muestran resultados contradictorios (e.g. Strathmann, 1967; Verity, 1981).

En ambientes oceánicos por ejemplo, condiciones limitantes por Nitrógeno incrementan el contenido de Carbono en diatomeas y por consiguiente su densidad celular, promoviendo su hundimiento a estratos más profundos en donde tienen acceso a reservorios de Nitrógeno (e.g. Villareal *et al.*, 1996; Singler & Villareal, 2005). En ambientes costeros someros esta situación no se reproduce de la misma manera, sin embargo, diatomeas limitadas por Nitrógeno podrían en algunos casos desarrollar esporas de resistencia (e.g. Lewis *et al.*, 1999) o metabolismos heterotróficos o mixotróficos (e.g. Mengelt & Prézelin, 2002) hasta que las condiciones favorables se reestablezcan. Aunado al incremento en la temperatura, menores concentraciones de NID y un mayor desbalance en la proporción N:P (<16:1) fueron evidentes durante los meses cálidos. Esta condición limitó el desarrollo de diatomeas grandes, con altos requerimientos nutricionales (ver referencias en Winder *et al.*, 2009) y por consiguiente favoreció al desarrollo de células pequeñas y/o aquellas con la capacidad de explotar fuentes orgánicas (ver referencias en Stickney *et al.*, 2000). Con respecto al incremento de la temperatura del agua, Paasche (1980) detectó una disminución en el contenido de sílice en cultivos que podrían estar asociados a cambios morfológicos de dos especies de diatomeas (*Rhizosolenia fragilissima* y *Chaetoceros affinis*).

Otros nutrientes que están involucrados directamente con la variabilidad de las diatomeas son el SiO_3 y FID, cuya dinámica no coincidió con el patrón observado para el NID. Así mismo, los máximos niveles de estos nutrientes presentaron escasa relación con la época de mayor persistencia e intensidad de los vientos del NO (promotores del evento de surgencia en la zona) y la ocurrencia del primer ciclo de cultivo, excepto tal vez por las mayores concentraciones de SiO_3^- que aún pertenecieron a la parte final del ciclo agrícola en la zona, en coincidencia con lo reportado anteriormente por Poot-Delgado (2006) para este mismo sistema. En Macapule tanto el SiO_3 como el FID siempre fueron detectados en altas y considerables cantidades en comparación con estudios previos en esta y otras zonas adyacentes (Escobedo-Urías *et al.*, 1999; Magaña-Álvarez; 2002; Poot-Delgado, 2006; Ayala-Rodríguez, 2008). Sin embargo, ambos nutrientes presentaron algunas diferencias en sus patrones temporales. Esto obedece principalmente a la naturaleza de sus ciclos biogeoquímicos, a las fuentes externas (aportes continentales, oceánicos y atmosféricos) e internas (reciclaje) y a los mecanismos involucrados en el amortiguamiento y bombeo de estos iones desde el sedimento a la columna de agua y viceversa (Froelich, 1988; Ragueneau *et al.*, 2002 y 2006).

Varios estudios indican que el mayor aporte a las concentraciones de Fósforo y silice inorgánico disuelto de los ambientes marinos, provienen principalmente de aportes continentales, a través de la desembocadura de los ríos, procesos de lixiviación y aguas subterráneas (ver referencias en Ragueneau *et al.*, 2006). A diferencia de los registros anteriores de SiO_3^- para la zona de estudio, el FID presentó una variabilidad interanual evidente. Una observación similar fue documentada por Mortazavi *et al.* (2000a) en series de tiempo de FID para sistemas estuarinos subtropicales en la Bahía de Apalachicola (Florida). No obstante, ellos encontraron altos valores de FID asociados principalmente a incrementos en las descargas fluviales. En el sistema lagunar de Macapule las máximas concentraciones de FID y SiO_3^- no correspondieron con los mayores niveles de precipitación en la zona, los cuales hubiesen favorecido la meteorización y disolución

de las rocas, así como un aumento en el caudal de descarga de los drenes y/o procesos de lixiviación.

Posiblemente, una de las hipótesis más acertadas sobre las fuentes con mayor contribución de SiO_3^- y FID en este trabajo, está relacionada con los procesos de remineralización de materia orgánica y disolución de sílice biogénico, así como la liberación de nutrientes del sedimento, ambos acoplados a mecanismos de difusión pasiva y advección en la columna de agua. Particularmente en Macapule, los mayores incrementos de SiO_3^- fueron observados en marzo durante la temporada fría del año, en coincidencia con la estacionalidad de las surgencias costeras, así como con la disminución de las densidades de MF y un repunte de CH y MZ en la boca de Macapule. Esta condición al parecer obedeció a bajas tasas de captación de SiO_3^- por parte del MF y al acoplamiento con potenciales pastoreadores. De acuerdo a lo anterior, una mayor concentración de este nutriente en el estero con respecto a la boca, es coherente con el registro de bajas densidades de consumidores del MF. El mantenimiento de bajos niveles de este nutriente inorgánico en el periodo cálido es quizás consecuencia de un consumo permanente por parte de pequeñas diatomeas. Durante esta época los niveles de SiO_3^- son amortiguados principalmente por el aporte continental a través de sistemas fluviales y/o por escorrentía (e.g. Officer & Ryther, 1980; Ragueneau *et al.*, 2000) especialmente durante el periodo de lluvias (Martínez-López *et al.*, 2007), así como por la actividad microbiana que de manera indirecta esta poniendo a disponibilidad este elemento (e.g. Yamada & D'Elia, 1984).

Para el FID, en cambio, estos máximos ocurrieron entre abril-mayo en relación con el decaimiento de las proliferaciones de MF y un calentamiento inicial de la columna de agua, así como incrementos en la abundancia de CH. Al parecer, todas estas condiciones favorecieron la acumulación de materia orgánica (por muerte celular, exudación y excreción, entre otras) y por consiguiente, altas tasas de regeneración de nutrientes por actividad microbiana, tanto en la columna de agua como en el sedimento (Berounsky & Nixon, 1990; Ammerman & Azam, 1991; Cowan & Boynton, 1996; Benitez-Nelson, 2000; Bidle & Azam, 2001; Hagy *et al.*, 2005; Weston & Joye, 2005).

Algunas revisiones acerca de la regeneración de sílice en aguas costeras (ver referencias en Nelson *et al.*, 1995; Ragueneau *et al.*, 2006), han documentado que numerosos factores físico-químicos están involucrados en este proceso, tales como temperatura, asociación con elementos traza (e.g. Aluminio) y el área de superficie específica de las partículas. Sin embargo, algunos mecanismos biológicos también promueven la disolución del sílice biogénico, como por ejemplo la actividad microbiana sobre la descomposición de materia orgánica aglutinada en las paredes de las frústulas (Bidle & Azam, 2001). En este trabajo, muy posiblemente gran parte de las frústulas derivadas del decline de proliferaciones en invierno-primavera fueron susceptibles a esta disolución contribuyendo a los elevados niveles en marzo. No obstante, el hecho de encontrarse embebidas en materia orgánica derivada de las mismas diatomeas o dentro de las pelotillas fecales producidas por consumidores zooplanctónicos, podría haber facilitado su hundimiento al sedimento (ver referencias en Turner, 2002) impidiendo el reciclaje de SiO_3^- dentro de la columna de agua. Esta posibilidad ha sido previamente propuesta en otros trabajos, sin embargo, es coherente con el hecho de que la mayor parte de los procesos de disolución del ópalo biogénico suelen llevarse a cabo en la interfase agua-sedimento (ver referencias en Ragueneau *et al.*, 2006).

El predominio de sedimentos arenosos (69 % en promedio) reportado para el sistema lagunar estuarino Macapule-Navachiste-San Ignacio (Ayala-Baldenegro, 2004), confiere gran permeabilidad que facilita el intercambio de agua entre la columna de agua y el fondo (ver referencias en Precht & Huettel, 2003), así como favorecen la degradación de materia orgánica. Esto contribuyó aparentemente a la redistribución de nutrientes inorgánicos y la disolución de sílice biogénico como ya se ha visto reportada en algunos estudios (e.g. Shum & Sundby, 1996; Ehrenhauss & Huettel, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un pequeño desfase o retardo entre la aparición de proliferaciones de fitoplancton silicio durante invierno-primavera y el pico de concentraciones de SiO_3^- en la columna de agua durante primavera e inicios del verano resultado de su reciclaje.

Es importante resaltar que la presencia de concentraciones mayores e incrementos de SiO_3^- y FID en la columna de agua de la estación del estero El Tortugón, obedece principalmente a un mayor grado de acoplamiento entre en sedimento y la columna de agua, debido a lo somero del sitio y por ende al mayor impacto de la mezcla generada por la acción de los vientos y las corrientes de marea (Ragueneau *et al.*, 2006). Así mismo, diferencias espaciales relacionadas con la topografía, ubicación de los puntos de muestreo, influencia de las aguas del Golfo, la cercanía a la vegetación de manglar y a la descarga de los drenes, contribuyeron posiblemente a esta variabilidad.

Como ya se mencionó la dinámica temporal del FID aparentemente coincidió con algunos eventos que podrían haber favorecido la remineralización de materia orgánica tanto en la columna de agua como en el sedimento. En este último ambiente, el aporte a los estratos superficiales fue tal vez magnificado por mecanismos de resuspensión y transporte advectivo. Varios factores ambientales se encuentran afectando la cantidad de FID que es movilizado a través de mecanismos de adsorción y desorción en el sedimento (Sistema de Tamponizado). Su dinámica generalmente es el resultado de la interacción de varias propiedades físico-químicas tanto de la fase sólida (tamaño de grano, tipo de óxidos, área, mineralogía), como de la líquida (temperatura, fuerza iónica, composición, pH y potencial redox) (ver referencias en Froelich, 1988; Correll, 1999). Para el sistema lagunar de Macapule, ninguna de las variables anteriores fue determinada en sedimentos. Sin embargo, algunos mecanismos físicos podrían estar alterando la adhesión o absorción del Fósforo a partículas y en sedimentos hipóxicos de la laguna (Ayala-Baldenegro, 2004), promoviendo el intercambio con aguas superficiales pobres en este nutriente.

Otra variable que tiene conexión con el ciclo de producción fitoplanctónica y remineralización es el pH. En la boca de Macapule esta variable presentó un patrón estacional similar al de la temperatura superficial del agua (Spearman= 0.50; $p < 0.05$) y podría también estar asociada a una respuesta del ciclo de producción estacional de la laguna y la actividad microbiana. Generalmente, la actividad fotosintética suele modificar el pH del agua hacia valores alcalinos por la remoción de

CO₂ del agua (Axelsson, 1988). En este trabajo, sin embargo, la correspondencia de altos niveles de pH con los picos de producción primaria fue únicamente detectada en la boca de Macapule durante el periodo verano-otoño, de manera similar al comportamiento descrito para la temperatura superficial del agua (Spearman= 0.50; $p < 0.05$). Lo anterior coincide con algunos reportes sobre incremento del pH en verano para sistemas eutróficos templados (Hansen, 2002).

Algunos trabajos señalan que la situación opuesta ocurre en zonas de surgencia, es decir, una disminución en el proceso de alcalinización, suele ser atribuida a un incremento en el intercambio de gases con la atmosfera derivado de altos o moderados niveles de turbulencia durante el desarrollo de proliferaciones fitoplanctónicas (Havskum & Hansen, 2006). Esta condición pudo haber prevalecido en primavera para la boca de la laguna, en correspondencia con el predominio de vientos del NO. Simultáneamente, la producción de sustratos orgánicos posiblemente estimularon procesos microbianos de fermentación y/o respiración tanto en la columna de agua, como en sedimentos como ha sido descrito para condiciones semejantes (e.g. Newell *et al.*, 1981; Kerner & Yasseri, 1997). El resultado final de esta descomposición suele generar sustancias ácidas y un aumento en la presión parcial de CO₂ en el agua, disminuyendo el pH y alterando electro-negativamente el potencial de oxido-reducción (Contreras & Castañeda, 1993; ver referencias en Ferguson *et al.*, 2003).

La presencia conjunta de altas densidades de BP, PSV, MF, concentraciones de Clo *a* y menores niveles de pH en la boca durante los meses fríos, sugieren que la actividad respiratoria de la comunidad posiblemente predomina sobre la producción fotosintética (Hansen, 2002). De acuerdo a Magaña-Álvarez (2004), niveles de pH menos alcalinos y mayores concentraciones de demanda bioquímica de oxígeno suelen reportarse en la Laguna de Macapule a lo largo del estero y cerca a la desembocadura de los drenes principales durante el verano, influenciados por las altas temperaturas y un elevado suplemento de materia orgánica. En éste trabajo las estaciones de muestreo no se extendieron a dichos sectores de la laguna, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos niveles de pH sean

consecuencia de un acoplamiento de la actividad microbiana y la producción primaria, tal y como lo siguieren las correlaciones entre BP y Clo *a* (Spearman= 0.42; $p < 0.05$).

En relación al efecto del pH sobre los microorganismos, los niveles de pH en la Laguna de Macapule (7.6 - 8.2) no fueron quizás un factor decisivo en su sobrevivencia. No obstante, algunos trabajos han atribuido que este factor es quizás el responsable de la sucesión de especies (Schmidt & Hansen, 2001). Los valores más altos observados en los meses cálidos coincidieron con la presencia de altas y moderadas densidades de *Cylindrotheca closterium*, *Prorocentrum mínimum*, *P. micans*, *Ceratium* sp, *Pyramimonas* sp y algunos ciliados. Trabajos experimentales con poblaciones naturales de estos organismos extraídos de la picnoclina del estrecho de Oresund (Dinamarca), fueron altamente tolerantes a incrementos de pH y capaces de mantener altas tasas de crecimiento entre 8 y 9.5 (ver referencias en Hansen, 2002 y Pedersen & Hansen, 2003). Estas afirmaciones, sin embargo, son contrastantes con lo observado en trabajos previos (Schmidt & Hansen, 2001; Hansen, 2002), donde atribuyen parte de este predominio a una reducción del número de depredadores y de sus tasas de pastoreo, así como una mayor remoción sobre especies fitoplanctónicas menos tolerantes al incremento del pH (Pedersen & Hansen, 2003).

Particularmente, durante mayo se registró una disminución importante del pH en ambas estaciones y del oxígeno disuelto sólo en la boca de Macapule. Según Boynton *et al.* (1996), esta condición episódica ocurre frecuentemente en sistemas costeros eutrofizados y es modulada por el colapso de comunidades autotróficas más que por la influencia estacional de las aguas del fondo. Esto coincidió con la finalización de las proliferaciones de MF al final de los meses fríos (primavera). Bajo circunstancias similares, Pant & Reddy (2001) atribuyeron al cambio en el potencial de reducción-oxidación (red-ox) como uno de los principales controles encargados del suministro de FID a la columna de agua y de su retención en los sedimentos de sistemas costeros y estuarios. Corroborando esta hipótesis, un estudio realizado en el sistema de marisma de Mai Po (Hong Kong), registró una fuerte asociación entre

la condición reductora del sedimento y el flujo de Fósforo a la superficie durante el verano, como una posible respuesta al incremento en la temperatura del agua y la actividad microbiana (Lai & Lam, 2008). En sedimentos de sistemas altamente eutrofizados, la descomposición de la materia orgánica suele producir cambios en el potencial red-ox que incrementan la producción de iones de sulfuro a partir de la reducción de sulfatos. Bajo estas circunstancias, este anión compite fuertemente por el hierro oxidado (Fe^{+3}) que usualmente se encuentra formando parte de una molécula con el Fósforo ($\text{Fe}(\text{OOH})\approx\text{P}$), permitiendo de esta manera su liberación y la formación de FID en la columna de agua (Heijs *et al.*, 2000; Lai & Lam, 2008). Así mismo, la hipoxia en sedimentos también suele favorecer la reducción de complejos amorfos de Fósforo ligados al Hierro (Fe^{+3}) o Aluminio (Al^{+3}), permitiendo así la desorción y la liberación de FID en ambientes con bajas concentraciones de este nutriente (Heijs *et al.*, 2000; Lai & Lam, 2008).

Posterior al pulso de FID en Macapule a principios de verano, la súbita disminución y el mantenimiento de moderados niveles de FID estuvo posiblemente asociado al reestablecimiento de la estabilidad de la columna de agua y del potencial redox en el sedimento (Correl, 1998), así como al consumo por algunos componentes fitoplanctónicos (Krom *et al.*, 1991) como cianobacterias cocoides y en tricomas y pequeñas diatomeas, entre otros, que incrementaron sus abundancias durante el periodo cálido. En un estudio realizado en la Bahía de Villefranche (Francia) se identificó que la proporción más importante de captación de FID (50–68 %) estuvo atribuida a la fracción auto y heterotrófica más pequeña (0.2 - 1 μm) entre septiembre–diciembre de 1992 (Dolan *et al.*, 1995). Para este mismo trabajo se registró un incremento en el tiempo de renovación del FID hacia el final de los muestreos (diciembre) en correspondencia con un descenso en la tasa de captación por parte de las fracciones correspondientes a 0.2 - 1 y 1 - 5 μm , así como un cambio en la estructura fitoplanctónica hacia un predominio de células con tamaños mayores a 10 μm . En general, todos estos resultados sugieren que la dinámica del FID a lo largo del periodo monitoreado estuvo principalmente regulada por los procesos de

remineralización, el sistema de tamponizado y el consumo por parte de las fracciones picoplanctónicas.

En los resultados obtenidos fue evidente una asociación positiva entre las concentraciones de FID y la rapidez de los vientos del SE (Spearman= 0.46; $p < 0.05$), sugiriendo la presencia activa de esta última variable en la resuspensión del sedimento, como principal reservorio de este nutriente. Lo anterior fue quizás una de las condiciones que favoreció un desfase temporal de los picos de concentración de FID entre ambos sitios de muestreo, promoviendo mayores incrementos en junio de los niveles de la estación más somera (estero El Tortugón). En este mes fueron evidentes perturbaciones en la columna de agua que disminuyeron la pérdida de la transparencia en el estero, tal como ha sido observado en otros sistemas costeros someros (Guadayol *et al.*, 2009). Esto pudo alterar los mecanismos de desorción y absorción-adsorción que podrían haber puesto a disposición nuevo FID en la columna de agua (Pant & Reddy, 2001), así como también materia orgánica disuelta y particulada que retroalimentó positivamente las condiciones para el reciclaje de nutrientes en la columna de agua. En la boca de Macapule, en cambio, el máximo valor de FID detectado un mes antes que en el estero, respondió principalmente a un incremento en la remineralización de compuestos orgánicos generados por el declive de las proliferaciones de MF y por el aporte directo procedente de la excreción de MZ y mesozooplancton (Hargrave & Geen, 1968; Dolan, 1997); este último componente, integrado por copépodos y decápodos son usualmente abundantes en Laguna de Macapule entre febrero-marzo (Zavala-Norzagaray, 2006; De Silva-Dávila *et al.*, 2006).

En este trabajo en coincidencia con el incremento de temperatura y la máxima concentración de FID se observó el incremento inicial de PA entre mayo y junio en Macapule, cuyo crecimiento probablemente consumió y mantuvo en bajos niveles al FID hasta el final del periodo de muestreo. Este componente mostró respuestas positivas coherentes con el incremento estacional de la temperatura superficial del agua (Spearman= 0.67; $p < 0.05$); sin embargo, un resultado similar fue registrado también frente a la variación de la irradiancia solar (Spearman= 0.68; $p < 0.05$).

Consecuencias similares de ésta variable física sobre cambios en la densidad, biomasa y tasa de crecimiento de poblaciones y comunidades del PA han sido ampliamente documentados tanto en trabajos experimentales, como en ambientes costeros y continentales de zonas subtropicales y templadas (Miyazono *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2007; Jezberová & Komárková, 2007). En otros estudios, correlaciones significativas entre la tasa de crecimiento y la concentración de nutrientes como nitrato y FID, han sido visualizadas en poblaciones de PA pertenecientes al género *Synechococcus* sp únicamente para estaciones costeras superficiales del mar de China con temperaturas superiores a 16 °C (Chang *et al.*, 2003). Reforzando esta misma suposición, Sakamoto & Bryant (1999) notaron que cultivos de la cepa *Synechococcus* sp PCC 7002 que se encontraban creciendo con nitrato como única fuente de Nitrógeno, experimentaron una disminución en la tasa de duplicación y de producción fotosintética de oxígeno, así como un incremento en la clorosis, debido a una pobre captación de Nitrógeno cuando se estos se mantuvieron a bajas temperatura (15 °C).

Todos estos resultados sugieren que en verano la temperatura superficial del agua, la irradiancia solar y la concentración de FID, aparentemente tuvieron un efecto sinérgico sobre la dinámica estacional del PA. Esta hipótesis es coherente con datos de obtenidos en experimentos *in situ* en la laguna Thau (Francia, Mar Mediterráneo) (Bec *et al.*, 2005) y en sistemas de cultivos de cepas de *Synechococcus* procedentes de aguas continentales en la República Checa (Jezberová & Komárková, 2007) en donde temperaturas entre 23 - 28 °C e irradiancias altas ($>53 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y entre 852 - 915 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, para el primer y segundo estudio, respectivamente) estimularon la abundancia y tasas de replicación del PA. Adicionalmente a esta combinación de variables ambientales mencionadas, el crecimiento de PA en Macapule ocurre bajo una condición particular de menores concentraciones de NID y por lo tanto de bajas proporciones de N:P (< 16) con respecto a los meses fríos. Esta condición corrobora la capacidad de varias poblaciones del PA, especialmente aquellas del grupo cianobacterias, de proliferar en condiciones con desbalances en la proporción N:P (Pliński & Józwiak, 1999;

Vrede *et al.*, 2009). Algunas ventajas que permitieron al PA un mayor crecimiento durante verano-otoño en este ambiente limitado por Nitrógeno, radicarón principalmente en aspectos morfológicos y fisiológicos previamente reportados en la literatura. En cuanto al primero, su escaso tamaño celular le confiere una alta relación superficie-volumen que se traduce en una mayor cantidad de receptores y transportadores trans-membranales por unidad de volumen, así como un ahorro energético en el ingreso de sustancias al interior de la célula (Raven, 1998; Veldhuis *et al.*, 2005).

Varios datos sobre contenido de C:N:P en cultivos axénicos y poblaciones naturales de cianobacterias picoplanctónicas (de los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*) (Bertilsson *et al.*, 2003; Haldal *et al.*, 2003; Veldhuis *et al.*, 2005), indican que predominantemente este componente presenta una composición alta de N:P con respecto al valor de Redfield (16:1) (1958). De acuerdo a lo anterior, este grupo se ubicaría en la categoría de organismos “sobrevivientes” con relación a la estrategia de crecimiento y contenido celular de N:P (Arrigo, 2005). Esta proposición incluye aquellos con la capacidad de crecer en ambientes con condiciones limitantes, debido a su mayor proporción de maquinaria celular rica en Nitrógeno (pigmentos y enzimas) y encaminada a la captación de energía lumínica y nutrientes. Un ejemplo particular de estos, son algunas poblaciones de PA diazotróficas o fijadores de Nitrógeno molecular (N₂) (e.g. Reddy *et al.*, 1996; Huang & Chow, 1991; Huang *et al.*, 1999; Zehr *et al.*, 2001), que se encuentran dominando en los océanos oligotróficos (ver referencias en Partensky *et al.*, 1999)

No obstante, esta apreciación es contrastante con recientes experimentos *in situ* llevados a cabo durante una proliferación de PA en la temporada cálida para la laguna eutrofizada de Venecia (Italia) (Sorokin & Dallochio, 2008). En este trabajo se estimaron tasas de captación y regeneración del FID por parte del PA, así como sus tiempos de residencia en sistemas de cultivos enriquecidos. Los resultados indicaron un rápido reciclaje del Fósforo, así como la posibilidad de una vía alterna de captación y almacenamiento en exceso de este elemento, paralela a los mecanismos conocidos de fosforilación y de-fosforilación que están acoplados a la

biosíntesis y respiración. A diferencia de lo que se pensaba en estudios previos, esta capacidad de almacenaje sumada a la mixotrofia sugirió la posibilidad de que el PA pudiera estar balanceando la concentración de Fósforo en ambientes eutrofizados, a través de los procesos de regeneración y consumo (Sorokin & Dallochio, 2008)

Según lo anterior y reconsiderando la propuesta de Arrigo (2005), el PA cabría dentro el grupo de organismos “proliferadores”, caracterizados por una mayor proporción de organelos y biomoléculas relacionadas con el crecimiento celular (ribosomas y proteínas estructurales) que permiten el mantenimiento de altas tasas de duplicación y producción de biomasa. De esta manera sus requerimientos de Fósforo del medio ($N:P < 16$) son mayores para soportar la síntesis de altas cantidades de ácido ribonucleico (ARN) cuya estructura es rica en enlaces fosfato ($\sim P$). Esta categoría al parecer es más coherente con la detección de altas densidades de PA en Macapule durante todo el año, en especial después de la estimulación por el incremento en la temperatura superficial del agua y el pulso de FID en abril-junio y asimismo es coherente con otros registros en la literatura (e.g. Olsen *et al.*, 2006).

Estos argumentos indican que parte de la relativa estabilidad y poca fluctuación temporal de los niveles de Fósforo con respecto a la dinámica del Nitrógeno es quizás balanceada por una importante regeneración y consumo que son mantenidos principalmente por la capacidad mixotrófica del PA a lo largo del año. Por otra parte, la capacidad de este componente para sobrellevar las condiciones limitantes por Nitrógeno en Macapule, especialmente durante el periodo verano-otoño, son quizás el resultado de capacidad para fijar Nitrógeno, tal como lo indican otros estudios relacionados con la presencia y expresión de los genes implicados en la síntesis de nitrogenasa (Chow & Tabita, 1994)

Por otro lado, no obstante lo discutido anteriormente, la dinámica de la trama trófica microbiana no puede entenderse considerando solo los nutrientes inorgánicos, ya que otra fuente importante de nutrientes para algunos de sus componentes, lo constituyen las formas orgánicas tanto de Nitrógeno como de Fósforo (Bjorkman &

Karl, 1994; Zubkov *et al.*, 2003; Bronk *et al.*, 2007). Aparentemente, el aporte de las fracciones inorgánicas disueltas fue muy variable, con intervalo entre 5.2 - 74 % (promedio= 29.4 %) y 5.2 - 95.0 % (promedio= 47.5 %) para Nitrógeno y Fósforo, respectivamente. Sin embargo, en general estas fracciones no contribuyeron mayoritariamente al NT y PT. Esto es coherente con la suposición de que el material particulado, incluyendo el componente planctónico y la fracción orgánica disuelta, constituyen quizás el mayor reservorio de estos elementos en la columna, tal como ha sido detectado en algunos estudios en ambientes enriquecidos (Sorokin & Dallochio, 2008).

De acuerdo a Reuter (1977), la mayor cantidad de sustancias orgánicas que ingresan a sistemas estuarinos prevalecen en formas disueltas. De esta fracción aproximadamente un 90 % está constituida por geopolímeros o sustancias refractarias. Estos compuestos son menos susceptibles a transformaciones por acción física y bioquímica, y por tanto llegan a persistir en el orden de varios meses hasta cientos de años (Bronk, 2002). Gran parte de estas sustancias son ácidos húmicos y fúlvicos, porfirinas y amidas que tienen origen en ambientes terrestres. Los ácidos húmicos, por ejemplo, llegan a aportar alrededor de 40 a 80 % del Nitrógeno total al agua de mar (Alberts & Takács, 1999).

Es importante mencionar que la Laguna de Macapule no posee aún algún registro de concentraciones para sustancias refractarias. Sin embargo, la influencia estacional de aportes pluviales y por escorrentía (Martrínez-López *et al.*, 2007), así como los registros de altos y fluctuantes niveles de NT y NP encontrados en este trabajo, son indicios de que tales compuestos podrían estar presentes en alta o moderada cantidad, ejerciendo una participación importante en la dinámica de los nutrientes. Hoy en día, algunos trabajos sugieren que estas sustancias recalcitrantes, son considerables fuentes de Carbono y Nitrógeno para varias poblaciones de bacterias y fitoplancton, especialmente en ambientes costeros limitados por nutrientes inorgánicos (Carlsson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; See *et al.*, 2006; Bronk *et al.*, 2007). Altas contracciones de sustancias refractarias han sido asociadas a incrementos en la concentración de Amonio en sistemas estuarinos y costeros. Esto

se debe principalmente a su capacidad para capturar y transportar cationes en condiciones de baja salinidad. Una vez que estos complejos interactúan con aguas de mayor contenido de sales, el amonio es eventualmente liberado por intercambio catiónico poniéndolo a disposición para bacterias y fitoplancton (Bronk *et al.*, 2006).

Aunque en mucha menor concentración que los compuestos refractarios, las sustancias orgánicas lábiles y semilábiles, es decir aquellas con tasas de cambio relativamente cortas en la escala de minutos a años y fácil captación y asimilación, suelen estar también ampliamente distribuidas en sistemas acuáticos (Carlson & Ducklow, 1995). Estas fracciones incluyen moléculas de bajo peso molecular, algunas macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos) y sus sub-unidades (nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, etc.) y son reconocidas por ser una importante fuente de nutrientes de bajo costo energético para varios grupos planctónicos (Fuhrman, 1987; Jørgensen *et al.*, 1993; Bronk *et al.*, 2006). En este trabajo, la urea fue la única fuente orgánica disuelta evaluada. De acuerdo a la clasificación de Bronk *et al.* (2006) esta molécula es un compuesto altamente lábil que suele ser fuente de Nitrógeno y Carbono inorgánico disuelto para varios grupos de organismos. Su procedencia en la columna de agua está asociada a productos de excreción de varios protozoarios (L'Helguen *et al.*, 2005), algunos invertebrados (Miller & Glibert, 1998; Wu & Sun, 2006) y peces (Merino *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2008), así como al catabolismo de aminoácidos, pirimidinas y purinas, entre otras moléculas susceptibles a la actividad microbiana en columna de agua, pero especialmente en sedimentos (Therkildsen *et al.*, 1996, 1997; Berman *et al.*, 1999). En Macapule, una fuente adicional de urea proviene del arrastre de excretas y otros productos ricos en esta molécula que se emplean particularmente en actividades agrícolas y pecuarias en forma de fertilizantes (Ávila, 2001; Peña-Cabriales *et al.*, 2002) y en menor proporción como aditivos de algunos alimentos para ganado vacuno (e.g. Cofré & Jahn, 2007), respectivamente.

En este trabajo, los niveles de urea son moderadamente elevados con respecto a los reportados en la literatura para algunos sistemas costeros (McCarthy, 1972; Tungaraza *et al.*, 2003; Fukao *et al.*, 2006) y estuarinos (Kaufman *et al.*, 1983;

Glibert *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2006) en su mayoría de regiones templadas. No obstante, las mayores concentraciones en la Laguna de Macapule son similares a las observadas en las costas del Valle del Yaqui (parte norte del Golfo de California), durante el periodo de post-fertilización intensiva en los campos agrícolas con este mismo compuesto (Glibert *et al.*, 2006). De igual manera, la contribución de urea al NT en el área de estudio fue generalmente superior (11 y 97 %) a la registrada por Gutiérrez-Mendieta *et al.* (1998) para varios sistemas costeros y estuarinos del Golfo de México (7 a un 52%), en donde éste compuesto representó la segunda fuente nitrogenada más abundante después del amonio.

Remsen (1971) y McCarthy & Kamykowski (1972) coinciden en que la distribución de la urea en aguas superficiales es muy irregular (en parches) y puede fluctuar fuertemente entre uno y otro punto de muestreo. Particularmente, ambos sitios en macapule registraron fuertes diferencias en el patrón de urea durante el periodo cálido. Esto está posiblemente relacionado con las características hidrográficas de cada sitio. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta variabilidad espacial este ligadas a su proximidad con la fuente de origen y/o a la demanda de urea, tal y como fue sugerido por Berman (1974) en el estrato superficial (0-10 m) del lago Kineret (Mar de Galilea). Para ese sistema, los niveles de urea fluctuaron ampliamente desde indetectables hasta 150 μM en verano, y fueron atribuidos principalmente a la dinámica del zooplancton y peces, que aparentemente mantuvieron altas densidades y tasas de excreción de urea. Bajo estas circunstancias también se favoreció el pastoreo sobre el fitoplancton, reflejándose en sus abundancias y por consiguiente en un pobre consumo de este compuesto.

Algunos trabajos han detectado que el PA tiene preferencia por NH_4^+ (Harrison *et al.*, 1996) y eventualmente por NO_3^- y NO_2^- in ausencia de otras fuentes de Nitrógeno (Glover *et al.*, 1988; Bird & Wyman, 2003), Sin embargo, la utilización de ciertos compuestos orgánicos es frecuente en estas fracciones (Bjorkman & Karl, 1994; Zubkov *et al.*, 2003). Algunos estudios en genómica y fisiología han detectado la presencia de genes y actividad enzimática, relacionados con la utilización urea como fuente de Nitrógeno y Carbono a partir de su hidrólisis a NH_4^+ y CO_2 en varios

géneros de cianobacterias del PA (e.g. Berns *et al.*, 1966; Kapp *et al.*, 1975; Collier *et al.*, 1999; Palinska *et al.*, 2000) y algunos picoeucariotes (Berg *et al.*, 2002). Esto indica que la dinámica de este compuesto orgánico podría no solo estar regulada por las diferentes fuentes, sino también por las poblaciones potencialmente capaces de consumirla. En este trabajo la abundancia de PA estuvo positivamente correlacionada con la concentración de urea únicamente en la boca de Macapule (Spearman= 0.80; $p < 0.05$). En este sitio durante los meses cálidos, las mayores concentraciones de urea estuvieron quizás relacionadas con un bajo consumo, así como con una alta densidad y actividad metabólica de CH y MZ. De acuerdo a L'Helguen *et al.* (2005), estas fracciones coincidentemente son las responsables de las mayores tasas de regeneración y aporte de urea en las aguas superficiales de Canal Inglés en el periodo de verano. Por otro parte, la ausencia de una tendencia estacional en los niveles de urea en el estero El Tortugón, están relacionados con mayores densidades y tasas de captación por parte de las poblaciones del PA durante verano-otoño, las cuales posiblemente no fueron eficientemente balanceados por pastoreo de MZ y CH (Agawin *et al.*, 1998; Putland & Iverson, 2007). Esto último aparentemente fue coherente con las correlaciones positivas entre las fracciones del microzooplancton y el PA (MZ: Spearman= 0.36; $p < 0.01$; CH: Spearman= 0.40; $p < 0.05$).

De acuerdo a McCarthy & Eppley (1972), la presencia de altas concentraciones de NH_4^+ ($> 7 \mu\text{M}$) ha sido uno de los argumentos recurridos para explicar la acumulación de urea en ambientes acuáticos. Este ión suprime los mecanismos fisiológicos del fitoplancton para la captación de urea y/o transformación extracelular. No obstante, de haber ocurrido una inhibición de este tipo, hubiese sido más evidente en el estero El Tortugón en donde los niveles de NH_4^+ en verano (1.1 - 6.8 μM) fueron superiores que en la boca ($< 2.7 \mu\text{M}$). Además, en este último sitio los niveles de NH_4^+ se mantuvieron relativamente bajos y poco fluctuantes a partir de mayo, mes durante el cual se detectaron altas concentraciones de urea. Por otra parte, algunos reportes en sistemas costeros y estuarinos han observado directa e indirectamente indicios acerca del consumo y preferencia de algunos grupos

fitoplanctónicos por compuestos orgánicos en condiciones limitantes por nutrientes inorgánicos (e.g. Ignatiades *et al.*, 1986; Gobler & Sañudo-Wilhelmy, 2001; Mengelt & Prézelin, 2002; Berman & Bronk, 2003; Bronk *et al.*, 2007). En el presente trabajo, las diferencias más resaltantes entre ambos sitios radicaron en la superioridad numérica de PA, CT y algunas pequeñas diatomeas (penales) en el estero El Tortugón durante los meses cálidos. Varios especies observadas allí presentan un metabolismo mixótrofo ya documentado, como *Pseudo-nitzschia* sp (Mengelt & Prézelin, 2002; Loureiro *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2007), *C. closterium* (Grant *et al.*, 1967), *Skeletonema costatum* *Chaetoceros* sp y *Synechococcus* sp (ver referencias en Ignatiades *et al.*, 1986; Collier *et al.*, 1999) del cual se presume o se tiene la certeza de su facultad para explotar la urea como fuente de Nitrógeno, Carbono y/o energía. Estos resultados sugieren que gran parte de las diferencias espaciales y temporales en los niveles de urea observadas entre ambos sitios podrían estar influenciadas tanto por la dinámica y actividad de las fracciones del CH y MZ, así como por la estructura fitoplanctónica y su capacidad para captar esta fuente nitrogenada reducida en periodos desfavorables para la captación del NID (Turley, 1986).

Además de los componentes autótrofos ya discutidos, es necesario mencionar que de acuerdo con algunos modelos conceptuales, cambios temporales del orden de años y décadas en la biomasa y densidad de los grupos de productores primarios (pastos marinos, macroalgas, etc.), podrían estar relacionados con alteraciones en las condiciones físicas del agua como la transparencia a consecuencia de un aumento en el grado de eutrofización y la tala del bosque de manglar. Esto último sin embargo, ha sido rechazado para la Laguna de Macapule (Ladrón de Guevara-Torres *et al.*, 2003), indicando que su actividad en la remoción de gran parte de las descargas continentales de nutrientes aún continua siendo vigente (Escobedo-Urías, 1997).

No existen datos para comprobar si en Laguna de Macapule se ha dado este cambio. Sin embargo, versiones orales de habitantes de la zona, indican que hace aproximadamente una década atrás la Laguna de Macapule presentaba mayor cobertura de macrófitas (pastos marinos) y macroalgas en las zonas más someras

del la laguna. En coincidencia con esta versión, se ha reportado una disminución de la transparencia del agua e incrementos en la concentración de Clo *a* en la columna de agua (Escobedo-Urías & Martínez-López, 2007). No obstante estas observaciones y a diferencia de lo que ocurre en sistemas costeros de latitudes altas, los datos de profundidad de la capa fótica calculados a partir de la profundidad del disco Secchi, indican que a pesar de la presencia de altas concentraciones de sólidos totales suspendidos y material orgánico particulado en la columna de agua (Poot-Delgado, 2006), la incidencia de luz en la Laguna de Macapule no es limitante para el crecimiento del componente foto-autótrofo (Anexo 1), ya que la intensidad de la energía lumínica (solar) en ambientes someros subtropicales es generalmente moderada y alta a lo largo del ciclo estacional (Valiela, 1995). Esta condición no solo favorece la actividad fotosintética de aquellos que prevalecen en la columna de agua, sino también de aquellos asociados al fondo (sedimento) y con mecanismos de fotoadaptación mediante los cuales pueden realizar procesos fotosintéticos (Blanchard & Montagna, 1992). La presencia de estos componentes trae consigo notables implicaciones tanto en la disponibilidad de nutrientes y la dinámica de algunas variables físico-químicas (pH, potencial re-dox y oxígeno disuelto), como en la transferencia de energía entre los diferentes compartimientos tróficos. Varios estudios han reconocido que el reemplazamiento de estas comunidades ocasiona cambios relevantes en los procesos biogeoquímicos que afectan la retención de nutrientes en el sistema (Ver referencias en McGlathery *et al.*, 2007).

Aparentemente, altas biomásas de microalgas en la columna y en sedimentos promueven menores tiempos de reciclaje de nutrientes (del orden de días) con respecto a los observados en una comunidad dominada por macrófitas perennes (Duarte, 1995). Esto debido principalmente a su composición química en términos de menor contenido de sustancias refractarias (Buchsbaum *et al.*, 1991; Enríquez *et al.*, 1993) y a su tolerancia a la hipoxia y a varios compuestos generados por la descomposición de altas concentraciones de materia orgánica en sedimentos (Sundbäck *et al.*, 1990; ver referencias en McGlathery *et al.*, 2007).

Bajo estas consideraciones, el registro de altas concentraciones de fitoplancton en Macapule ha servido como un buen indicador del proceso de enriquecimiento, sin embargo, se desconoce aun la contribución de la comunidad fitobentónica, su estructura y dinámica temporal. Algunas observaciones previas en muestras de la columna de agua revelan que varias poblaciones microalgales bentónicas están presentes episódicamente y/o prevalecen a lo largo del año (Poot-Delgado, 2006; Ayala-Rodríguez, 2008). En otros sistemas similares se ha observado esta misma situación identificándose a la resuspensión como el mecanismo que mantienen en la columna de agua a estas microalgas en relación con el efecto del ciclo de mareas, las corrientes, (Baillie & Welsh, 1980; Lucas *et al.*, 2000) y vientos (Demers *et al.*, 1987; De Jonge & Van Beusekom, 1995) entre otros. Las observaciones de este estudio, sugieren una relevante participación de un componente fitobentónico en el sedimento que podría quizás modular algunas condiciones fisicoquímicas (pH, oxígeno disuelto, potencial re-dox., etc.) en esa zona, así como potencializar la acumulación de materia orgánica, la regeneración y el consumo de nutrientes inorgánicos; esto último especialmente durante pulsos inducidos por la resuspensión de sedimentos.

VIII.2 INTERACCIONES ENTRE COMPONENTES MICROBIANOS

VIII.2.1 Mixotrofia

De acuerdo con el concepto de mixotrofia, los organismos con esta capacidad pueden usar tanto el metabolismo autótrofo como el heterótrofo para suplir sus requerimientos de energía y Carbono (ver referencias en Jones, 2000). Esta definición suele ser muy simplificada, ya que no discierne con claridad entre aquellos organismos con preferencias por la naturaleza de la fuente de energía y Carbono, la presencia e intensidad de la simbiosis (en caso de que haya), o acerca del predominio por algún tipo de metabolismo (autótrofo o heterótrofo), entre otras incertidumbres.

Algunos esfuerzos, se han encaminado en tratar de hacer una clasificación en términos de su modo de nutrición y comportamiento (Jones, 1997). Sin embargo, aquí se tratará de diferenciar en mixótrofos simbióticos, como es el caso de *Myrionecta rubra*, y organismos individuales con mecanismos de osmotrofia y fagotrofia, es decir aquellos con requerimientos de materia orgánica disuelta y particulada (incluyendo presas unicelulares) respectivamente, como fuente de energía o Carbono.

De acuerdo a Mengelt & Prézelin (2002), hay fuertes indicios de que varias especies de *Pseudo-nitzschia* tienen esta capacidad osmotrófica sobre sustancias lábiles para suplir sus necesidades de Nitrógeno. Algunas observaciones y pruebas experimentales documentan que una vez terminados los eventos de proliferación en la columna de agua, *Pseudo-nitzschia* spp. permanece en estratos más profundos o en el sedimento, bajo condiciones de oscuridad en donde el metabolismo heterotrófico es activado. En el estero El Tortugón, la zona fótica aparentemente abarcó toda la columna de agua durante el periodo estudiado, sin embargo, el evidente incremento de estas poblaciones en otoño bajo condiciones limitantes por Nitrógeno, sugiere que este tipo de metabolismo pudo haber estado presente en correspondencia con posibles aportes continentales de materia orgánica (Tittel *et al.*, 2009) procedente de los drenes y escorrentía en los meses más lluviosos.

Recientemente, varios estudios demostraron que la contribución y actividad de mixótrofos fagotróficos es alta en estratos iluminados de la columna de agua (ver referencias en Jones, 1997 y 2000). A pesar de que las técnicas empleadas para el recuento de microorganismos en este trabajo tienen ciertas limitaciones para la diferenciación de mixótrofos, la incidencia de grandes densidades de NF y PA y en menor proporción DF y FF en la Laguna de Macapule, indican que su posible participación en las redes tróficas debe ser contemplada, en especial cuando se refiere a un sistema somero, con desbalances en las proporciones de nutrientes y con buena oferta de presas y partículas orgánicas. En ambientes relativamente más profundos y en sistemas experimentales, se ha reportado que organismos mixótrofos fagotróficos alcanzan mayores tasas de crecimiento poblacional y biomasa que

pastoreadores heterotróficos especialistas en ambientes iluminados o en la parte superficial de la columna de agua; de igual manera, su remoción o pastoreo sobre presas (<10 μm) llega a ser notablemente más alto en este estrato que en la zona afótica (Tittel *et al.*, 2003). Estas diferencias se atribuyen principalmente a la habilidad competitiva de los mixótrofos para explotar diversas fuentes de energía (química y solar), así como nutrientes minerales a bajo costo en condiciones iluminadas (Nygaard & Tobiesen, 1993; Rothhaupt, 1996; Jones, 2000).

Con respecto a los mixótrofos fagotróficos <200 μm , varios estudios han reconocido su participación en las redes tróficas herbívoras y microbianas, en especial con relación a la formación de proliferaciones algunas de ellas nocivas, su persistencia bajo condiciones desfavorables de nutrientes inorgánicos y luz, y a su efecto o control sobre otras poblaciones planctónicas por pastoreo (e.g. Stoecker, 1997; ver referencias en Stoecker, 1999 y Burkholder *et al.*, 2008) y parasitismo (Coats *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2004).

Como se mencionó antes, algunas limitaciones relacionadas con la técnica de recuento de microorganismos por epifluorescencia, no permitieron la diferenciación de aquellos con metabolismo mixotrófico, así como la identificación taxonómica precisa de algunos de organismos (Caron, 1983). Sin embargo, fue posible explorar la estructura de la comunidad microplanctónica (datos no mostrados) a través de microscopía de campo claro. La contribución de esta fracción al total de organismos autótrofos en Macapule fue aparentemente menor al aporte de nanoflagelados mixotróficos. Sin embargo, los géneros reportados aquí mostraron las mayores densidades dentro del grupo de los dinoflagelados. Esta situación es similar a la observada por Ismael (2003) en el puerto este de Alejandría (Egipto), en donde el 98 % de la biomasa autotrófica y mixotrófica fue dominada por la fracción < 30 μm ; mientras tanto, el 52 % y 78 % de la porción del fitoplancton total y de dinoflagelados, respectivamente, estuvo constituida por algunas especies con géneros mixotróficos (*Gyrodinium*, *Ceratium*, *Scrippsiella* y *Prorocentrum*). Coincidentemente, estos mismos taxa junto con un género reportado como heterotrófico (*Protoperidinium*) representaron la mayor porción de organismos fagotróficos en la Laguna de

Macapule; no obstante, la especie *P. minimum* persistió en la mayoría de los muestreos con la máxima contribución numérica (datos no mostrados).

Según la clasificación modificada para el grupo de dinoflagelados basada en las estrategias adaptativas de supervivencia propuesta por Smayda & Reynolds (2001, 2003), los géneros anteriormente mencionados se encuentran incluidos dentro de las categorías I (Gimnodinoides), II (Peridininios/Prorocentroides) y III (Ceratiarios). Estos tienen en común que son especies propias de ambientes costeros someros, de poca turbulencia y caracterizados por altas irradiancias de luz; no obstante, difieren substancialmente en sus requerimientos de nutrientes con una tendencia a permanecer en sistemas eutróficos a oligo-mesotróficos. El tipo de nutrición (mixotrofia fagotrófica) de estos géneros puede considerarse como una característica fisiológica importante para entender la distribución espacial y temporal de las especies observadas. Particularmente, el patrón temporal del género *Scrippsiella* y las especies *P. minimum* y *P. mexicanum* difirieron al de los otros dinoflagelados, registrando proliferaciones en invierno-primavera, de manera similar a la dinámica observada para diatomeas en la boca de Macapule. La temporalidad observada para *P. minimum* es consistente con reportes previos de proliferaciones de esta misma especie para el sistema lagunar (Poot-Delgado, 2006;) y para varios lugares a lo largo de la costa pacífica mexicana y el Golfo de México (ver referencias en Poot-Delgado, 2006; Martínez-López *et al.*, 2008). Este patrón, sin embargo, es contradictorio según lo descrito por Smayda & Reynolds (2001) acerca de que este grupo evade condiciones favorables para el crecimiento de diatomeas.

La incidencia de altas densidades de *P. minimum* durante primavera y comienzos del verano en zonas costeras templadas ha sido atribuida principalmente a su capacidad para mantener tasas de crecimiento constantes frente a esporádicos pulsos de Nitrógeno (Sciandra, 1991) y de ingerir presas (usualmente cryptófitas u otros nanoflagelados) bajo condiciones limitantes por luz y nutrientes inorgánicos (Stoecker *et al.*, 1997). Esta última posibilidad, sin embargo, no es coherente con la proliferación registrada en primavera frente a moderadas y altas concentraciones de nutrientes inorgánicos en Macapule. Esta última condición, inhibe la expresión del

metabolismo mixotrófico a pesar de la gran disponibilidad de presas (BP, PA y NF), a menos tal vez, de que se trate de requerimientos de factores traza de crecimiento (Stoecker *et al.*, 1997). Según Stoecker *et al.* (1997) la alimentación por fagotrofia en la Bahía de Chesapeake suele ser común en verano cuando el fitoplancton es fuertemente limitado por Nitrógeno. Esto explicaría como este género al igual que otros dinoflagelados (*Gyrodinium* y *Ceratium*) con capacidad mixotrófica prevalecen e incluso repuntan a finales del periodo cálido del año.

Una de las explicaciones más acertadas a la aparición de altas abundancias de *P. minimum* en marzo y abril, está relacionada a la intromisión de proliferaciones generadas afuera de la boca de la Laguna de Macapule en coincidencia con eventos de surgencia y pulsos de NH_4^+ y NO_3^- (Martínez-López *et al.*, 2008). Esto al parecer, sustenta las diferencias espaciales detectadas en las magnitudes de abundancia en relación con la ubicación respecto al foco de la surgencia.

Por otra parte, algunos estudios en medios de cultivo y sistemas costeros templados, han identificado que el crecimiento de *P. minimum* estuvo asociado positivamente a altas irradiancias y temperaturas, así como al suplemento ácidos húmicos y fúlvicos (ver referencias en Burkholder *et al.*, 2008); siendo estos últimos compuestos esenciales como quelantes de elementos traza, involucrados en la biosíntesis de la enzima para la asimilación de NO_3^- (Heil, 205;). Lo anterior sugiere que las proliferaciones de *P. minimum* en Macapule son quizás el resultado de su transporte por advección desde afuera de la laguna y a niveles elevados de nutrientes nitrogenados oxidados. Así mismo, su persistencia a lo largo del ciclo de muestreo es quizás mantenida por su capacidad mixotrófica y el suplemento de aportes terrígenos (sustancias húmicas y fúlvicas) derivados del ciclo de irrigación de campos agrícolas y/o escorrentía en época de lluvias durante invierno-primavera y verano otoño, respectivamente.

Esto resultados y los de otros estudios indican que la contribución del componente mixotrófico en sistemas costeros eutrofizados podría ser relevante en términos de la conexión y transferencia de Carbono entre las redes tróficas

microbianas y las herbívoras. Eventualmente, esta situación se ve alterada cuando el crecimiento de estos organismos promueve condiciones nocivas que impiden el control eficiente de su producción por parte del metazooplancton u otros consumidores (Burkholder *et al.*, 2008).

VIII.2.2 Componentes autotróficos

Aparentemente, la contribución de especies inorgánicas del NID y compuestos orgánicos lábiles como urea a lo largo del año, muy probablemente promovieron la distribución temporal de la abundancia de algunos grupos microfitoroplanctónicos. Varias observaciones en trabajos experimentales y zonas de surgencias, han reportado que la disponibilidad de formas nitrogenadas oxidadas incrementa el crecimiento y la velocidad de captación de algunas especies pertenecientes a los géneros *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Stephanopyxis*, *Rhizosolenia*, *Pseudo-nitzschia*, *Guinardia*, y *Eucampia* (Malone, 1980; ver referencias en Dortch, 1990; Cloern & Dufford, 2005; Cochlan *et al.*, 2008). Mientas tanto, mayores niveles de formas regeneradas (NH_4^+ y urea) han sido asociados principalmente al desarrollo de fitoplancton de talla pequeña (<20 μm) y algunas diatomeas (*Cylindrotheca closterium*); en algunas circunstancias promueven también proliferaciones de poblaciones potencialmente nocivas (Legendre & Rassouladegan, 1995; Hildebrand & Dahlin, 2000; ver referencias en Glibert *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 2007). Sin embargo, fueron también observadas altas densidades de *Skeletonema costatum*, en algunos meses del periodo de estudio, lo cual obedece a su capacidad para captar tanto fuentes reducidas como oxidadas de Nitrógeno y evitar la inhibición de estas últimas por altas concentraciones de amonio (ver referencias en Collos *et al.*, 2003)

La presencia de formas reducidas fue dominante en Macapule y posiblemente favoreció altas densidades de los componentes autótrofos pequeños durante todo el periodo de muestreo y eventuales proliferaciones de NF y PA. A diferencia de este último, el NF no reveló una marcada variación estacional, lo cual fue un reflejo de la

ausencia de relaciones estadísticas con las variables ambientales. Los valores de abundancia de ambos componentes fueron altos y fluctuaron dentro de los intervalos reportados para sistemas eutrofizados tanto de zonas templadas como subtropicales (Tablas 5 y 6) (e.g. Ray *et al.*, 1989; Murrel & Loes, 2004, Murrel & Caffrey, 2005; Cai *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007). Estos resultados indican que a pesar de los desbalances en las proporciones N:Si:P, el elevado contenido de nutrientes en Macapule incrementa la capacidad de carga del sistema para soportar altas densidades de estas fracciones de talla pequeña del fitoplancton durante todo el año.

Tabla 5. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de nanofitoplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado.

| Abundancia de nanofitoplancton (cél·mL ⁻¹) | | | Lugar | Referencia |
|--|----------------------|-----------------------|---|------------------------------|
| Promedio | Mínimo | Máximo | | |
| 2.5 x10 ³ | - | 4.0 x10 ³ | Pacífico Noreste Sub-Ártico | Doherty (1995) |
| - | 0 | 3.0 x10 ³ | Zona oceánica (surgencia de Chile) | Cuevas <i>et al.</i> (2004) |
| - | 4.3 x10 ² | 1.9 x10 ⁴ | Bahía de Hiroshima, Mar de Japón | Iwamoto <i>et al.</i> (1994) |
| - | 3.8 x10 ² | 3.2 x10 ³ | Plataforma continental (surgencia de Chile) | Cuevas <i>et al.</i> (2004) |
| - | 7.1 x10 ² | 1.3 x10 ⁴ | Transecto costa-océano (Atlántico Norte) | Davis <i>et al</i> 1985 |
| 9.5 x10 ³ | 1.1 x10 ¹ | 2.1 x10 ⁵ | Estuario de Changjiang (China) | Pan <i>et al.</i> (2007) |
| - | - | 1.3 x10 ⁵ | Bahía de Guanabara (Brasil) | Santos <i>et al.</i> (2007) |
| - | 5.0 x10 ² | 1.5 x10 ⁴ | Estuario Río York (USA) | Ray <i>et al.</i> (1989) |
| 9.8 x10 ³ | 4.2 x10 ³ | 2.98 x10 ⁴ | Estero El Tortugón | Este trabajo (2009) |
| 6.0 x10 ³ | 3.7 x10 ² | 1.5 x10 ³ | Boca Macapule | |

Tabla 6. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de picoplancton autótrofo en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado.

| Abundancia de picoplancton autótrofo (cél·mL ⁻¹) | | | Lugar | Referencia |
|--|----------------------|-----------------------|---|--------------------------------|
| Promedio | Mínimo | Máximo | | |
| - | - | - | Mar de Sargazo (Sur de Bermuda) | Caron <i>et al.</i> (1999) |
| - | - | - | Cuenca Oceánica Beford | Li (1998) |
| - | 1.1 x10 ⁴ | 2.2 x10 ⁵ | Costa Pacífica (Columbia Británica y Canadá) | Clasen <i>et al.</i> 2008 |
| - | 1.0 x10 ⁵ | 1.7 x10 ⁶ | Mar Báltico (Finlandia) | Kuosa (1991) |
| 1.8 x10 ⁵ | - | - | Bahía Chesapeake (USA) | Ray <i>et al.</i> (1989) |
| 7.1 x10 ⁴ | - | - | Bahía Villefranche (Mediterráneo) | Jacquet <i>et al.</i> (1998) |
| 2.3 x10 ³ | - | - | Costa Este mar Mediterráneo (Israel) | Berman <i>et al.</i> (1984) |
| - | 1.7 x10 ⁴ | 2.7 x10 ⁵ | Norte del Golfo de California | Díaz & Maske (2000) |
| - | 1.0 x10 ⁵ | 1.9 x10 ⁶ | Bahía Todos Santos Corriente de California (México) | Díaz & Maske (2000) |
| - | 4.5 x10 ³ | 3.1 x10 ⁵ | Bahía de Biscay (Mar Cantábrico) | Morán (2007) |
| - | 2.3 x10 ³ | 1.2 x10 ⁵ | Costa Noreste (Taiwan) | Tsai <i>et al.</i> (2005) |
| - | - | 1.2 x10 ⁵ | Laguna Cesine (Norte Mar Adriático) | Del Negro <i>et al.</i> (2007) |
| - | 2.7 x10 ⁵ | 1.2 x10 ⁶ | Bahía Apalachicola (Florida, USA) | Putland (2005) |
| - | 1.0 x10 ⁴ | 1.0 x10 ⁵ | Costa del Mar oriental de China | Chan <i>et al.</i> (2003) |
| - | 4.0 x10 ³ | 5.8 x10 ⁶ | Costa Noreste Golfo de México (Florida, USA) | Murrel & Caffrey (2005) |
| 2.3 x10 ⁴ | 1.8 x10 ³ | 2.70 x10 ⁵ | Estuario de Changjiang (China) | Pan <i>et al.</i> (2007)* |
| 2.6 x10 ⁵ | 1.5 x10 ⁴ | 6.2 x10 ⁵ | Estero El Tortugón | Este trabajo (2009) |
| 1.1 x10 ⁵ | 3.8 x10 ⁴ | 1.8 x10 ⁵ | Boca Macapule | |

Por otro parte, la presencia de diatomeas en ambientes acuáticos ha sido considerada como un buen indicador de la capacidad de un sistema para responder a condiciones de enriquecimiento y turbulencia (ver referencias en Guadayol *et al.*, 2009). A pesar de que en Macapule las concentraciones de nutrientes inorgánicos tanto oxidados como reducidos son elevadas en invierno-primavera, la alta duración, frecuencia e intensidad de eventos turbulentos en la columna de agua fueron determinantes para el desarrollo de proliferaciones de *Skeletonema costatum*, *Stephanopyxis turris*, *Guinardia delicatula* y varias especies de *Chaetoceros* (*C. curvisetus*, *C. compressus*, *C. spp.*). Algunas de estos organismos, han sido reportados bajo circunstancias similares en otros sistemas costeros de la parte sur del Golfo de California (e.g. Ulloa, 2005; Villegas-Aguilera, 2009).

El patrón temporal observado en las fracciones fitoplanctónicas en Macapule es coherente con observaciones de tasas de crecimiento y producción de Carbono en experimentos de meso-escala realizados en los mares Báltico y de Noruega (Olsen *et al.*, 2006). En estos trabajos se reportaron mayores contribuciones del PA y NF durante periodos de menores concentraciones de nutrientes inorgánicos, así como un posterior incremento en el crecimiento y la producción de fracciones mayores (>20 μm) frente a una condición de enriquecimiento. Según este y otros estudios (ver referencias en Olsen *et al.*, 2006), el PA responde débilmente al incremento al aporte de nutrientes y bajo esta circunstancia nunca llega a ser dominante en términos de biomasa, debido principalmente al fuerte control por pastoreo (Sherr & Sherr, 2002) y lisis viral (ver referencia en Mann, 2003). Con respecto al primer control, como se discutirá más adelante, hay fuertes indicios de que su intensidad en la Laguna de Macapule se incrementó en los meses cálidos, y fluctuó espacialmente en respuesta a diferencias en la estructura taxonómica del microzooplancton de ambos sitios. En cuanto al control viral, no se observaron correlaciones significativas con el PA, sin embargo, altos cocientes PSV:PA en la temporada fría presumen mayores pérdidas debidas a la lisis viral. Estos resultados sugieren una posible alternancia estacional entre ambos controles sobre el PA.

Como se mencionó previamente, durante la temporada fría, los altos niveles de nutrientes tanto en especies reducidas como oxidadas del Nitrógeno, beneficiaron la densidad de algunos grupos del MF y mantuvieron elevadas abundancias de NF. Esta condición sumada al registro de moderadas y altas irradiancias podrían haber jugado un papel preponderante en el incremento de la exudación vegetal, el aporte de sustratos orgánicos y por consiguiente la estimulación de la abundancia de BP (e.g. Berman & Holm-Hansen, 1974; Zlotnik & Dubinsky, 1989; Church *et al.*, 2000). En este trabajo, como en otros realizados en ambientes marinos y continentales (e.g. Bird & Kalff, 1984; Findlay *et al.*, 1991; Bouvy *et al.*, 1998) fue evidente la asociación positiva (Spearman= 0.42; $p < 0.05$) entre la densidad de BP y Clo *a*. Esta misma relación ha sido también ampliamente documentada en la literatura en términos de biomasa y producción de cada componente (Cole *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1992; Barrera-Alba *et al.*, 2008).

Esto apunta al componente del MF como una de las fuentes principales de compuestos orgánicos disueltos y/o particulados durante el periodo frío. De alguna manera, lo anterior corrobora la dependencia del componente procariota heterotrófico por la producción autotrófica de sustratos orgánicos en Macapule. La validez de esta aseveración, todavía no está del todo comprendida en ambientes costeros eutróficos subtropicales (Wallberg *et al.*, 1999), ya que el BP recicla materia orgánica disuelta y particulada no solo del fitoplancton, sino también de cualquier otro nivel trófico y aporte externo al sistema. Por ejemplo en algunos sistemas estuarinos influenciados fuertemente por la marea o aportes fluviales, la biomasa y producción del BP puede exceder la del fitoplancton, como resultado de un incremento en el subsidio de material orgánico alóctono (Pradeep-Ram *et al.*, 2007), y la prevalencia de condiciones físicas limitantes para el desarrollo del fitoplancton como la baja penetración de luz (Morales-Zamorano *et al.*, 1991). Lo anterior es quizás consistente con el segundo incremento más notable en la densidad de BP a finales el periodo cálido en el estero, lo que coincidió con el aumento en el número de diatomeas de pequeño tamaño y potencialmente mixótrofas, algunos repuntes en las concentraciones de Clo *a*, así como los mayores niveles de precipitación en la zona.

En concordancia con lo mencionado arriba, esto fue posiblemente el resultado de una estimulación de la producción bacteriana debido a la contribución de materiales orgánicos alóctonos, transportados por vía escorrentías pluviales y lixiviación.

Las densidades detectadas de BP, al igual que la de otros componentes microbianos de la Laguna de Macapule, fueron considerablemente elevadas y comparables con otros ambientes costeros eutrofizados (e.g. Boehme *et al.*, 1993; Hewson, 2000; Almeida *et al.*, 2001a; Murrell, 2003). Esto al parecer, es un indicador de que en sistemas enriquecidos el BP retiene gran proporción del Carbono orgánico y dificulta su transferencia a niveles tróficos superiores, de manera similar a como fue hipotetizado para ambientes oceánicos oligotróficos a través del esquema del ciclo microbiano (Azam *et al.*, 1983; Legendre & Rassouladegan, 1995; Pomeroy, 2000). La mayoría de los sistemas acuáticos costeros y zonas de surgencias se encuentran caracterizados por una estructura trófica herbívora, en donde la contribución del componente microbiano a la alimentación de los metazoos es despreciable (Legendre & Rassouladegan, 1995). No obstante, los resultados de las variables biológicas sugieren que la Laguna de Macapule tiene una activa participación de la trama microbiana.

La combinación entre ambos modelos conceptuales (herbívoro y microbiano), fue propuesta por Legendre & Rassouladegan (1995) bajo el nombre de red trófica multívora. Ésta revela como la fracción del MF capta aportes alóctonos de NID (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+) y los transfiere al reservorio de Nitrógeno orgánico disuelto (NOD) y NH_4^+ , este último a través del pastoreo por protozoos y la descomposición microbiana. De esta manera, el incremento autóctono de NH_4^+ finalmente favorece el desarrollo de fitoplancton pequeño que es activamente pastoreado. Esta retroalimentación alrededor de las fuentes externas de NID y el reciclaje es quizás modulada estacionalmente por factores ambientales y el ciclo de producción. Muy posiblemente, la estructura trófica herbívora es acentuada durante los meses fríos, caracterizados por altos aportes inorgánicos, mientras la condición opuesta marca un predominio de las redes microbianas en el periodo cálido. Esta apreciación ha sido descrita también en ambientes marinos templados y subtropicales con respecto a la

alternancia estacional de periodos de enriquecimiento por mezcla vertical y de empobrecimiento bajo condiciones estratificadas de la columna de agua, durante invierno-primavera y verano-otoño, respectivamente (e.g. Gilabert, 2001; Nakano, *et al.*, 2004; Shinada *et al.*, 2005; Shinada *et al.*, 2008).

Por otro lado, es difícil determinar el posible avance del estado de eutrofización de la Laguna de Macapule con base en una serie de tiempo tan corta de variables físico-químicas y biológicas. Sin embargo, es un hecho que las elevadas densidades de componentes microbianos están favorecidas por este proceso de enriquecimiento. Algunos comentarios de los habitantes indican que las pesquerías locales de ciertos recursos pelágicos han colapsado en estos últimos años, así como se han mantenido e incluso incrementado las capturas o cultivos de comunidades de moluscos (bivalvos) bentónicos. Esto muy posiblemente está relacionado con un cambio temporal en la estructura trófica de una predominantemente herbívora a una microbiana, y el acoplamiento de esta última a un control dominado por filtradores bentónicos (Cloern, 1982). En relación a esto, se ha observado que una de las respuestas más notorias al incremento en el flujo de nutrientes es un fuerte consumo de la producción fitoplanctónica por parte de las comunidades de filtradores bentónicos; en la mayoría de los casos la biomasa de este componente llega a superar la del zooplancton en ambientes eutrofizados (Cloern, 1982; ver referencias en Cloern, 1996). Lo anterior es quizás consistente con la baja a moderada biomasa mesozooplanctónica a lo largo del año (De Silva-Dávila *et al.*, 2006; Zavala-Norzagaray, 2006).

VIII.2.3 Otras relaciones tróficas

Las biomásas de BP, PA y NF además de estar reguladas por la concentración y disponibilidad de sustratos orgánicos e inorgánicos (e.g. Pace & Cole, 1994; Krstulović *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2004; Timmermans *et al.*, 2005), también son controladas “Top down” o desde la parte superior de las redes tróficas

por la depredación de parte de NZ, CH y MZ (e.g. Sanders *et al.*, 1992; Fuhrman & Noble, 1995; Murrell *et al.*, 2002; Ferrier-Pagés & Gattuso, 1998; Bojanić *et al.*, 2006) y la lisis viral PSV (ver referencias en la introducción de este documento). A continuación se ahondará un poco sobre la posible variabilidad de estos últimos factores de control en la Laguna de Macapule.

VIII.2.3.1 Control viral

Varios trabajos han reconocido diferentes interacciones inter-específicas entre virus y microorganismos e incluso otros virus cuyas interacciones fluctúan desde neutrales, sinérgicas y antagónicas (Weibawer, 2004); siendo estas dos últimas las más relevantes. En el caso de relaciones positivas, como el mutualismo, los hospederos pueden beneficiarse de la infección viral cuando están involucrados procesos de transferencia horizontal de material genómico, como es el caso del traspaso de genes para la fijación de Nitrógeno como en *Synechococcus* sp (Palenik *et al.*, 2009) y la adquisición de transportadores de alta afinidad de FID en *Emiliania huxleyi* y *Prochlorococcus* sp (ver referencias en Dyhrman *et al.*, 2007). En cambio, otras relaciones consideradas como parasitismo (necesidad de hospedero para su ciclo vital) y depredación (lisis o muerte al hospedero) son negativas y suelen alterar la condición fisiológica, la abundancia y diversidad de los microorganismos hospederos (Weinbawer, 2004; Thingstad *et al.*, 2008). Generalmente, las infecciones virales pueden tener un impacto significativo en las redes tróficas acuáticas, no solo por el control sobre las poblaciones de bacterias y algas unicelulares, sino también las implicaciones que esto podría tener en la transferencia de carbono y energía dentro del sistema (Wommack & Colwell, 2000).

Máximas densidades de PSV en marzo para la Laguna de Macapule son consistentes con algunos estudios estacionales en zonas costeras, incluyendo ambientes eutrofizados de zonas templadas y subtropicales (Tabla 7) en donde magnitudes semejantes han sido reportadas durante el periodo primavera-verano, en asociación a cambios en la estabilidad de la columna de agua e incrementos en la

temperatura de la misma (Hara *et al.*, 1991; Wommack *et al.*, 1992; Jiang & Paul, 1994). Sin embargo, pequeñas variaciones temporales a este patrón suelen estar relacionados a la dinámica ambiental local, así como al impacto antropogénico (Jiao *et al.*, 2006), que en el caso de Macapule es producido por las actividades agrícolas durante el periodo frío. En este trabajo, altos cocientes de PSV con BP y NF fueron detectados de manera similar a como se observó con PSV:PA durante los meses fríos.

Tabla 7. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de virioplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado.

| Abundancia de virioplancton (PSV·mL ⁻¹) | | | Lugar | Referencia |
|--|----------------------|----------------------|---|-------------------------------|
| Promedio | Mínimo | Máximo | | |
| 4.8 x10 ⁶ | - | - | Oeste del Mar Caribe | Proctor & Fuhrman (1990) |
| - | 1.5 x10 ⁶ | 1.5 x10 ⁷ | Pacífico oriental (crucero RV Moana Wave) | Culley & Welschmeyer (2002) |
| - | 6 x10 ⁶ | 3.4 x10 ⁷ | Bahía Tampa- Estuario (USA) | Paul <i>et al.</i> (1991) |
| 1.8 x10 ⁶ | - | - | Mar Alboran (Mediterráneo) | Alonso <i>et al.</i> (2001) |
| - | 1.4 x10 ⁴ | 4.7x10 ⁴ | Golfo de México (Oceánica >100m) | |
| - | 3.8 x10 ⁵ | 8.5 x10 ⁵ | Golfo de México (Superficial Costa-Océano) | Boehme <i>et al.</i> (1993) |
| - | 3.0 x10 ⁵ | 7.9 x10 ⁷ | Costa Golfo de México (Texas, USA) | Weinbauer & Suttle (1997) |
| - | 4.0 x10 ⁵ | 1.9 x10 ⁶ | Pacífico Subtropical Noroeste | Hara <i>et al.</i> (1996) |
| - | 1.4 x10 ⁶ | 4.0 x10 ⁷ | Costa de Japón | Hara <i>et al.</i> (1991) |
| - | 2.7 x10 ⁶ | 1.1 x10 ⁷ | Costa de Florida (USA) | Jiang & Paul (1996) |
| - | 1.4 x10 ⁷ | 2.1 x10 ⁸ | Estuario Charente Costa Atlántica (Francia) | Auguet <i>et al.</i> (2005) |
| - | 1.5 x10 ⁶ | 1.6 x10 ⁷ | Corriente de Humboldt (Chile) | Chiang & Quiñones (2007) |
| 1.5 x10 ⁸ | - | - | Bahía Sta. Mónica (California, USA) | Noble & Fuhrman (1997) |
| 2.5 x10 ⁶ | 2.6 x10 ⁶ | 1.4 x10 ⁷ | Bahía Chesapeake (USA) | Wommack <i>et al.</i> (1992) |
| 1.9 x10 ⁷ | 3.4 x10 ⁵ | 4.6 x10 ⁷ | Estuario de Changjiang (China) | Pan <i>et al.</i> (2007) |
| - | 2.4 x10 ⁷ | 2.5 x10 ⁸ | Estuario Ría de Aveiro (Portugal) | Almeida <i>et al.</i> (2001b) |
| - | 3.9 x10 ⁷ | 2.9 x10 ⁸ | Río Brisbane -Bahía Moreton (Australia) | Hewson (2000) |
| 7.3 x10 ⁷ | 2.0x10 ⁷ | 1.5 x10 ⁸ | Estero El Tortugón | |
| 6.8 x10 ⁷ | 3.1 x10 ⁷ | 1.6 x10 ⁸ | Boca Macapule | Este trabajo (2009) |

En el caso de la proporción PSV:BP, valores superiores a 10 han sido frecuentemente reportados en condiciones de enriquecimiento (e.g. Paul *et al.*, 1991; Cochlan *et al.*, 1993; Noble & Fuhrman, 1998). Estos niveles coincidieron con la incidencia de altos números de partículas virales en el periodo frío, lo cual podría estar asociado a una masiva inducción de profagos o fagos endógenos de fase lisogénica a lítica, alta producción de fagos dentro de los hospederos, bajo decaimiento viral y altas tasas de infección (Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). De acuerdo a lo anterior los bacteriófagos podrían ser el principal factor de deceso de bacterias, en ambientes eutróficos o bajo una atenuada limitación por recursos (Hewson, 2000).

Bratbak & Heldal (1995), han hipotetizado que el cociente RVB puede ser también interpretado como un indicador de diversidad bacteriana. Generalmente, la especificidad de los fagos hacia su hospedero presume que un mayor control viral ocurre sobre las poblaciones dominantes (ver referencias en Weinbauer, 2004). Al respecto, Thingstad *et al.* (2008), agrega que poblaciones bacterianas especialistas de rápido crecimiento pueden ser fuertemente controladas por lisis viral, como consecuencia de su alta afinidad por nutrientes acoplada a un elevado coeficiente de adsorción de bacteriófagos. En Macapule, no hay indicios para corroborar la suposición acerca de “Killing the winner”, que quiere decir mayor control sobre la población de rápido crecimiento (Thingstad & Lignell, 1997), ya que la composición taxonómica de virus y bacterias no pudo ser determinada con las técnicas empleadas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que máximas densidades virales fueron resultado del control no solo de la abundancia, sino también de la diversidad de algunas poblaciones de BP fisiológicamente activas que posiblemente presentaron la mayor contribución a la producción y/o a la abundancia total como ha sido observado en otros estudios (Hennes *et al.*, 1995; Thingstad, 2000b).

La dinámica del RVB fue contrastante con la registrada en un estuario subtropical en Florida (Cochran & Paul, 1998), donde altos cocientes ocurrieron en la temporada cálida del año. Según este estudio, valores altos de temperatura del agua (> 13 °C) o la dependencia de alguna otra variable por ésta, favoreció la inducción de

profagos a fase lítica promoviendo la liberación de virus al medio. En Macapule, este mismo proceso estuvo quizás favorecido principalmente por el incremento en la actividad de sus hospederos, influenciados por la disponibilidad de nutrientes y sustratos durante la fase fría del año, más que por una respuesta al incremento en la temperatura del agua; no obstante, los valores promedio mensuales de esta última variable fueron consistentemente mayores a 16 °C en esta temporada.

Por otro lado, Cochran & Paul (1998), sugieren que no se debe descartar la posibilidad de que altas densidades virales como las observadas en Macapule y en ambientes estuarinos impactados son el resultado de una inducción al ciclo lítico por causas antropogénicas. A menudo estos sistemas costeros son afectados por vertimientos de algunos contaminantes, como hidrocarburos aromáticos (naftaleno, fenantreno y pireno) que actualmente se sabe que estimulan la producción de profagos en poblaciones naturales de bacterias. A pesar de ello, en este trabajo no se exploró la relación de la abundancia de PSV con fuentes puntuales de hidrocarburos y su aporte a la laguna; no obstante, muchas de estas sustancias se cree que podrían llegar al sistema a través de los drenes municipales y/o lavados de suelos. Así mismo, durante los meses más cálidos nuestros resultados revelaron bajo control viral sobre bacterias. Esto quizás se deba a una disminución en la actividad fisiológica de los hospederos, o tal vez una mayor influencia de otros factores de control sobre los demás componentes microbianos, incluso sobre los mismos virus (González & Suttle, 1993; Manage *et al.*, 2002), tales como la depredación y/o la disponibilidad de sustratos.

Con respecto a los virus diferentes de bacteriófagos, su contribución podría haber sido significativa en especial durante algunas proliferaciones de varios grupos fitoplanctónicos a lo largo del ciclo de muestreo. Algunos estudios por ejemplo han revelado que las cianobacterias cocoides que integran al PA son controladas eficientemente por cianófagos que llegan alcanzar densidades considerables de hasta 10^6 PSV·mL⁻¹ en la columna (Mann, 2003). De acuerdo a las observaciones de Suttle *et al.* (1990), las abundancias virales de patógenos de fitoplancton eucariota son relativamente menores ($<5.0 \times 10^3$ PSV·mL⁻¹) y su contribución es despreciable al

total de PSV. Sin embargo, recientes estudios contradicen estas suposiciones. Varios tipos de virus se han detectado infectando diversas especies de diatomeas, dinoflagelados, rafidofitas, clorofitas y primnesiofitas, entre otros grupos. Muchos de los esfuerzos sobre el estudio de estos agentes a girado en torno al aislamiento y caracterización de estos virus y algunos pocos acerca de su control sobre la dinámica de poblaciones fitoplanctónicas, en especial aquellas formadoras de proliferaciones (ver referencias en Nagasaki, 2008). En la actualidad es escasa la información sobre conteos de patógenos virales para grupos fitoplanctónicos específicos en la columna de agua. Sin embargo, algunos trabajos experimentales han indagado cuan abundantes pueden llegar ser estos patógenos a través del número de partículas virales contabilizadas dentro de hospedero y en el momento de ser liberadas por la lisis celular. Un ejemplo de esto han sido las densidades observadas por microscopía electrónica de transmisión de alrededor de 10^4 y 10^5 PSV•célula⁻¹ en poblaciones de *Chaetoceros tenuissimus* (Shirai *et al.*, 2008) y *Heterosigma akashiwo* (Laurence *et al.*, 2001).

La mayoría de los virus reconocidos para eucariotas se encuentran infectando dinoflagelados y diatomeas. Dentro de este último grupo la mayor cantidad de reportes de infecciones virales corresponden a varias especies del género *Chaetoceros* y en menor proporción a *Rhizosolenia* (ver referencias en Nagasaki, 2008). Proliferaciones de estos organismos en Macapule, como se mencionó anteriormente, fueron encontradas un mes antes de los máximos registros de PSV en la columna de agua.

Un hecho particular en la Laguna de Macapule fueron las proliferaciones de diatomeas pequeñas (<20 μm) del género *Chaetoceros* y el nanoflagelado *Heterosigma* sp en la boca y en el estero, respectivamente. Ambos eventos al parecer tuvieron relación con algunas disminuciones en la concentración de NID, especialmente de NH_4^+ e importantes cambios en la estructura microbiana y microzooplanctónica. Varios reportes realizados al norte de Bahía de Hiroshima (mar de Japón) han detectado que las proliferaciones de *Heterosigma akashiwo* son recurrentes a principio del verano acompañadas de una disminución en los nutrientes

inorgánicos (junio-julio) (ver referencias en Kamiyama *et al.*, 2000). De acuerdo a Yamochi (1989), condiciones de temperatura similares a las reportadas para Macapule en marzo (19 - 21 °C) favorecen el desarrollo de quistes procedentes del sedimento.

Durante el decaimiento de la proliferación de *Heterosigma* detectada en el mar de Japón, así como en el muestreo de marzo en el estero El Tortugón, se reportaron máximos incrementos en la abundancia de bacterias y CH (aloricados), lo cual es congruente con el aporte de materia orgánica disuelta y el incremento de presas, respectivamente. Según Kamiyama *et al.* (2000) y otros estudios referenciados dentro de su trabajo, estos eventos particulares de especies potencialmente nocivas modifican drásticamente la estructura trófica microbiana e incrementan temporalmente el flujo de materia y energía desde el BP a pequeños pastoreadores.

Aparentemente, el deceso de la proliferación de *Heterosigma* sp y *Chaetoceros* sp no pareció estar determinado por la moderada disminución en la concentraciones de nutrientes inorgánicos, ni el aumento en la presión por pastoreo. Algunos trabajos por ejemplo (Nagasaki *et al.*, 1994; Lawrence & Chan, 2001, Nagasaki, 2008) indican que el control viral es posiblemente una de las explicaciones más acertadas al respecto. En algunos trabajos se han apreciado incrementos en la densidad de PSV, así como la coexistencia de varios clones virales específicos para *Heterosigma akashiwo* y *Chaetoceros* sp en sus respectivas proliferaciones (Tomaru *et al.*, 2004; ver referencias en Nagasaki, 2008). Estas observaciones sugieren que una buena porción de la abundancia viral en marzo podrían ser el resultado de un fuerte control y producción viral lisis a consta de estas poblaciones bajo atenuadas condiciones limitantes por nutrientes. Así mismo, la presencia de estos géneros es coherente con el registro no solo de altas densidades virales sino también de la presencia de varios virus infectando un mismo tipo de hospedero (Nagasaki, 2008).

VIII.2.3.2 Depredación de componentes procariotas (BP y PA) por NZ

Gran cantidad de trabajos experimentales en sistemas de cultivo y ambientes costeros, oceánicos y polares, entre muchos otros sistemas naturales, han revelado que el primer nivel de pastoreadores de la fracción picoplanctónica está integrado principalmente por células fagotróficas menores a los 5 μm (ver referencias en Strom, 2000, Guillou *et al.*, 2001). De igual manera que los grupos planctónicos anteriores, el BP y el NZ presentaron altas abundancias comparables con las reportadas para sistemas meso-eutróficos de zonas costeras (Tablas 8 y 9). Sin embargo, este componente integrado principalmente por nanoflagelados heterotróficos, presentó una dinámica estacional opuesta a la observada en sistemas marinos y continentales de latitudes altas, en donde las mayores densidades suelen presentarse a finales de primavera y verano en respuesta al incremento en la disponibilidad de presas del picoplancton (e.g. Davis *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1997; Kalinowska, 2004; Šestanović *et al.*, 2004). A diferencia de algunos trabajos en ambientes costero eutróficos de latitudes templadas (e.g. Andersen & Sørensen, 1986; Iwamoto *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997), la Laguna de Macapule no presentó acoplamientos entre BP y NZ, lo cual sugiere otros componentes como CH y/u organismos mixotróficos fagotróficos del NF podrían estar llevando a cabo este control. Sin embargo, fuertes incrementos de BP estimulados por el régimen bimodal de producción del sistema, indican que estas fluctuaciones depredador-presa podrían encontrarse temporalmente desfasadas. Lo anterior fue consistente con la ausencia de correlaciones significativas entre ambas abundancias (Spearman; $p > 0.05$).

Los valores de los cocientes RBN_z en Macapule durante la mayor parte de los meses fueron relativamente más altos al valor generalizado de 103:1 para ambientes acuáticos, tanto marinos como continentales (Fenchel, 1986). Este valor ha sido usado como indicador de la presión por pastoreo, sin embargo, ha tenido diferentes connotaciones de acuerdo al estatus trófico de cada sistema (Sanders *et al.*, 1992). En ambientes oligotróficos, por ejemplo, estas proporciones pueden llegar a ser menores, por un fuerte consumo de BP y/o déficit de sustratos limitantes de su crecimiento. En la Laguna de Macapule y otros ambientes eutróficos, en cambio,

cocientes superiores a 103:1 suelen reportarse cuando el control por bacteriovoria llega a ser menos intenso o temporalmente desacoplado con la producción del BP. (ver referencias en Sanders *et al.*, 1992). Los rangos de variación del RBN_Z en Macapule son similares a los observados por Iwamoto *et al.* (1994) en un ambiente costero en la bahía de Hiroshima, sin embargo, su patrón estacional es inverso. Esta tendencia a diferencia de la observada en Macapule, aparentemente responde a un incremento en la densidad y el control por pastoreo del NZ en verano.

Tabla 8. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de bacterioplancton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado.

| Abundancia de Bacterioplancton (cél·mL ⁻¹) | | | Lugar | Referencia |
|---|----------------------|----------------------|--|-----------------------------------|
| Promedio | Mínimo | Máximo | | |
| 2.6 x10 ⁴ | 5.0 x10 ³ | 5.5 x10 ⁴ | Golfo de México (oceánica 120-2500m) | Boehme <i>et al.</i> (1993) |
| - | 8.0 x10 ⁴ | 9.0 x10 ⁵ | Pacífico oriental (oceánica) | Culley & Welschmeyer (2002) |
| - | 9.0 x10 ⁴ | 5.0 x10 ⁶ | Mar de Ross (Antártico) | Ducklow <i>et al.</i> (1999) |
| - | 5.0 x10 ⁵ | 4.0 x10 ⁶ | Mar Báltico (Suecia) | Riemann <i>et al.</i> (2008) |
| 2.5 x10 ⁵ | - | - | Golfo de México (superficial oceánica) | Boehme <i>et al.</i> (1993) |
| 5.7 x10 ⁵ | - | - | Golfo de México (Superficial Costa-Océano.) | Boehme <i>et al.</i> (1993) |
| - | 9.9 x10 ⁵ | 3.4 x10 ⁷ | Mar de Beaufort (Ártico - Canadá) | Clasen <i>et al.</i> 2009 |
| - | 5.2 x10 ⁶ | 8.8 x10 ⁶ | Mar Rojo (G. de Aden, Yemen) | Weisse (1989) |
| - | 8.3 x10 ⁵ | 3.1 x10 ⁶ | Costa de California (USA) | Noble & Fuhrman (2000) |
| - | 1.0 x10 ⁴ | 1.7 x10 ⁷ | Costa Pacífica (Columbia Británica y Canadá) | Clasen <i>et al.</i> 2008 |
| - | 2 x10 ⁶ | 9.0 x10 ⁶ | Bahía Santa Mónica (California, USA) | Fuhrman & Noble (1995) |
| 4.4 x10 ⁶ | - | - | Estuario (Bahía de Tampa, USA) | Cochran & Paul (1998) |
| - | 5.0 x10 ⁵ | 2.3 x10 ⁶ | Laguna Cananeia-Iguape (Brasil) | Barrera-Alba <i>et al.</i> (2008) |
| 6.2 x10 ⁶ | 2.8 x10 ⁶ | 5.6 x10 ⁷ | Golfo de México (estuario) | Boehme <i>et al.</i> (1993) |
| 1.0 x10 ⁶ | 4.1 x10 ⁵ | 2.5 x10 ⁶ | Estuario de Changjiang (China) | Pan <i>et al.</i> (2007) |
| - | 2.8 x10 ⁵ | 1.5 x10 ⁷ | Bahía de Biscay (surgencia) | Barquero <i>et al.</i> (1998) |
| - | 1.9 x10 ⁶ | 1.1 x10 ⁷ | Estuario Ría de Aveiro (Portugal) | Almeida <i>et al.</i> (2001b) |
| - | 1.8x10 ⁶ | 1.5 x10 ⁷ | Bahía Pensacola (Florida, USA) | Murrel (2003) |
| - | 3.0 x10 ⁷ | 1.0 x10 ⁸ | Río Brisbane- Bahía Moreton (Australia) | Hewson (2000) |
| - | 2.5 x10 ⁵ | 1.4 x10 ⁷ | Bahía Chesapeake (USA) | Wommack <i>et al.</i> (1992) |
| 8.8 x10 ⁶ | 3.9 x10 ⁶ | 1.6 x10 ⁷ | Estero El Tortugón | Este trabajo (2009) |
| 8.2 x10 ⁶ | 3.8x10 ⁶ | 1.5 x10 ⁷ | Boca Macapule | |

Tabla 9. Valores comparativos de abundancias mínimas, máximas y promedio de nanozooplankton en sistemas costeros y oceánicos. (-) No especificado.

| Abundancia de nanozooplankton (cél·mL ⁻¹) | | | Lugar | Fluorocromo | Referencia |
|--|----------------------|----------------------|---|------------------|--------------------------------|
| Promedio | Mínimo | Máximo | | | |
| - | 1 | 1.2 x10 ³ | Mar Mediterráneo (0-2000m prof.) | DAPI | Tanaka & Rassoulzadegan (2002) |
| - | 1.9 x10 ² | 7.5 x10 ² | Bahía Franklin (Antártico Oeste) | DAPI | Vaqué <i>et al.</i> (2008) |
| - | 1.0 x10 ² | 6.6 x10 ³ | Mar del Norte | Naranja acridina | Nielsen & Richardson (1989) |
| - | 7.0 x10 ¹ | 3.4 x10 ³ | Zona oceánica (surgencia de Chile) | DAPI | Cuevas <i>et al.</i> (2004) |
| - | 6.0 x10 ² | 1.2 x10 ³ | Golfo de Aden (Mar Rojo) | DAPI | Weisse (1988) |
| - | 3.0 x10 ¹ | 6.6 x10 ³ | Bahía Onagawa (Costa de Japón) | DAPI | Tanaka <i>et al.</i> (1997) |
| - | 4.0 x10 ² | 9.0 x10 ³ | Estuario Delaware (USA) | Primulina | Coffin & Sharp (1987) |
| - | 7.0 x10 ³ | 2.8 x10 ⁴ | Salinas de Seoshin (Costa de Korea) | DAPI | Park <i>et al.</i> (2003) |
| - | 2.0 x10 ¹ | 5.7 x10 ³ | Plataforma continental (Surgencia de Chile) | DAPI | Cuevas <i>et al.</i> (2004) |
| 1.8 x10 ³ | - | - | Vineyard Sound (Massachusetts) | Primulina | Caron (1983) |
| 2.5 x10 ³ | - | - | Puerto Hole (Massachusetts, USA) | | |
| - | 3.0 x10 ² | 1.7 x10 ³ | Costa Noreste (Taiwan) | DAPI | Tsai <i>et al.</i> (2005) |
| 6.1 x10 ³ | - | - | Costa Sta. Mónica (California, USA) | Proflavine | Fuhrman & Noble (1995) |
| - | 3.0 x10 ² | 4.5 x10 ³ | Bahía Masan (Korea) | Primulina | Choi <i>et al.</i> (2003) |
| - | 5.0 x10 ² | 1.5 x10 ⁴ | Costa de Limfjord (Dinamarca) | Naranja acridina | Andersen & Sorensen (1986) |
| - | 4.7 x10 ² | 4.36x10 ³ | Bahía Chesapeake (USA) | Proflavine | McManus & Fuhrman (1988) |
| 1.77x10 ³ | 3.04x10 ² | 6.7x10 ³ | Estero El Tortugón | Primulina | Este trabajo (2009) |
| 1.06x10 ³ | 3.64x10 ² | 4.2x10 ³ | Boca Macapule | | |

La correlación entre PA y NZ, mostró una correspondencia negativa en el estero (Spearman= -0.60; p< 0.05) así como en el sistema lagunar (Spearman= -0.34; p< 0.01), que fue también consistente con bajos números del cociente RPA/NZ en meses fríos y la condición opuesta en los meses cálidos. Esto sugiere que una reducción en la presión por pastoreo podría haber contribuido al incremento del PA a

finales de primavera en Macapule, aunado a la estimulación de sus tasas de crecimiento por aumento de la temperatura del agua y el pulso de FID.

La obtención de altos valores de ambos cocientes en Macapule, coincide con lo argumentado para sistemas productivos y enriquecidos, acerca de que la remoción del NZ no llega a ser lo suficientemente importante para controlar la biomasa del BP, debido a un incremento simultáneo en el pastoreo de bacterióvoros por parte del componente microzooplanctónico (Gasol & Vaque, 1993; Krstulović *et al.*, 1997). Esta posibilidad es explorada a continuación.

VIII.2.3.3 Control de componentes microbianos (>20 µm) por microzooplancton

Numerosos estudios de tipo ecológico y fisiológico indican que el microzooplancton, como componente activo de las redes tróficas microbianas, lleva generalmente a cabo tres funciones principales en los sistemas acuáticos (ver referencias en Gómez-Teixeira, 2009). La primera, está relacionada con su capacidad para consumir y modelar la producción de las diferentes fracciones microbianas (femto, pico, nano y ocasionalmente microplancton) (e.g. González & Suttle, 1993; ver referencias en Sherr & Sherr, 2002). La segunda, tiene que ver con su participación en la transferencia de materia y energía del compartimiento microbiano a las redes tróficas herbívoras (ver referencias en Sherr & Sherr, 2002; Calbet & Saiz, 2005); y la tercera, está asociada a la regeneración de nutrientes inorgánicos y la producción de sustratos orgánicos (e.g. Andersen *et al.*, 1986; Goldman *et al.*, 1985; Dolan, 1997; L'Helguen *et al.*, 2005) derivados de procesos metabólicos (digestión y excreción).

En el presente apartado, tendremos en cuenta únicamente al microzooplancton como factores de control por depredación (Top down) de la abundancia de los componentes microbianos evaluados. Durante las observaciones en los conteos se detectó que el principal componente microzooplanctónico estuvo

compuesto por ciliados y tintínidos, ambos pertenecientes al grupo Ciliophora, y como componente minoritario a algunos estadios tempranos de microcrustáceos y rotíferos. Ambos sitios de muestreo registraron patrones temporales más o menos similares para la densidad de CH (t-test= 0.93; $p > 0.05$) y MZ (t-test= 0.35; $p > 0.05$). Así mismo, sus mayores incrementos (primavera y verano-otoño) fueron consistentes con el ciclo bimodal de producción de autótrofos de la laguna. Esta tendencia general fue congruente con la dinámica reportada para el Golfo de Maine (Atlántico) (Montagnes *et al.*, 1988), el Mar interior de Japón (Kamiyama, 1994) y la región subártica del Mar Báltico (ver referencias en Mironova *et al.*, 2009). No obstante, es importante señalar que se detectaron diferencias en la composición taxonómica del CH entre ambas estaciones. Aparentemente, la boca Macapule mostró una mayor proporción de tintínidos, mientras pequeños ciliados desnudos dominaron en el estero El Tortugón. Esto evidentemente tuvo incidencia sobre la presión por depredación en ciertos grupos microbianos. Los cocientes calculados a partir de microorganismos:CH indican mayor control por CH en primavera en la estación de la boca, y en verano-otoño en el estero. En esta última estación, sin embargo, el cociente RP_{ACH} fue particularmente fluctuante durante todo el ciclo anual. La presencia de altas proporciones de tintínidos en la boca sugiere que una mayor depredación sobre el microfitoplancton ya que estos organismos han sido frecuentemente relacionados a un mayor control sobre presas tan grandes como el 25 al 50 % del diámetro oral de la lóricas (Heinbokel, 1978; Dolan *et al.*, 2002). Esto posiblemente corrobora parte de las diferencias espaciales detectadas de los grupos fitoplanctónicos a los que su pastoreo podría estar dirigido dentro de Laguna de Macapule.

Dolan (1991) detectó que la remoción por parte de estadios larvales de *Acartia tonsa* (Nauplio) sobre ciliados microzooplanctónicos suele ser mayor durante el verano en aguas mesohalinas de la Bahía de Chesapeake. De acuerdo a sus estimaciones, propuso que el consumo de copépodos podría influenciar negativamente el pastoreo de ciliados y flagelados sobre fracciones menores. Esto posiblemente tuvo relación con lo observado en Macapule, en donde a pesar de que

se registró un notable incremento en la densidad de microzooplancton en los meses cálidos, su pastoreo quizás no balanceó eficientemente la producción de PA especialmente en el estero.

Los valores de abundancia y las interacciones entre los diferentes componentes microbianos, microfitoplancton y microzooplancton indican que este sistema lagunar presenta una trama trófica dinámica y compleja. Esto quizás es resultado del enriquecimiento causado principalmente por la intensa actividad agrícola de la región y por la rápida respuesta de estos elementos biológicos frente a pulsos o ingresos continuos de nutrientes. Es evidente que a consecuencia del proceso de eutrofización antropogénica se ha reportado un desbalance en la distribución de biomasa en los grupos de productores primarios (fitobentos, fitoplancton, macrófitas, macroalgas, etc.) lo cual podría tener repercusiones importantes en los flujos de Carbono hacia los compartimientos heterotróficos y en la estructura de las comunidades del plancton, necton y el bentos. La intensidad de las interacciones observadas entre los elementos biológicos evaluados fluctúa estacionalmente acorde al ciclo de producción general del sistema, así como la importancia relativa de las redes tróficas microbianas sobre las redes herbívoras o de pastoreo. Todo parece indicar que la trama trófica en la Laguna de Macapule recicla y reincorpora rápidamente los nutrientes. Esta condición aparentemente retiene el Carbono orgánico particulado en el ciclo microbiano limitando la transferencia y producción de los niveles tróficos superiores. Hay algunos indicios para suponer que esta afectación es real; no obstante, poco se puede decir si aún no se ha documentado acerca de los cambios a diferentes escalas temporales de la biomasa y la estructura comunitaria del necton y el bentos.

VIII.3 DETECCIÓN DEL WSSV EN COMPONENTES PLANCTÓNICOS

Desde los 90's el WSSV ha sido uno de los principales patógenos causantes de mortalidad de camarón en las granjas camaronícolas, tanto en el continente

asiático (Inouye *et al.*, 1994; Lightner, 2005), como en América (Jory & Dixon, 1999; Lightner & Pantoja, 2001). Hasta la fecha, el ciclo de este agente viral es poco comprendido, así como su dinámica estacional, los mecanismos de transporte y entrada a los sistemas de cultivo y los factores ambientales que podrían estar afectando su persistencia en los sistemas acuáticos naturales y estanques de cultivo (referencias en Maldonado *et al.*, 2004). Se presume que las vías de contagio más usuales son por contacto directo con organismos enfermos (Chou *et al.*, 1998) e ingestión de partículas u organismos asociados al virus (e.g. Vijayan *et al.*, 2005); sin embargo, no se descarta aún la posibilidad de transmisión del WSSV por transferencia vertical de progenitores a descendientes (Fegan *et al.*, 1991) o por contacto de la larva recién eclosionada con la envoltura del huevo asociada al virus (Yan *et al.*, 2004).

Estas características han conducido al desarrollo imprescindible de técnicas sensibles para la detección temprana del WSSV, con el propósito de ejecutar decisiones adecuadas para la prevención de su propagación y contagio en sistemas de cultivo. En la actualidad son diversas las pruebas empleadas para la detección del WSSV, sin embargo, todas ellas están aplicadas principalmente al diagnóstico en tejidos de camarón. Los ensayos recurridos con frecuencia son de carácter histoquímico y molecular. Dentro de estas últimas el dot-blot, las pruebas de hibridación y la PCR son quizás las más representativas (ver referencias en Durand & Lightner, 2002). Algunas variantes de la PCR, como por ejemplo las PCR competitivas (Tang & Lightner, 2000) y en tiempo real (PCR-TR) (Durand & Lightner, 2002; Durand *et al.*, 2003) son capaces de cuantificar o estimar el grado de infección en la muestra relativo al ADN total y/o al peso del tejido analizado. La importancia de conocer la carga viral ha permitido esclarecer un poco sobre el desarrollo y la transmisión de la enfermedad en los sistemas de cultivo; así mismo, ha contribuido a la toma adecuada de decisiones para prevenir grandes mortalidades de animales.

En la actualidad, pocos estudios han dirigido el empleo de estas técnicas de detección a otros escenarios diferentes al tejido del camarón. Esto definitivamente ha limitado la comprensión de factores de control y posibles vías de contagio a través de

elementos del sedimento y la columna de agua. En este trabajo se empleó la PCR anidada, un método sensible, aplicado para detectar al WSSV en muestras de agua fraccionadas procedentes de ambientes naturales y sistemas de cultivo de camarón. Así mismo, algunos de estos resultados fueron contrastados con los obtenidos por otros tipos de PCR. También se discute la estandarización del método de recuento directo por microscopía de epifluorescencia a partir de concentrados virales obtenidos de tejido de camarones enfermos y algunas muestras de agua de campo.

VIII.3.1 Detección por PCR

De igual manera a como se comenta en el trabajo realizado por Ramírez-Douriet (2006), uno de los problemas más importantes a resolver para la detección del WSSV en muestras naturales, fue la optimización del protocolo de extracción de ADN en organismos debido a la considerable dispersión de la biomasa de los microorganismos en la muestra de agua. En este caso en particular se trató de coleccionar volúmenes de muestras de agua entre los 0.2 - 1.0 L que fueron concentrados por fraccionamiento en diferentes tipos de membranas por filtración; una vez allí, cada fracción fue fácilmente manipulada para su extracción. No obstante, poca certeza se tiene acerca de la integridad del ADN en las muestras, excepto tal vez por la amplificación de la mayoría de las muestras con oligonucleótidos universales para el ARN ribosomal 16S de procariontas, en especial de la fracción del picoplancton al cual la mayoría de estas pertenece.

VIII.3.1.1 Comparación entre los métodos de detección por PCR

En su gran mayoría las muestras de agua analizadas por PCR anidada según la técnica propuesta por Kimura *et al.* (1996) no mostraron la presencia de WSSV, excepto en junio de 2007 para en las fracciones > 1.2 μm del estanque tipo. Análisis posteriores con esta y otras dos técnicas de detección, sin embargo, revelaron resultados contrastantes en un extracto del 2008 y las dos fracciones detectadas

previamente como positivas del evento infeccioso de junio de 2007. Dentro del mismo método de reconocimiento por PCR anidada, estas disimilitudes radicaron principalmente en las detecciones negativa y positiva de las muestras del estanque de la fracción del microplancton en junio de 2007 y del nanoplancton en julio de 2008, respectivamente. Las inconsistencias observadas allí son posiblemente el resultado de factores asociados al rendimiento de la reacción, como por ejemplo la calidad de los reactivos, baja o alta proporción de inhibidores en la muestra, o errores de manipulación en la preparación de la mezcla de reacción.

Los análisis destinados a la comparación entre técnicas en algunos extractos de muestras de agua de la laguna y tejidos de camarones infectados, revelaron también eventuales diferencias. A pesar de que los resultados positivos por PCR semi-cuantitativa indicaron un nivel moderado de infección en los extractos de la muestra de agua, este al parece ser no fue lo suficientemente alto para ser detectable en una de las fracciones positivas de junio de 2007 (microplancton) por PCR en tiempo real. Esta incoherencia entre los métodos de reconocimiento de ADN del WSSV podría responder quizás a diferencias en la sensibilidad inherente a cada técnica de PCR (mínimo de moldes de ADN requerido para la amplificación) y a la aplicación de distintos protocolos de extracción.

Según el método propuesto por Durand & Lightner (2002) para reconocimiento de WSSV por PCR en tiempo real (secuencia del GenBank U50923 acopladas a pruebas TaqMan), el límite de detección descrito allí (4 copias·ng⁻¹ de ADN) fue similar al rango de 2 - 20 copias de ADN molde por reacción (1 - 10 copias·μL⁻¹ en el extracto) reportado para las otras dos técnicas de PCR efectuadas en este trabajo (Manual instructivo del kit IQ₂₀₀₀TM). Esto sugiere que la cantidad de ADN existente en los extractos de las muestras positivas no debería ser un impedimento para su reconocimiento por IQ_{REAL}. Sin embargo, en otro trabajo comparativo en Tailandia (Sritunyalucksana *et al.*, 2006) los límites de detección determinados allí fueron en algunos casos menos sensibles que el estudio anterior con valores de 5, 50, 1000 y entre 100 - 1000 copias de ADN molde por reacción para PCR en tiempo real (pruebas Tagman), PCR anidada por IQ₂₀₀₀ WSSV), PCR punto final (kit SEMBV,

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand) y por dos métodos de PCR anidada en dos pasos (según Kimura *et al.*, 1996 y una modificación de Lo *et al.*, 1996), respectivamente. Los anteriores reportes indican que la sensibilidad de diferentes protocolos de reconocimiento por PCR en tiempo real puede fluctuar con respecto a la descrita para las técnicas de PCR anidada usadas en este trabajo (IQ₂₀₀₀ y la anidada en dos pasos según Kimura *et al.*, 1996). Por otro lado, el hecho de que los oligonucleótidos utilizados en ambas técnicas no corresponden a la misma región en el genoma, la aparente contradicción de resultados posiblemente indique la existencia de variantes genéticas que pueden presentar una de las regiones de ADN correspondiente a una o unas de las variantes, pero no a las otras.

En el estudio de Sritunyalucksana *et al.* (2006), 12 juegos de muestras de ADN previamente confirmados fueron contrastados con diferentes laboratorios públicos encontrando una especificidad (falsos positivos) y sensibilidad (falsos negativos) de 100 % y 93.7 %, respectivamente; aunque éstos últimos datos procedieron de extractos con infecciones ligeras. Estas detecciones negativas al igual que la situación presentada en las muestras de Macapule y la granja camaronícola, podrían ser principalmente atribuidas a una alta dilución del templado y por ende una baja probabilidad de obtener una reacción positiva, a pesar de que los extractos puedan proceder de material confirmado para WSSV.

La hipótesis acerca de una menor eficiencia en alguno de los métodos de extracción de ADN, aplica quizás a los extractos de tejido de camarón, mas no a las muestras de agua donde se empleó un único protocolo (DNAzol). Con respecto a lo anterior, en este trabajo no se realizaron pruebas suficientes para corroborar diferencias en la eficiencia de los protocolos de extracción. Sin embargo, sólo uno de las extracciones de tejido por el protocolo de IQ₂₀₀₀ fue indetectable por PCR cuantitativo en correspondencia con los menores niveles de carga viral (infección ligera) según el método semi-cuantitativo.

Como se mencionó anteriormente, esta discrepancia entre los métodos usados podría estar también relacionada con la especificidad de los oligonucleótidos

aplicados por cada técnica frente a posibles variaciones en los sitios de alineación al ADN molde del WSSV durante la amplificación. Con respecto a lo anterior, diversos trabajos han confirmado dentro del genoma del virus la presencia de variaciones en el número de secuencias repetitivas de ADN en tándem (Minisatélites) dentro de los marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés) (van Hulten *et al.*, 2000; Galaviz-Silva *et al.*, 2009). Con respecto a estas diferencias, Wongteerasupaya *et al.* (2003) identificó 12 genotipos virales con 2 - 20 unidades de repetición en el ORF 94, en un total de 65 animales examinados procedentes de 55 estanques a lo largo de cinco provincias distribuidas en la costa este, oeste y central de Tailandia. Recientemente, Praadep *et al.* (2008) en secuencias virales de China, Tailandia y Taiwán reportó para este mismo marco de lectura abierta y el ORF 75 y ORF 125 alrededor de 13, 11 y 6 genotipos, respectivamente, con patrones de repetición variando entre 2 y 17 unidades.

Por medio de estos resultados sobre la variabilidad genética de los ORF, se ha llegado a la descripción de cepas virales, las cuales a menudo han sido asociadas a diferentes grado de virulencia (Praadep *et al.*, 2000). Lo anterior sugiere la posibilidad de que la muestras analizadas para Macapule y el sistema camaronícola pudieran albergar una o más cepas virales cuya variabilidad genética limita la probabilidad de alineación de los oligonucleótidos y por tanto su detección por PCR.

Resultados contrastantes con el manejo de diferentes oligonucleótidos han sido también documentados por Park *et al.* (1998), en análisis con PCR punto final de extractos de camarones moribundos de una granja en la costa oeste de Corea. En este trabajo se emplearon dos juegos de oligonucleótidos previamente corroborados por la literatura para brotes en Taiwan (Lo *et al.*, 1996) y Japón (Takahashi *et al.*, 1996), registrándose amplificación de productos y con un 100 % de homología únicamente con los de este último sitio. Con respecto a este mismo trabajo, Shariff *et al.* (2000) comentan la posibilidad de que esta inconsistencia sea a causa de mutaciones del genoma del WSSV que a su vez han favorecido la presencia de cepas con diferente virulencia.

VIII.3.2 Posibles relaciones del WSSV con fracciones planctónicas

Algunos estudios proponen que el medio acuático constituye uno de los vehículos de transmisión con mayor carga viral en los estanques de cultivo (Chou *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2001). Esto es coherente con previas detecciones positivas del virus en varios grupos del mesozooplankton en el complejo lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule y en estanques de cultivo de estas mismas zonas (Ramírez-Douriet, 2005). En este trabajo, resultados similares fueron observados en algunas fracciones planctónicas menores (2.0 - 20 μm y 20 - 200 μm) únicamente en muestras de un estanque de camarón. Esto último sugiere que organismos no relacionados con el desarrollo de la infección podrían estar también vinculados con la transmisión y el transporte del WSSV desde los sistemas naturales a los estanques de cultivo y/o viceversa. Sin embargo, la confirmación sobre un posible acceso del virus a través de la captación de agua y la conexión entre ambos sistemas acuáticos no pudo ser determinada debido a la ausencia de detección positiva en las muestras de la Laguna de Macapule.

Otros estudios en contraste han encontrado experimentalmente que organismos que coinciden con las tallas reportadas como positivas en el presente trabajo, poseen la capacidad de transportar e infectar al camarón con el virus. Zhang *et al.* (2006) y Liu *et al.* (2007) muestran evidencias de que poblaciones de microalgas pueden ser portadores del virus por una ruta de adhesión virus-fitoplancton e incluso mantener su viabilidad por varios días, aún sin contacto con hospederos (Liu *et al.*, 2007). Con base en detecciones en otros grupos del microzooplankton, Yan *et al.* (2004) han encontrado indicios sobre la posibilidad de que algunas poblaciones rotíferos junto con sus huevos sean los principales reservorios del WSSV en condiciones invernales dentro de estanques de cultivo. Respecto a lo anterior, un estudio más reciente identificó con pruebas *in vitro* la unión del WSSV a membranas de *Brachionus urceus*, proponiendo la presencia de receptores proteicos para este virus como prueba de que los rotíferos pertenecen a los hospederos de este virus (Yan *et al.*, 2007).

La incidencia del WSSV y su asociación con ciertas fracciones del plancton en estos sistemas de cultivo se debe quizás a un mayor confinamiento de los animales, así como a un incremento en la probabilidad de encuentro entre animales, elementos portadores y/o partículas virales libres. De esta manera, la superioridad numérica de los componentes microbianos en el estanque y el reservorio con respecto a la laguna (Anexo 5), sugieren que estos microorganismos por su tamaño y nivel trófico podrían ser elemento de transporte importante dentro de los estanques y una ruta de entrada al interior de post-larvas y camarones adultos, respectivamente. En general esta condición, se ve favorecida por la intensa fertilización y productividad del sistema de cultivo, así como una baja tasa de recambio de agua.

En el caso particular de la dinámica del picoplancton total (PT) (equivalente a BP + PA) y PSV, no se registraron correspondencias entre las tendencias temporales del ambiente lagunar y el sistema de cultivo (Spearman; $p > 0.05$). Sin embargo, en algunos casos no se encontraron diferencias significativas entre las densidades de ambos sitios de la granja y el estero, y entre esta última estación y el estanque para PT y femtoplancton, respectivamente (Wilcoxon; $p > 0.05$). A pesar de esta ligera correspondencia entre ambos ambientes, estas dos últimas fracciones nunca registraron detección del WSSV. En coherencia con lo anterior, no se encontró evidencia por PCR anidada de que el WSSV pudiera prevalecer libremente en la fracción del pico y femtoplancton, sin asociarse o ser transportado por organismos más grandes en la columna de agua.

De acuerdo a los reportes del comité CESASIN (2009), la enfermedad causada por el WSSV en las granjas camaronícolas de Guasave fue declarada durante abril - julio de 2007 y abril - agosto de 2008. Dentro estos periodos, las escasas detecciones del virus en fracciones planctónicas coincidieron también con las mayores incidencias mensuales de brotes del WSSV en ambos años. Esto datos sugiere que la detección quizás es posible bajo altas cargas virales y enfermedad en los camarones. No obstante, la cantidad de muestra filtrada en las recolectas de muestras fueron quizás suficientes para la concentración y detección de partículas

virales en las diferentes fracciones, especialmente las más pequeñas (<1.2 µm) en donde las membranas se saturaron con volúmenes menores.

De manera similar, resultados obtenidos de los análisis en concentrados por ultra-filtración de muestras de agua del estero, no registraron tampoco productos positivos de amplificación para WSSV en alguna de las fracciones planctónicas. Esto sugiere que a pesar de los esfuerzos que se hicieron por concentrar, incluso en la muestra inoculada con el virus (infección ligera), el número de copias iniciales y/o características intrínsecas de la muestra de agua son factores importantes que podrían estar determinando la detección por PCR.

No se descarta la posibilidad de que la ausencia de amplificación en algunas de los extractos sea el resultado de características intrínsecas de la muestra de agua retenidas en las membranas de filtración. Con respecto a esto, un estudio realizado para detección de bacterias patógenas en un cuerpo de agua lótico (Delabre *et al.*, 1998), encontraron deficiencias en la amplificación de sus extractos atribuido a la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras. En trabajo anterior argumentaron que este fenómeno suele ser común y persistente en este tipo de sistemas y por tal motivo es necesario el desarrollo de controles con el fin de interpretar los resultados negativos. En el caso particular de los extractos de las muestras de Macapule y la granja camaronícola, pruebas preliminares con oligonucleótidos universales para bacterias permitieron la amplificación para la mayoría de las muestras de campo, obteniéndose un producto con el número de bases esperado. Esto corroboró que el ADN extraído de estas, presentaron la pureza, integridad y concentración necesaria para la amplificación por PCR, así como la ausencia importante de inhibidores de la reacción. Pese a lo anterior, la mayoría de las muestras no amplificaron con los oligonucleótidos específicos para WSSV, posiblemente como consecuencia de la baja proporción del ADN viral frente al total de ADN extraído.

En la actualidad se tiene documentado sobre gran cantidad de sustancias causantes de problemas en la PCR tanto en muestras clínicas, como en aquellas procedentes de medios cultivo, sedimentos, suelos, aguas residuales y ambientes

acuáticos (ver referencias en Wilson, 1997). Estas principalmente pueden interferir en la extracción de ADN, su degradación o captura y la inhibición de la actividad de la polimerasa (Wilson, 1997). Algunos trabajos indican que la presencia de altas concentraciones de compuestos fenólicos, metales pesados, sustancias celulares, ácidos húmicos y urea suelen ser los agentes más comunes y problemáticos para la detección por PCR en muestras ambientales (e.g. Saulnier & Andremont, 1992). En la Laguna de Macapule, ninguno de estos compuestos anteriores con excepción de la urea fueron cuantificados. La presencia de esta molécula en altas concentraciones pudo haber contribuido junto con la baja densidad del WSSV a su escasa detección en los extractos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los componentes microbianos son elementos importantes por su conspicuidad y alta densidad, así como por el papel que juegan en las redes tróficas herbívoras y microbianas en ambientes naturales y sistemas de cultivo. Estas densidades son el reflejo de condiciones ambientales favorables representadas principalmente por el aporte de nutrientes orgánicos e inorgánicos, así como otros de factores físicos (luz, temperatura, pH, etc). A pesar de lo anterior, las relaciones ecológicas entre estos componentes podrían estar jugando un papel preponderante en la regulación de las poblaciones y la transferencia de carbono entre los diferentes compartimientos tróficos. Dentro de estos componentes, llama la atención que el componente viral es quizás uno de los grupos de mayor abundancia, así como el responsable de morbilidad y mortalidad de un gran espectro o diversidad de potenciales hospederos. El WSSV es quizás uno de los virus con mayores repercusiones económicas en la industria camaronícola de la región. En este trabajo se encontraron indicios de que su presencia podría estar asociada a fracciones del nano y microplancton donde el componente autotrófico parece ser dominante, especialmente durante altos niveles de eventos infecciosos. Por otro lado, la hipótesis acerca de la posibilidad de la presencia del virus como partícula libre formando parte del femtoplancton y/o picoplancton no pudo ser confirmada, lo cual podría estar relacionado con limitaciones en las técnicas de detección usadas, con bajas concentraciones del virus

en la muestra de agua y/o la existencia de variantes genéticas del virus que dificulten la detección de algunas de ellas por los técnicas de PCR utilizadas.

IX CONCLUSIONES

La Laguna de Macapule presenta una trama trófica microbiana compleja y bien establecida, aparentemente favorecida por el proceso de eutrofización y el desbalance en los cocientes N:Si:P. Sus fluctuaciones estacionales fueron el resultado de la variabilidad ambiental y las interacciones entre los diferentes componentes planctónicos (competencia, control por lisis y depredación, etc.). Este primer factor incluye los aportes de nutrientes derivados de procesos físicos (surgencia y mezcla), del ciclo agrícola de la región y del reciclaje de materia orgánica en la columna de agua y sedimentos.

Basado en las respuestas de algunos componentes planctónicos frente a la dinámica de las variables ambientales, se establece la existencia de diferencias espaciales dentro de la Laguna de Macapule. Estas al parecer están relacionadas con las características geomorfológicas del sistema y la localización de los sitios de muestreo con respecto a la influencia de las aguas del Golfo de California y el margen continental donde ocurre la actividad agrícola y acuacultural, así como otros aportes derivados del ciclo hidrológico (escorrentía).

El PA y NF demostraron ser los componentes autotróficos dominantes durante todo el ciclo estacional. Las abundancias de este primer componente mostraron fuertes contrastes temporales que parecen estar controlados por la temperatura, especialmente durante el periodo frío y por eventuales pulsos de PID y el pastoreo por microzooplancton durante la temporada cálida.

Los taxa presentes en Laguna de Macapule, contienen una importante contribución de organismos fitoplanctónicos con metabolismos mixótrofos y/o capaces de explotar fuentes atmosféricas de Nitrógeno. Esto a su vez fortalece la suposición de que aportes eventuales de PID podrían estimular los niveles de producción fitoplanctónica de algunas poblaciones dentro de las fracciones pequeñas (e.g. PA).

La incidencia de numerosas partículas virales, especialmente durante proliferaciones fitoplanctónicas y de BP indican que su participación es relevante en el control de las fracciones planctónicas. Lo anterior, junto con la presencia de importantes relaciones entre las abundancias de los componentes microbianos y microzooplancton sugieren que gran parte del reservorio de materia orgánica es probablemente retenido dentro de la red trófica microbiana.

El WSSV podría estar asociado a fracciones del nano y microplancton, especialmente durante altos niveles de eventos infecciosos. La hipótesis acerca de la posibilidad de la presencia del virus como partícula libre formando parte del femtoplancton y/o picoplancton no pudo ser confirmada, lo cual podría estar relacionado con limitaciones en las técnicas de detección usadas, ocurrencia de variables genéticas del virus con diferencias en las secuencias correspondientes a los sitios de hibridación de los oligonucleótidos usados en cada técnica, y/o con bajas concentraciones del virus en la muestra de agua.

X RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados demuestran la necesidad de acceder a cuestiones experimentales relacionadas con la medición de tasas de captación de nutrientes (orgánicos e inorgánicos) por parte de algunas fracciones planctónicas, impacto por pastoreo y pérdidas por lisis viral.

Por otra parte, es trascendental también resolver la incógnita acerca de la procedencia de los aportes de nutrientes mediante el empleo de técnicas isotópicas, así como determinar su respectivo balance en las entradas y salidas del sistema.

Es importante también ampliar el conocimiento acerca de la estructura y variación estacional de componentes microzooplanctónicos, esto con el fin de entender la participación de ciertas poblaciones de ciliados y tintínidos en control de las fracciones microbianas y su aportación dentro de los flujos de Carbono.

La resolución de todas estas inquietudes, sumado a lo que ya se conoce del sistema lagunar contribuirá en la creación de un mejor modelo para la comprensión de los flujos de Carbono y nutrientes. Esto permitirá hacer predicciones del efecto de la producción del sistema y con ello promover un mejor manejo de los recursos hidrobiológicos.

La presencia de variantes genéticas del WSSV deben ser estudiadas en trabajos posteriores. Esto contribuirá a esclarecer posibles inconsistencias metodológicas, así como a definir un protocolo de detección adecuado para ambientes acuáticos tanto naturales como sistemas cultivo acordes a las características del WSSV presente en la región pacífica mexicana.

XI BIBLIOGRAFÍA

Agawin, N., C. M. Duarte & S. Agusti. 1998. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170: 45-53.

Almeida, M. A., M. A. Cunha & F. Alcântara, 2001a. Factors influencing bacterial production in a shallow estuarine system. *Microb. Ecol.*, 42(3): 416-426.

Almeida, M. A., M. A. Cunha & F. Alcântara. 2001b. Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions. *Microb. Ecol.*, 42: 562-571.

Alberts, J. J. & M. Takács. 1999. Importance of humic substances for carbon and nitrogen transport into southeastern United States estuaries. *Organ. Geochem.*, 30: 385-395.

Álvarez-Borrero, S. & J. R. Lara-Lara. 1991. Physical environment and primary productivity of the Gulf of California. En: The Gulf and peninsular province of the California's. *Am. Assoc. Petr. Geol.*, 47: 555-567.

Ammerman, J. W. & F. Azam. 1991. Bacterial 5'-nucleotidase activity in estuarine and coastal marine waters: Characterization of enzyme activity. *Limnol. Oceanogr.*, 36(7): 1427-1436.

Andersen, O. K., C. Goldman, D. A. Caron & M. R. Dennett. 1986. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: III. Phosphorus cycling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 31: 7-55.

Andersen, P. & M. Sørensen. 1986. Population dynamics and trophic coupling in pelagic microorganisms in eutrophic coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33: 99-109.

Andersson, M., P. van Rijswijk & J. Middelburg. 2006. Uptake of dissolved inorganic nitrogen, urea and amino acids in the Scheldt estuary: comparison of organic carbon and nitrogen uptake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 44: 303-315.

Apple, J. K., E. M. Smith & T. J. Boyd. 2008. Temperature, Salinity, Nutrients, and the Covariation of Bacterial Production and Chlorophyll-a in Estuarine Ecosystems. *J. Coast. Res.*, 55: 59-75.

Arrigo, K. R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437: 349-355.

Auguet, J. C., H. Montanie, D. Delmas, H. J. Hartmann & V. Huet. 2005. Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente Estuary (France). *Microb Ecol.*, 50: 337-349.

Autio, R. 1998. Response of seasonally cold-water bacterioplankton to temperature and substrate treatments. *Estuarine, Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 46(4): 465-474.

Ávila, J. A. 2001. Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: uso de las técnicas isotópicas (^{15}N). *Problemas del Desarrollo*. 32(127): 189-207.

Axelsson, L. 1988. Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. *Mar. Bio.*, 97: 287-294.

Ayala-Baldenegro, L. 2004. Distribución de la concentración de metales pesados en sedimentos y su relación con organismos indicadores (*Crassostrea sp* y *Mytella sp*) en el sistema lagunar de Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. México, 73 p.

Ayala-Rodríguez, G. A. 2008. Grupos funcionales del fitoplancton y estado trófico del sistema lagunar Topolobampo-Ohuira-Santa María. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México, 149 p.

Azam, F., T. Fenchel, J. Field, J. Gray, L. Meyer-Riel & F. Thingstad. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 257-263.

Baillie, P. W. & B. L. Welsh. 1980. The effect of tidal resuspension on the distribution of intertidal epipellic algae in an estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 10: 165-180.

Badan-Dangon, A. 1997. La corriente costera de Costa Rica en el Pacífico Mexicano, 99-112. En: Lavin M. F. (ed.) Contribuciones a la Oceanografía Física en México, Monografía No. 3, Unión Geofísica Mexicana, México, 272 p.

Barquero S., J. A. Botas & A. Bode. 1998. Abundance and production of pelagic bacteria in the southern Bay of Biscay during the summer. *Sci. Mar.*, 62: 83-90.

Barrera-Alba, J. J., S. Flores-Gianesella, G. A. Oliveira-Moser & F. M. Prado. 2008. Bacterial and phytoplankton dynamics in a sub-tropical estuary. *Hidrobiologia*, 598: 229-246.

Bec, B., J. Hussein-Ratrema, Y. Collos, P. Souchu & A. Vaquer. 2005. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J. Plank. Res.*, 27(9): 881-894.

Benitez-Nelson, C. R. 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Rev.*, 51: 109-135.

Bettarel, Y., T. Sime-Ngando, C. Amblard, J. F. Carrias & C. Portelli. 2003a. Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophicity. *Freshwater Biol.*, 48: 810-822.

Bettarel, Y., C. Amblard, T. Sime-Ngando, J. Carrias, D. Sargos, F. Garabetian & P. Lavandier. 2003b. Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in lake Pavin. *Microb. Ecol.*, 45: 119-127.

Berg, G. M., D. J. Repeta & J. LaRoche. 2002. Dissolved organic nitrogen hydrolysis rates in axenic cultures of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae): comparison with heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 401-4.

Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak & M. Heldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340: 467-468.

Berman, T. 1974. Urea in the waters of Lake Kinneret (Sea of Galilee). *Limnol. Oceanogr.*, 19: 977-980.

Berman, T. & O. Holm-Hansen. 1974. Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 28: 305-310.

Berman, T. Y., Y. Azov & D. Toivnsend. 1984. Understanding oligotrophic oceans. Can the eastern Mediterranean be a useful model?, 101-112. En: Holm-Hansen, O, L. Bolis & R. Giles (eds.) Marine phytoplankton and productivity: lecture notes on coastal and estuarine studies. Springer-Verlag, Berlin, 175 p.

Berman, T., C. Béchemin & S. Maestrini. 1999. Release of ammonium and urea from dissolved organic nitrogen in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.*, 16: 295-302.

Berman T. & D. Bronk. 2003. Dissolved organic nitrogen: a dynamic participant in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.*, 31:279-305.

Berns, D. S., P. Holohan & E. Scott. 1966. Urease activity in blue-green algae. *Science*, 152: 1077-1078.

Berounsky, V. & S. Nixon. 1990. Temperature and annual cycle of nitrification in waters of Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 35(7): 1610-1617.

Bertilsson, S., O. Berlund, D. M. Karl & S. W. Chisholm. 2003. Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 1721-1731.

Bidle, K. D. & F. Azam. 2001. Bacterial control of silicon regeneration from diatom detritus: Significance of bacterial ectohydrolases and species identity. *Limnol. Oceanogr.*, 46(7): 1606-1623.

Bilio, M., A. Cose & A. Hernández-Portocarrero. 1999. Mangroves, shrimp and the development of coastal areas in Central America. *EC Fish. Bull.*, 12 (4): 20-22.

Bird, D. F. & J. Kalff. 1984. Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentrations in fresh and marine waters. *Canadian J. of Fisheries and Aquat. Sci.*, 41: 1015-1023.

Bird, C. & M. Wyman. 2003. Nitrate/Nitrite Assimilation system of the marine picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH 8103: Effect of nitrogen

source and availability on gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7009-7018.

Bjorkman, K. & D. M. Karl. 1994. Bioavailability of inorganic and organic phosphorus-compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 111: 265-273.

Blanchard, G. F. & P. A. Montagna. 1992. Photosynthetic response of natural assemblages of marine benthic microalgae to short- and long-term variations of incident irradiance in Baffin Bay, Texas. *J. Phycol.*, 28: 7-14.

Boehme, J., M. Frischer, S. Jiang, C. Kellogg, S. Pichard, J. Rose, C. Steinway & J. Paul. 1993. Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to ocean DNA pools. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 97: 1-10.

Bojanić, N., M. Solic, N. Krstulovic, S. Sestanovic, Z.N. Gladan, I. Marasovic & I. Brautovic. 2006. The role of ciliated protozoa within the microbial food web in the eutrophicated part of the Kastela Bay (middle Adriatic Sea). *Sci. Mar.*, 70: 431-442.

Booth, 1993. Estimating cell concentration and biomass of autotrophic plancton using microscopy, 199-205. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca_Raton, 777 p.

Bouvy, M., R. Arfi, P. Cecchi, D. Corbin, M. Pagano, L. Saint-Jean & S. Thomas. 1998. Trophic coupling between bacterial and phytoplanktonic compartments in shallow tropical reservoirs (Ivory Coast, West Africa). *Aquat. Microb. Ecol.*, 15(1): 25-37.

Boynton, W. R, J. D. Hagy, L. Murray, C. Stokes & W. M. Kemp. 1996. A comparative analysis of eutrophication patterns in a temperate coastal lagoon. *Estuaries*, 19: 408-421.

Bratbak, G., J. Egge & M. Heldal. 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 93: 39-48.

Bratbak, G. & M. Haldal. 1995. Viruses-the new players in the game: their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction?, 249-264. En: Joint, I. (ed.) *Molecular ecology of aquatic microbes*. Springer-Verlag KG, Berlin, 415 p.

Bray, N. A. 1988. Water mass formation in the Gulf of California. *J. Geophysical Research*. 93: 9223-9240.

Bronk, D. A. 2002. Dynamics of DON, 153-249. En: Hansell, D. A. & C. A. Carlson, (eds.) *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, 774 p.

Bronk, D. A., J. H. See, P. Bradley & L. Killberg. 2006. DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences Discussions*, 3: 1247-1277.

Bronk, D. A., J. H. See, P. Bradley & L. Killberg. 2007. DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences*, 4: 283-296.

Buchsbaum, R., I. Valiela, T. Swain, M. Dzierzeski & S. Allen. 1991. Available and refractory nitrogen in detritus of coastal vascular plants and macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72: 131-143.

Burkholder, J. M., P. M. Glibert & H. M. Skelton. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, 8: 77-93.

Cai, Y. M., X. N. Ning, C. G. Liu & Q. Hao. 2007. Distribution pattern of photosynthetic picoplankton and heterotrophic bacteria in the northern south China Sea. *J. Integra. Plant Biol.*, 49: 282-298.

Cajal-Medrano, R. & H. Maske. 2005. Growth efficiency, growth rate and the remineralization of organic substrate by bacterioplankton – revisiting the Pi model. *Aquat. Microb. Ecol.*, 19: 119-128.

Calbet, A. & E. Saiz. 2005. The ciliate-copepod link in marine ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.*, 38:157-167.

Caron, D. A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(2): 491-498.

Caron, D. A, E. R. Peele, E. L. Lim & M. R. Dennett. 1999. Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 259-272.

Caron, D. A. 2000. Symbiosis and mixotrophy among pelagic microorganisms, 495-522. En: Kirchman, D. L. (eds.) *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, Inc. United States of America, 542 p.

Carlson, C. A. & H. W. Ducklow. 1995. Dissolved organic carbon in the upper ocean of the central equatorial Pacific Ocean, 1992: Daily and finescale vertical variations. *Deep-Sea Res.*, 42(2): 639-656.

Carlsson, P., E. Granéli & A. Z. Segatto. 1999. Cycling of biologically available nitrogen in riverine humic substances between marine bacteria, a heterotrophic nanoflagellate and a photosynthetic dinoflagellate. *Aquat. Microb. Ecol.*, 18: 23-36.

Castberg, T., R. Larsen, C. Sandaa, J. Brussaard, M. Heldal, A. Paulino, R. Thyrhaug, E. Van Hannen & G. Bratbak. 2001. Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 221: 39 - 46.

Cavender-Bares, K. K., E. L. Mann, S. W. Chisholm, M. E. Ondrusek & R. R. Bidigare. 1999. Differential response of equatorial Pacific phytoplankton to iron fertilization. *Limnol. Oceanogr.*, 44, 237-246.

CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa). 2009. Boletín de Sanidad Acuícola de Sinaloa. Resumen informativo del comité estatal de sanidad acuícola de Sinaloa. 1: 1-5.

Chang, J., K. H., Lin, K. Chen, G. C. Gong & Q. P. Chiang. 2003. *Synechococcus* growth and mortality rates in the East China Sea: range of variations and correlation with environmental factors. *Deep-Sea Res. Pt. II.*, 50: 1265-1278.

Chávez, F. P. 1989. Size distribution of phytoplankton in the central and eastern tropical Pacific. *Global Biogeochem. Cycles*, 3(1): 27-35.

Chen, F. & C. A. Suttle, 1995. Amplification of DNA polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1274-1278.

Chen, F., J. Lu, B. Binder, Y. Liu & R. Hodson. 2001. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2): 539-545.

Chen, F. & K. Wang. 2007. Protocols for Counting Viruses and Bacteria using SYBR Gold Stain. Center of Marine Biotechnology. www.umbi.umd.edu/~comb/faculty/chen/SYBR_Gold_protocol.PDF.

Chiang, O. E. & R. A. Quiñones. 2007. Relationship between viral and prokaryotic abundance on the Bajo O'Higgins 1 Seamount (Humboldt Current System off Chile). *Sci. Mar.*, 71(1): 37-46.

Chisholm, S. W. 1992. Phytoplankton size, 213-237. En: Falkowski P.G. & A.D. Woodhead (eds.) Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press, New York, USA, 564 p.

Choi, D. H, Hwang, C. Y. & B. C. Cho. 2003. Comparison of virus and bacterivory-induced bacterial mortality in the eutrophic Masan Bay, Korea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 30: 117-125.

Chow, T.-J. & F. R. Tabita. 1994. Reciprocal light-dark transcriptional control of *nif* and *rbc* expression and light-dependent posttranslational control of nitrogenase activity in *Synechococcus* sp. strain RF-1. *J. Bacteriol.*, 176: 6281-6285.

Church, M. J., D. A. Hutchins, & H. W. Ducklow. 2000. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2): 455-466.

Clasen, J. L., S. N. Brigden, J. P. Payet & C. A. Suttle. 2008. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. *Freshwater Biol.*, 53(6): 1090-1100.

Cloern, J. E. 1982. Does the benthos control phytoplankton biomass in south San Francisco Bay (USA)?. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 9:191-202.

Cloern, J. E. 1996. Phytoplankton Bloom Dynamics in Coastal Ecosystems: A Review with Some General Lessons from Sustained Investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.*, 34(2): 127-168.

Cloern, J. E. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 210: 223-253.

Cloern, J. E. & R. Dufford. 2005. Phytoplankton community ecology: Principles applied in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 258: 1-28.

Coats, D. W., E. J. Adam, C. L. Gallegos & S. Hedrick. 1996. Parasitism of photosynthetic dinoflagellates in a shallow subestuary of Chesapeake Bay, USA. *Aquat. Microb. Ecol.*, 11: 1-9.

Cochlan, W. J. Wikner, G. Steward, D. Smith & F. Azam. 1993. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 92: 77-87.

Cochlan, W. P., J. Herndon & R. M. Kudela. 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*, 493(8): 111-118.

Cochran, P. K. & J. H. Paul. 1998. Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2308-2312.

Coffin, R. B. & J. H. Sharp. 1987. Microbial trophodynamics in the Delaware Estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 41: 253-266.

Cofré, P. & E. Jahn. 2007. Producción de leche con ensilajes de maíz confeccionados con urea y con azufre. Boletín del Instituto de Investigaciones Agropecuarias Quilamapu (INIA). 161: 23-24.

Cole, J. J., S. Findlay & M. L. Pace. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystem: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43: 1-10.

Collier, J. L., B. Brahmsha & B. Palenik. 1999. The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp.WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular genetic and biochemical analysis of the enzyme. *Microbiology*, 145: 447-459.

Collos, Y., A., Vaquer, B. Bibent, P. Souchu, G. Slawyk & N. García. 2003. Response of coastal phytoplankton to ammonium and nitrate pulses: seasonal variations of nitrogen uptake and regeneration. *Aquat. Ecol.*, 37: 227-236.

Contreras-Espinosa, F. & O. Castañeda-López. 2003. Los ecosistemas estuarinos del Estado de Sinaloa, 175-196. En: Cifuentes-Lemus, J. & J. Gaxiola-López (eds.) Atlas de los ecosistemas de Sinaloa, Colegio de Sinaloa, México, 481 p.

Correll, D. L. 1999. Phosphorus: A rate limiting nutrient in surface waters. *Poult. Sci.*, 78: 674-682.

Cottrell, M. & C. Suttle. 1991. Wide-spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan, eukaryotic marine phytoplankter *Micromonas pusilla*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 78: 1-9.

Cuevas, L.A., G. Daneri, B. Jacob & P. Montero. 2004. Microbial abundance and activity in the seasonal upwelling area off Concepción (36°S), central Chile: a comparison of upwelling and non-upwelling conditions. *Deep Sea Res. Pt. II.*, 51(20-21): 2427-2440.

Culley, A. & N. Welschmeyer. 2002. The abundance, distribution, and correlation of viruses, phytoplankton, and prokaryotes along a Pacific ocean transect. *Limnol. Oceanogr.*, 47(5): 1508-1513.

Davis, P. G., D. A. Caron, P. W. Johnson & J. M. Sieburth. 1985. Phototrophic and apochlorotic components of picoplankton and nanoplankton in the North Atlantic: geographic, vertical, seasonal and diel distributions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 21: 15-26.

Delabre, K., P. Cervantes, V. Lahoussine & M-R. Roubin. 1998. Detection of viable pathogenic bacteria from water Samples by pcr. *OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water*. 1-8.

Demers, S., J. C. Therriault, E. Bourget & A. Bah. 1987. Resuspension in the shallow sublittoral zone of a macrotidal estuarine environment: wind influence. *Limnol. Oceanogr.*, 32: 327-339.

De Jonge, V. N. & J. E. Van Beusekom. 1995. Wind and tide induced resuspension of sediment and microphytobenthos in the Ems estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 766-778.

De Silva-Dávila, R., R. Palomares-García, A. Zavala-Norzagaray & D. Escobedo-Urías. 2006. Ciclo anual de los grupos dominantes del zooplancton en Navachiste, Sinaloa, 4(1): 25-39. En: Hendrickx, M. E. (ed.) *Contribuciones al Estudio de los Crustáceos del Pacífico Este*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Del Negro P., A. Paoli, M. Celussi, E. Crevatin, A. Valeri, C. Larato & S. Fonda Umani. 2007. Picoplanktonic cyanobacteria in different Adriatic brackish environments. *Transit. Waters Bull.*, 3: 13-16.

Díaz-Hernández, C. & H. Maske. 2000. Abundancia de cianobacterias cocales, parámetros hidrográficos y la posible subestimación de la clorofila in situ en el norte del Golfo de California y la corriente de California, México. *Ciencias Marinas*, 26: 441-461.

Doherty, S. 1995. The abundance and distribution of heterotrophic and autotrophic nanoflagellates in the NE subarctic Pacific. Tesis de Maestría. Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver (Canada), 198 p.

Dolan, J. R. 1991. Microphagous ciliates in mesohaline Chesapeake Bay waters: estimates of growth rates and consumption by copepods. *Mar. Biol.*, 111: 303-309.

Dolan, J. R., T. F. Thingstad & F. Rassoulzadegan. 1995. Phosphate transfer between microbial size-fractions in Ville- Franche Bay (N. W. Mediterranean Sea), France in autumn. *Ophelia*, 41: 71-85.

Dolan, J. R. 1997. Phosphorus and ammonia excretion by planktonic protists. *Mar. Geol.*, 139: 109-122.

Dolan, J. R., H. Claustre, F. Carlotti, S. Plounevez & T. Moutin. 2002. Microzooplankton diversity: relationships of tintinnid ciliates with resources, competitors and predators from the Atlantic coast of Morocco to the eastern Mediterranean. *Deep-Sea Res. Pt. I*, 49: 1217–1232

Dortch, Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 61: 183-201.

Drake, L. & F. Dobbs. 2005. Do viruses affect fecundity and survival of the copepod *Acartia tonsa* Dana?. *J. Plankton Res.*, 27(2): 167-174.

Dyhrman, S., J. W. Amerman & B. A. S. Van Mooy. 2007. Microbes and the Marine Phosphorus Cycle. *Oceanography*, 20(2): 110-117.

Ducklow, H.W. 1999 The bacterial component of the oceanic euphotic zone. *FEMS Microbiology Ecol.*, 30: 1-10.

Ducklow, H. W. 2000. Bacterial production biomass in the oceans. En: Kirchman D. L. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, U.S.A, 542 p.

Durand, S. V. & D. V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Disease.*, 25: 381-389.

Durand, S. V, R. M. Redman, L. L. Mohny, K. Tang-Nelson, J. R. Bonami & D. V. Lightner. 2003. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. *Aquaculture*, 216: 9-18.

Eaton, A. D., L. S. Clesceri & A. E. Greenberg, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Edn. American Public Health Association (APHA). Baltimore, Maryland, 1268 p.

Ehrenhauss, S. & M. Huettel. 2004. Advective transport and decomposition of chainforming planktonic diatoms in permeable sediments. *J. Sea Res.*, 52:179-197.

Enríquez, S., C. M. Duarte. & K. Sand-Jensen. 1993. Patterns in decomposition rates among photosynthetic organisms: the importance of detritus C:N:P content. *Oecologia*, 94: 457-471.

Eppley, R. W. 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish. Bull.*, 70: 1063-1085.

Escobedo-Urías, D. 1997. Hidrología, nutrientes e influencia de las aguas residuales en la Laguna de Santa Maria, Sinaloa. Tesis de Maestría. CICIMAR – IPN, México. 87 p.

Escobedo-Urías, D., R. Hernández, M. Herrera & A. Y. Chiquete. 1999. Calidad bacteriológica del sistema lagunar de San Ignacio-Navachiste, Sinaloa. *Ciencia y Mar*, 3(9): 17-27.

Escobedo-Urías, D., A. Jiménez, A. Martínez-López, M. T. Hernández-Real, A. Reyes-Salinas, N. Herrera-Moreno, A. E. Ulloa-Pérez, P. Álvarez-Ruiz, A. A. Zavala-Norzagaray & Y. Chiquete-Ozono. 2003. Dinámica oceanográfica de la laguna de Navachiste, Sinaloa. En: Resúmenes del IX Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés y III Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés. AIMAC-CICIMAR-UABCS. La Paz, B.C.S. 5-9 de mayo de 2003.

Escobedo-Urías, D. & A. Martínez-López. 2007. Eutrophication process in coastal lagoon of Gulf of California, México. Abstract. American Geophysical Union (AGU). Joint Assembly. Acapulco, México.

Escobedo-Urías, D. 2008. Efecto de la limitación por nitrógeno para el fitoplancton en sistemas costeros. Documento examen predoctoral. CICIMAR – IPN, México, 57 p.

Fegan, D.F., T. W. Flegel, S. Sriurairatana & M. Waiyakruttha. 1991. The occurrence, development and histopathology of *Monodon baculovirus* in southern Thailand. *Aquaculture*, 96: 205-217.

Fenchel, T. 1986. The ecology of heterotrophic microflagellates, 57-97. En: Marshall, K. C. (ed.) *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York, 447 p.

Ferguson, A. J. P., B. D Eyre & J. Gay. 2003. Organic matter and benthic metabolism in euphotic sediments along shallow sub-tropical estuaries, northern NSW, Australia. *Aquat. Microb.Ecol.*, 33: 137-154.

Ferrier-Pages, C. & J. Gattuso. 1998. Biomass, production and grazing rates of picoplankton in coral reefs. *Microb. Ecol.*, 35: 46-57.

Findlay, S., M. L. Pace, D. Lints, J. J Cole, N. F. Caraco & B. Peierls, 1991. Weak coupling of bacterial and algal production in a heterotrophic ecosystem: the Hudson river estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 268-278.

Fischer, H. B., E. J. List, R. C. Y. Koh, J. Imberger & N.H. Brooks. 1979. *Mixing in Inland and Coastal Water*. Academic Press Inc. (London) Ltd., London, U.K., 483 p.

Flóres-Verdugo, F., O. Calvario & M. A. Cárdenas. 1993. Características ambientales de los humedales de Sinaloa y Nayarit. Humedales costeros de México. Oficina de humedales para las Américas en México. *ITESM-Guaymas*, 2(1): 11-16.

Froelich, P. N. 1988. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: A primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 649-668.

Fuchs, J., J. Martin & N. An. 1999. Impact of tropical shrimp aquacultured on the environment in Asia and the Pacific. *EC Fish. Bull.*, 12(4): 9-13.

Fuhrman, J. A. 1987. Close coupling between release and uptake of dissolved free amino acids in seawater studied by an isotope dilution approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37: 45-52.

Fuhrman, J. A. & R. Noble. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 40(7): 1236-1242.

Fuhrman, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 541-548.

Fuhrman, J. A. 2000. Impact of viruses on bacterial processes, 327-350. En: Kirchman D. L. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, U.S.A., 542 p.

Fukao, T., N. Toshitaka, F. Kimio & A. Masao. 2006. Contribution of urea to occurrence of phytoplankton in the eutrophic coastal environment Uranouchi Inlet. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 53(2): 77-86.

Galaviz-Silva, L., J. Reyes González, J., Ibarra Gámez, R. Mercado Hernández & Z. Molina-Garza. 2009. Minisatélites del virus del síndrome de la mancha blanca (Whispovirus) en México. *Ciencia UANL*, 12(2): 160-173.

Gasol, I. M. & D. Vaquer. 1993. Lack of coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria: A general phenomenon across aquatic systems?. *Limnol. Oceanogr.*, 38(3): 657-665.

Gasol, I. M., P. A. Giorgio & C. M. Duarte. 1997. Biomass distribution in marine planktonic communities. *Limnol. Oceanogr.*, 42(6): 1353-1363.

Garza, D. R. & Suttle C. A. 1995. Large double-stranded DNA viruses which cause the lysis of a marine heterotrophic nanoflagellate (*Bodo sp.*) occur in natural marine viral communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9: 203-210.

Gaxiola, G., C. J., García, H. E. Valdez & R. M., Botello. 1995. Spatial distribution of chlorophyll a and primary productivity in relation to winter physical structure in the Gulf of California. *Cont. Shelf Res.*, 15 (9): 1043-1059.

Gilbert, J. 2001. Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: The Mar Menor. *J. Plankton Res.*, 23(2): 207-218.

Gilmartin, M. & N. Revelante. 1978. The phytoplankton characteristics of the barrier island lagoons of the Gulf of California. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 7: 29-47.

Glibert, P. M., T. M. Trice, B. Michael & L. Lane. 2005. Urea in the tributaries of the Chesapeake and Coastal Bays of Maryland. *Water Air Soil Pollution*, 160: 229-243.

Glibert, P. M., J. Harrison, C. Heil & S. Seitzinger. 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry*, 77: 441-463.

Gobler, C. J. & S. A. Sañudo-Wilhelmy. 2001. Effects of organic carbon, organic nitrogen, inorganic nutrients, and iron additions on the growth of phytoplankton and bacteria during a brown tide bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 209:19-34.

Goldman, J. C. & E. J. Carpenter. 1974. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnol. Oceanogr.*, 19: 756-766.

Goldman, J. C., D. A. Caron, O. K. Andersen & M. R. Dennett. 1985. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: I. Nitrogen dynamics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 24: 231-242.

Gómez-Teixeira, I. C. 2009. Microzooplankton feeding impact in three different european coastal systems. Tesis de Doctorado. Universidad Do Porto. Instituto de Ciências Biomédicas, Portugal, 142 p.

González, J. M. & C. A. Suttle. 1993. Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: ingestion and digestion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 94: 1-10.

González-Galindo, A. 2003. Sobre el efecto de la interpretación de bioensayos con bacterias marinas heterotróficas: el posible efecto de los fagos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas, México, 131p.

Grant, B. R., J. Madgwick, Y. Dal & G. Pont. 1967. Growth of *Cylindrotheca closterium* var. *californica* (Mereschk.) Reimann & Lewin on nitrate, ammonia, and urea. *Australian. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 18: 129-136.

- Guadayol, O., C. Marrase, F. Peters, E. Berdalet, C. Roldan & A. Sabata. 2009. Responses of coastal osmotrophic planktonic communities to simulated events of turbulence and nutrient load throughout a year. *J. Plankton Res.*, 31: 583-600.
- Guillou, L., S. Jacquet & M. J. Chretiennot-Dinet. 2001. Grazing impact of two small heterotrophic flagellates on *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 201-207.
- Gutiérrez-Mendieta, F., R. Torres-Mejía & R. Torres-Alvarado. 1998. Importancia de la determinación de urea en sistemas costeros. *Hidrobiológica*, 8(2): 155-164.
- H. Ayto. del Municipio de Guasave. 1996. Plan municipal de desarrollo de Guasave (1996-1998), 187 p.
- Hagy, J. D., W. R. Boyntona & D. A. Jasinskib. 2005. Modelling phytoplankton deposition to Chesapeake Bay sediments during winter–spring: interannual variability in relation to river flow. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 62: 25-40.
- Hansen, P. J. 2002. The effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 279-288.
- Hara, S., K. Terauchi & I. Korike. 1991. Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2731-2734.
- Hargrave, B. T. & G. H. Geen. 1968. Phosphorus excretion by zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 13(2): 332-342.
- Harrison, W. G. & T. Platt. 1980. Variations in the assimilation number of coastal marine phytoplankton: Effects of environmental covariates. *J. Plankton Res.*, 2: 249-260.
- Harrison, W. G., L. R. Harris & B. D. Irwin. 1996. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 16-32.

Havskum, H. & P. J. Hansen. 2006. Net growth of the bloomforming dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* and pH: why turbulence matters. *Aquat. Microb. Ecol.*, 42: 55-62.

Heijs, S. K., R. Azzoni, G. Giordani, H. M. Jonkers, D. Nizzoli, P. Viaroli & H. van Gemerden. 2000. Sulfide-induced release of phosphate from sediments of coastal lagoons and the possible relation to the disappearance of *Ruppia* sp. *Aquat. Microb. Ecol.*, 23: 85-85.

Heil, C. A. 2005. Influence of humic, fulvic and hydrophilic acids on the growth, photosynthesis and respiration of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. *Harmful Algae*, 4: 603-618.

Heldal, M., D. J. Scanlan, S. Norland, F. Thingstad & N. H. Mann. 2003. Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 1721-1731.

Hennes, K. & M. Simon. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1): 333-340.

Hennes, K. P., C. A. Suttle & A. M. Chan. 1995. Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(10): 3623-3627.

Herbert, R. A. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments, 1-39. En: Grigorova, R. & J. R. Norris (eds.) *Methods in Microbiology*. Academic Press, London-U.K., 627 p.

Hewson, I. 2000. Dynamics of marine viruses along eutrophication gradients in Australian subtropical estuaries. Bachelor Thesis. University of Queensland. Department of Botany, Australia, 68 p.

- Hildebrand, M. & K. Dahlin. 2000. Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by the cell cycle. *J Phycol.*, 36(4): 702-713.
- Howard, M. D. A., W. P. Cochlan, N. Ladizinsky & R. M. Kudela. 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae*, 6: 206-217.
- Huang, T.-C. & W. M. Chow, 1991. Setting of the circadian N₂-fixing rhythm of the prokaryotic *Synechococcus* sp. RF-1 while its *nif* gene is repressed. *Plant Physiology*, 96: 324-326.
- Huang, T.-C., R.-F Lin, M.-K. Chu & H.-M. Chen. 1999. Organization and expression of nitrogen fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology*, 145: 743-753.
- Ignatiades, L. 1986. Annual variability of [¹⁴C] Urea utilization by natural marine phytoplankton. *European J. Phycol.*, 21(2): 209- 215.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 1998. Inventario nacional de embarcaciones 1997. Instituto nacional de estadística, geografía e informática. Documento interno, Aguascalientes, 120 p.
- Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama & M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.*, 29: 149-158.
- Irigoien, X., K. Flynn & R. Harris. 2005. Phytoplankton blooms: a “loophole” in microzooplankton grazing impact? *J. Plankton Res.*, 27(4): 313-321.
- Ismael, A. A. 2003. Succession of heterotrophic and mixotrophic dinoflagellates as well as autotrophic microplankton in the harbour of Alexandria, Egypt. *J Plankton Res.*, 25(2), 193-202.

Iwamoto, N., I. Imai & S. Uye. 1994. Seasonal fluctuation in abundance of bacteria, heterotrophic nanoflagellates, autotrophic nanoflagellates and nanodiatoms in Hiroshima Bay, the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Jap.*, 41(1): 31-42.

Jacquet S, J. F. Lennon. D. Marie & D.Vaulot. 1998. Picoplankton population dynamics in coastal waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol Oceanogr.*, 43: 1916-1931.

Jeffrey, S. W. & G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equation for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in algal phytoplankton and higher plants. *Bioch. and Physiol. Pflanz.*, 167: 191-194.

Jezberová, J. & J. Komárková. 2007. Morphometry and growth of three *Synechococcus*-like picoplanktonic cyanobacteria at different culture conditions. *Hydrobiologia*, 578:17-27

Jiang, S. C. & J. H. Paul. 1994. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 104: 163-172.

Jiao, N., Y. Zhao, T. Luo & X. Wang. 2006. Natural and anthropogenic forcing on the dynamics of virioplankton in the Yangtze river estuary. *J. Mar. Biol.*, 86: 543-550

Jiménez-Mercado, A. 2004. Efecto de la temperatura en la eficiencia del crecimiento y respiración en bacterias marinas heterotrófica. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas, México, 90 p.

Jones, H. L. J. 1997. A classification of mixotrophic protists according to their behaviour. *Freshwater Biology*, 37: 35-43.

Jones, R. I. 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology*, 45: 219-226.

Jørgensen, N. O., N. Kroer, R. B. Coffin, X.-H. Yang & C. Lee. 1993. Dissolved free amino acids, combined amino acids, and DNA as sources of carbon and nitrogen to marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 98: 135-148.

Jory D.E. & H. M. Dixon. 1999. Shrimp white spot virus in the hemisphere. *Aquaculture Magazine.*, 25: 83-91.

Kalinowska, K. 2004. Bacteria, nanoflagellates and ciliates as components of the microbial loop in three lakes of different trophic status. *Pol. J. Ecol.*, 52: 19-34.

Kamiyama, T. 1994. The impact of grazing by microzooplankton in northern Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea. *Japan. Mar. Biol.*, 119: 77-88.

Kamiyama, T., S. Itakura & K. Nagasaki. 2000. Changes in microbial loop components: effects of a harmful algal bloom formation and its decay. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21: 21-30.

Kapp, R., S. E. Stevens & J. L. Fox. 1975. A survey of available nitrogen sources for the growth of the blue-green alga, *Agmenellum quadruplicatum*. *Arch. Microbiol.*, 104: 135-138.

Kaufman, Z. G., J. S. Lively & E. J. Carpenter. 1983. Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in a barrier island estuary: Great South Bay, New York. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 17: 483-493.

Kepner, R. L. & J. R. Pratt. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.*, 54(4): 603-615.

Kerner, M. & S. Yasserli. 1997. Utilization of phytoplankton in seston aggregates from the Elbe estuary, Germany, during early degradation processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 158: 87-102.

Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.*, 69: 181-217.

Kjørboe, T. 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Advances in Mar. Biol.*, 29: 1-72.

Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka & K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathol.*, 31 (2): 93-98.

Kirchman, D. & P. J. Williams. 2000. Introduction, 1-12. En: Kirchman D. L. (ed.). *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, U.S.A, 542 p.

Koch, A. 1996. What size should a bacterium be? A question of scale. *Annual Review Microbiol.*, 50: 317-48.

Krom, M. D., N. Kress, S. Brenner & L. I. Gordon. 1991. Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 36(3): 424-432.

Krstulović, N., M. Šolić & I. Marasović. 1997. Relationship between bacteria, phytoplankton and heterotrophic nanoflagellates along the trophic gradient. *Helgoländer Meeresunters*, 51: 433-443

Kuosa, H. 1991. Picoplanktonic algae in the northern Baltic. Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. *Mar Ecol. Prog Ser.*, 73: 269-276.

Laferla, R. M. Azzaro & G. Maimone. 2006. Affiliation Microbial respiration and trophic regimes in the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 69:196-204.

Lai, D.Y.F & K. C. Lam. 2008. Phosphorus retention and release by sediments in the eutrophic Mai Po Marshes, Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 57: 349-356.

Lam, S., M. Ambak, A. Jusoh & A. Law. 2008. Waste excretion of marble goby (*Oxyeleotris marmorata*, Bleeker) fed with different diets. *Aquaculture*, 274(1): 49-56.

Lara-Lara, J. R. & J. E. Valdez-Holguín. 1988. Biomasa y productividad primaria del Golfo de California por fracción de tamaños durante la primavera de 1984. *Ciencias Marinas*, 14 (1): 1-14.

Lawrence, J. & A. M. Chan. 2001. A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Phycol.*, 37: 216-222.

Legendre, L. & F. Rassouladegan. 1995. Plankton and nutrient dynamics in marine waters. *Ophelia*, 41: 153-172.

Levasseur, M., J. C. Therriault & L. Legendre. 1984. Hierarchical control of phytoplankton succession by physical factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 19: 211-222.

Lewis, J., A. S. H. Harris, K. J. Jones & R. Edmonds. 1999. Long-term survival of marine planktonic diatoms and dinoflagellates in stored sediment samples. *J. Plankton Res.*, 21(2): 343-354.

L'Helguen, S., G. Slawyk & P. Le Corre. 2005. Seasonal patterns of urea regeneration by size-fractionated microheterotrophs in well-mixed temperate coastal waters. *J. Plankton Res.*, 27(3): 263-270.

Li, W. K. W. 1998. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 1746-1753.

Li, A., D. K. Stoecker & D. W. Coasts. 2000. Spatial and temporal aspects of *Gyrodinium galatheanum* in Chesapeake Bay: distribution and mixotrophy. *J. Plankton Res.*, 22: 2105-2124.

Lightner, D. V. & C. R. Pantoja. 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones. Métodos para mejorar la Camaronicultura en Centroamérica, *Ed. UCA*. 123-166.

Lightner, D. V. 2003. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status, 1-20. En: Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species. Proceedings of 32nd UJNR Aquaculture Panel Symposium, 17-18 y 20 de noviembre de 2003, Davis y Santa Barbara, California, USA.

Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance, *J. World Aquac. Soc.*, 36(3): 229-248.

Liu, B., Z. Yua, Z. Songa & Y. Guan. 2007. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebrate Pathology*, 95: 87-92.

Lindholm, T. 1985. *Mesodinium rubrum* - a unique photosynthetic ciliate. *Adv. Aquat. Microbiol.*, 3: 1-48.

Lo, C.F, J. H. Leu, C. H. Ho, C. H Chen, S. E. Peng, Y. T. Chen, C. M. Chou, P. Y. Yeh, S. J. Huang, H. Y. Chou, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996 Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org.*, 25:133-141

Longhurst, A. R. 1998. Pacific Ocean: Central American coastal province (CAMR), 311-314. En: Longhurst, A. R. (ed.) *Ecological geography of the sea*. Academic Press, San Diego, 398 p.

López-Aguilar, LL. 2006. Distribución estacional de las principales especies químicas del nitrógeno en aguas de las lagunas costeras de Sinaloa. Tesis de Maestría. UNAM, México, 119 p.

Lucas, C. H., J. Widdows, M. D. Brinsley, P. N. Salkeld & P. M. J. Herman. 2000. Benthic-pelagic exchange of microalgae at a tidal flat. 1. Pigment analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 196: 59-73.

Lluch-Cota, S. E. 2000. Coastal upwelling in the eastern Gulf of California. *Ocean. Act.*, 23: 731-740.

Lund, J., C. Kipling & E. Le Cren. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hidrobiologia*. 11: 143-170.

Lyle-Fritch L., E. Romero-Beltrán & J. A. Bect-Valdez. 2001. Características y desarrollo de la camaronicultura en el Estado de Sinaloa, México. Centro Regional de Investigación Pesquera, Mazatlán, 21 p.

Lyle-Fritch, L. 2007. Ficha Informativa del Sistema Lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule. En: Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR) – Versión 2006-2008. Secretaría de la Convención de Ramsar, Gland-Suiza, 24 p.

MacIntyre, H. L., T. M. Kana, T. Anning & R. J. Geider. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 38: 17-38.

MacIsaac, E. A. & J. G. Stockner. 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence, 187-197. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, 777 p.

Manage, P. M., Z. Kawabata, S. Nakano & Y. Nishibe. 2002. The effect of heterotrophic nanoflagellates on the loss of virus like particles in pond water. *Ecol. Res.*, 17: 473-479.

Magaña-Álvarez, M. E. 2004. Distribución de nutrientes y su efecto en el nivel trófico de la laguna Macapule, Sinaloa. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México, 115 p.

Maldonado, M., J. Rodríguez & I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *AquaTIC*, 21: 78-91.

Malone, T. C. 1971. The relative important of nanoplankton and netplankton as primary producers in tropical oceanic and neritic phytoplankton communities. *Limnol. Oceanogr.*, 16: 633-639.

Malone, T. C. 1980. Algal size, 443-464. En: Morris, T. (ed.) *The physiological ecology of phytoplankton*. Blackwell Scientific Publication, London, 625p.

Mann, N. H. 2003. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 17-34.

Margalef, R., 1974. *Ecología*. Ed. Omega S.A., Barcelona- España, 951 p.

Martínez-López, A., D., Escobedo-Urías, A. Reyes-Salinas & M. A. Hernández-Real. 2007. Phytoplankton response to nutrients runoff in a Lagoon System in the Gulf of California. *Hidrobiológica*, 17(2): 101-112.

- Martínez-López, A., D. Escobedo-Urías, A. E. Ulloa-Pérez & R. Aguirre. 2008. Dynamics of a *Prorocentrum minimum* bloom along the northern coast of Sinaloa, México. *Cont. Shelf Res.*, 28: 1693-1701.
- McCarthy, J. J. 1972. The uptake of urea by natural populations of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 17: 738-748.
- McCarthy, J. J. & R. Eppley. 1972. A comparison of chemical, isotopic, and enzymatic methods for measuring nitrogen assimilation of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 17: 371-382.
- McCarthy, J. J. & D. Kamykowski. 1972. Urea and other nitrogenous nutrient in La Joya Bay during February, March and April 1970. *Fish. Bull.*, 70: 1261-1274.
- McCarthy, J. J., W. Rowland & M. E. Loftus. 1974. Significance of nanoplankton in Chesapeake Bay Estuary and problems associated with the measurements of nanoplankton productivity. *Mar. Biol.*, 24(1): 7-16.
- McGlathery, K., K. Sundbäck & C. Anderson. 2007. Eutrophication in shallow coastal bays and lagoons: the role of plants in the coastal filter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 348: 1-18.
- McManus, G. B. & J. A. Fuhrman. 1988. Clearance of bacteria-sized particles by natural populations of nanoplankton in the Chesapeake Bay outflow plume. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42:199-206.
- Mengelt, C. & B. B. Prézelin. 2002. A potential novel link between organic nitrogen loading and *Pseudo-nitzschia* spp. blooms. En: Proceedings of the California and the world ocean conference, Santa Barbara. <http://resources.ca.gov/ocean/> Article.
- Merino, G., R. Piedrahita & D. Conklin. 2007. Effect of water velocity on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture*, 271(1-4): 206-215.
- Miller, C.A. & P. M. Glibert. 1998. Nitrogen excretion by the calanoid copepod *Acartia tonsa*: results of mesocosm experiments. *J. Plankton Res.*, 20: 1767-1780.

Mironova, E. I., I. V. Telesh & S. O. Skarlato. 2009. Planktonic Ciliates of the Baltic Sea (a Review). *Inland Wat. Biol.*, 2(1): 13-24.

Miyazono, A., T. Odate & Y. Maita. 1992. Seasonal fluctuations of cell density of cyanobacteria and other picophytoplankton in Iwanai Bay, Hokkaido, Japan. *J. Oceanogr.*, 48: 257-266.

Montagnes, D. J. S., D. H. Lynn, J. C. Roff & W. D. Taylor. 1988. The annual cycle of heterotrophic planktonic ciliates in the waters surrounding the Isles of Shoals, Gulf of Maine: an assessment of their trophic role. *Mar. Biol.*, 99: 21-30.

Montagnes, D. & D. J. Franklin. 2001. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnol. Oceanogr.*, 46(8): 2008-2018.

Morán, X. A. G. 2007. Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: a major contribution to carbon fluxes. *Aquat. Microb. Ecol.*, 49: 267-279.

Morales-Zamorano, L., R. Cajal-Medranol, E. Orellana-Cepedal & L. Jiménez-Pérez, 1991. Effect of tidal dynamics on a planktonic community in a coastal lagoon of Baja California, Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 78: 229-239.

Mortazavi, B., R. Iverson, W. Landing & W. Huang. 2000a. Phosphorus budget of Apalachicola Bay: a river-dominated estuary in the northeastern Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 198: 33-42.

Mortazavi, B., R. L. Iverson, W. Huang, G. F. Lewis & J. M. Caffrey. 2000b. Nitrogen budget of Apalachicola Bay: a bar-built, subtropical estuary in the northeastern Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 195: 1-14.

Mulvenna, P. F. & G. Savidge. 1992. A modified manual method for the determination of urea in seawater using diacetylmonoxime reagent. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 34: 429-438.

Murrell, M. C., R. S. Stanley, E. M. Lores, G. T. DiDonato & D. A. Flemer. 2002. Linkage between microzooplankton grazing and phytoplankton growth in a Gulf of Mexico Estuary. *Estuaries*, 25: 19-29.

Murrell, M. C. 2003. Bacterioplankton dynamics in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquat. Microb. Ecol.*, 32(3): 239-250.

Murrell, M. C. & E. M. Lores. 2004. Phytoplankton and zooplankton seasonal dynamics in subtropical estuary: Importance of cyanobacteria. *J. Plankton Res.*, 26(3): 371-382.

Murrell, M. C. & J. M. Caffrey. 2005. High cyanobacterial abundance in three northeastern gulf of Mexico estuaries. *Gulf Caribb. Res.*, 17: 95-106.

Nagasaki, K., M. Ando, I. Imai, S. Itakura & Y. Ishida. 1994. Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): a possible red tide disintegration mechanism. *Mar. Biol.*, 119: 307-312.

Nagasaki, K. 2008. Dinoflagellates, diatoms and their virus. *J. Microbiol.*, 46(3): 235-243.

Nagata, T. 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. En: Kirchman D. L. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley Series in *Ecological and Applied Microbiology*, U.S.A., 542 p.

Nakano, S., Y. Tomaru, T. Katano, A. Kaneda, W. Makino, Y. Nishibe, M. Hirose, M. Onji, S.-I. Kitamura & H Takeoka. 2004. The dynamics of microbial and herbivorous food webs in a coastal sea with special reference to intermittent nutrient supply from bottom intrusion. *Aquat. Ecol.*, 38: 485-493.

Nelson, D. M., P. Tréguer, M. A. Brzezinski, A. Leynaert & B. Quéguiner. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*, 9: 359-372.

Newell, R. C., M. I. Lucas & E. A. S. Linley. 1981. Rate of degradation and efficiency of conversion of phytoplankton debris by marine micro-organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 6:123-136.

Nielsen, T. & K. Richardson. 1989. Food-chain structure of the North-Sea plankton communities—seasonal variations of the role of the microbial loop. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 56: 75-87.

Noble, R. & J. Fuhrman. 1997. Virus Decay and Its Causes in Coastal Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1): 77-83.

Noble, R. & J. Fuhrman. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, 14: 113-118.

Nygaard, K. & A. Tobiesen. 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 273-279.

Officer, C. B. & J. H. Ryther. 1980. The possible importance of silicon in marine eutrophication. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3: 83-91.

Oldham, C. & P. Lavery. 1999. Sediment resuspension and its effect on porewater nutrient flux in a shallow, fetch-limited estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 183: 39-47.

Olsen, Y., S., Agustí, T. Andersen, C. M. Duarte, J. M. Gasol, I., Gismervik, A. S. Heiskanen, E. Hoell, P. Kuuppo, R. Lignell, H. Reinertsen, U. Sommer, H. Stibor, T. Tamminen, O. Vadstein, O. Vaque & M. Vidal. 2006. A comparative study of responses in planktonic food web structure and function in contrasting European coastal waters exposed to experimental nutrient addition. *Limnol. Oceanogr.*, 51(1): 488-503.

Paasche, E. 1980. Silicon content of five marine plankton diatom species measured with a rapid filter method. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 474-480.

Pace M. L. & J. J. Cole 1994. Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microb. Ecol.*, 28: 181-193.

Padayao, D. O. & M. L. San Diego-McGlone. 2000. Nitrogen and phosphorus in coastal systems: focus on dissolved organic N and P. *Science Diliman*, 12(2): 51-58.

Páez-Osuna, F. G. Ramírez-Reséndiz, A. C. Ruiz-Fernández & M. F. Soto-Jiménez, 2007. La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: Flujos, fuentes, efectos y opciones de manejo. En: Páez-Osuna, F. (ed.) Serie 2, Lagunas costeras de Sinaloa, SEMARNAT-CONACYT, México, 304 p.

Palenik, B., Q. Ren, V. Tai & I. T. Paulsen, 2009. Coastal *Synechococcus* metagenome reveals major roles for horizontal gene transfer and plasmids in population diversity. *Appl. Environment. Microbiol.*, 11(2): 349-359.

Pan, L. A., J. Zhang, L. H. & Zhang. 2007. Picophytoplankton, nanophytoplankton, heterotrophic bacteria and viruses in the Changjiang Estuary and adjacent coastal waters. *J. Plankton Res.*, 29: 187-197.

Palinska, K. A., T. Jahns, R. Rippka & N. Tandeau de Marsac. 2000. *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology*, 146: 3099-3107.

Pant, H. K. & K. R. Reddy. 2001. Phosphorus sorption characteristics of estuarine sediments under different redox conditions. *Journal Environmental Quality*, 30:1474-1480.

Parés-Sierra, A., A. Mascarenhas, S. G. Marinote & R. Castro. 2003. Temporal and spatial variation of the surface winds in the Gulf of California. *Geophysical Research Letters*, 30(6): 1312, doi:10.1029/2002GL016716.

Park, J.-H., Y. S. Lee, S. Lee & Y. Lee. 1998. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org.*, 34, 71-75.

Park, J. S., H. J. Kim, D. H. Choi & B. C. Cho. 2003. Active flagellates grazing on prokaryotes in high salinity waters of a solar saltern. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33: 173-179.

- Park, M. G., W. Yih & D. W. Coats. 2004. Parasites and phytoplankton, with special emphasis on dinoflagellate infections. *J. Euk. Microbiol.*, 51: 145-155.
- Partensky, F., W. R. Hess & D. Vaulot. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 102-127.
- Paul, J. H., S. C. Jiang & J. B. Rose. 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8): 2197-2204.
- Pedersen, M. F. & P. J. Hansen. 2003. Effects of high pH on a natural marine planktonic community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 260: 19-31.
- Peña-Cabriales, J. J., O. A. Grajeda-Cabrera & J. A. Vera-Nuñez. 2002. Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: uso de las técnicas isotópicas (¹⁵N). *Terra Latinoamericana*. 20: 51-56.
- Peters, F. 1994. Prediction of planktonic protistan grazing rates. *Limnol. Oceanogr.*, 39(1): 195-206.
- Pliński, M. & T. Józwiak. 1999. Temperature and N:P ratio as factors causing blooms of blue-green algae in the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia*, 41(1): 73-80.
- Poder Ejecutivo Federal. 1995. Programa de medio ambiente. 1995-2000.
- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24: 499-504.
- Pomeroy, L. R. 2000. Food web connections: links and sinks 81-87. En: Bell, C. R., M. Brylinsky & P. Johnson-Green (eds.) *Microbial Biosystems: New Frontiers. Atlantic Canada Society for Microb. Ecol*, Halifax, 939 p.
- Pomeroy, L. R., P. J. Williams, F. Azam & J. E. Hobbie. 2007. The Microbial Loop. *Oceanography*, 20: 28-33.

Poot-Delgado, C. 2006. Estructura de la comunidad fitoplanctónica con énfasis en las especies tóxicas y/o nocivas de Laguna de Macapule, Sinaloa. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México, 156 p.

Posh, T., M. Loferer-Kröbacher, G. Gao, A. Alfreider, J. Pernthaler & R. Psenner. 2001. Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume to carbon conversion factors. *Aquat. Microb. Ecol.*, 25: 55-63.

Pradeep-Ram, A. S., S. Nair & D. Chandamohan. 2007. Bacterial growth efficiency in a tropical estuary: seasonal variability subsidized by allochthonous carbon. *Microb. Ecol.*, 53: 591-599.

Precht, E. & M. Huettel. 2003. Advective porewater exchange driven by surface gravity waves and its ecological implications. *Limnol. Oceanogr.*, 48(4):1674-1684.

Proctor, L. & J. Fuhrman, 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343: 60-62.

Putland, J. N. 2005. Ecology of phytoplankton, *Acartia tonsa* and microzooplankton in Apalachicola Bay. Tesis de Doctorado. The Florida State University, College of Arts and Sciences, U.S.A., 140 p.

Ragueneau, O., P. Tréguer, A. Leynaert, R. F. Anderson, M. A. Brzezinski, D. J. DeMaster, R. C. Dugdale, J. Dymond, G. Fischer, R. Francois, C. Heinze, E. Maier-Reimer, V. Martin-Jézéquel, D. M. Nelson & B. Quéguiner. 2000. A review of the Si cycle in the modern ocean: recent progress and missing gaps in the application of biogenic opal as a paleoproductivity tracer, Global and Planetary change, accepted for publication. *Glob. Planet. Change.*, 26: 317-365.

Ragueneau, O., L. Chauvaud, A. Leynaert, G. Thouzeau, Y.-M. Paulet, S. Bonnet, A. Lorrain, R. Corvaisier, M. Le Hir, F. Jean & J. Clavier. 2002. Direct evidence of a biologically active coastal silicate pump: ecological implications. *Limnol. Oceanogr.*, 47 : 1849-1854.

Ragueneau, O., D. J. Conley, A. Leynaert, S. Longphuir & C. P. Slomp. 2006. Role of diatoms in silica cycling and coastal marine food webs, 163-195. En: Ittekkot, V., D. Unger, C. Humborg & N. An (eds.). *The silicon cycle: human perturbations and impacts on aquatic systems*. Island Press, Washington, D.C., 296 p.

Ramírez- Douriet, C. 2005. Detección molecular del virus de la mancha blanca (WSSV) en el sistema Lagunar San Ignacio - Navachiste - Macapule y en estanques de cultivo de camarón. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México, 84 p.

Raven, J. A. 1998. The twelfth tansley lecture. Small is beautiful: The picophytoplankton. *Funct. Ecology.*, 12: 503-513.

Ray, R. T., L. H. Haas & M. E. Sieracki. 1989. Autotrophic picoplankton dynamics in a Chesapeake Bay sub-estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 52: 273-285.

Redfield, A. C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *Ame. Sci.*, 46: 206-221.

Reddy, K. J., J. B., Haskell, D. M. Sherman & L. A. Sherman. 1993. Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *J. Bacteriol.*, 175(5): 1284-1292.

Remsen, C. C. 1971. Distribution of urea in coastal and oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 16: 732-740.

Reuter, J. H. 1977. Organic matter in estuaries. *Chesapeake Science*, 18: 210-221.

Riemann, L., C. Leitet, T. Pommier, K. Simu, K. Holmfeldt, U. Larsson & Å. Hagström. 2008. The native bacterioplankton community in the Central Baltic Sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 503-515.

Riley, W. J., I. Ortiz-Monasterio & P. A. Matson. 2001. Nitrogen leaching and soil nitrate, nitrite, and ammonium levels under irrigated wheat in Northern Mexico. *Nutr. Cyc. Agroecosyst.*, 61(3): 223-236.

Rose, A. L. & T. D. Waite. 2006. Role of superoxide in the photochemical reduction of iron in seawater. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 70(15): 3869-3882.

Rothhaupt, K. O. 1996. Utilization of substitutable C- and P-sources by the mixotrophic chrysophyte *Ochromonas* sp. *Ecology*, 77: 706-715.

Ruiz-De La Torre, M. C. 2003. Análisis cuantitativo de bacterias Marinas a partir de imágenes digitales con Microscopia de epifluorescencia: Limitaciones del método. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma De Baja California. Facultad De Ciencias Marinas, México, 63 p.

Sakamoto, T. & D. A. Bryant. 1999. Nitrate Transport and Not Photoinhibition Limits Growth of the Freshwater Cyanobacterium *Synechococcus* Species PCC 6301 at Low Temperature. *Plant Physiol.*, 119: 785-794

Sanders, R. W., D. A. Caron & U. G. Berninger. 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86:1-14.

Santos, V. S., M. C. Villac, D. R. Tenenbaum & R. Paranhos. 2007. Auto and heterotrophic nanoplankton and filamentous bacteria of Guanabara Bay. *Brazilian J. Oceanogr.*, 55(2): 133-143.

SARH. 1974. Estudio y medición de la contaminación de agua producida por aguas de retorno agrícola. (Memoria). Dirección General de Uso del Agua y Prevención de la Contaminación. Dirección de la Prevención de la Contaminación, México.

Saulnier, P. & A. Andremont. 1992. Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 2080-2083.

Schmidt, L. E. & P. J. Hansen. 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 216:67-81.

Sciandra, A. 1991. Coupling and uncoupling between nitrate up- take and growth rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under different frequencies of pulsed nitrate supply. *Mar Ecol. Prog Ser.*, 72: 261-269.

See, J. H., D. A. Bronk & Lewitus, A. J. 2006. Uptake of Spartina-derived humic nitrogen by estuarine phytoplankton in nonaxenic and axenic culture, *Limnol. Oceanogr.*, 51: 2290-2299.

Šestanović, S., M. Šolić, N. Krstulović & Z. Ninčević. 2004. Seasonal and vertical distribution of planktonic bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the middle Adriatic Sea. *J. Oceanogr.*, 52: 399-407

Shariff, M., S. Soon, K. L. Lee & L. T. Tan. 2000. Practical problems with PCR detection in Asia: The importance of standardization, 45-51. En: Walker, P. & R. Subasinghe. 1999 (eds.) DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, 93 p.

Sherr, E. B., E. A. Caron & B. F. Sherr. 1993. Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists, 207-212. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (eds.) Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, 777 p.

Sherr, E. B. & B. F. Sherr. 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy, 213-227. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (eds.) Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, 777 p.

Sherr, B. F. & E. B. Sherr, 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 293-308,

Sherr, B. F., E. B. Sherr, D. Caron, D. Vaultot & A. Worden. 2007. Oceanic protists. *Oceanography*. 20(2): 130-134.

Shiah, F. K. & H. W. Ducklow. 1994. Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, U.S.A. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 103: 297-308.

Shinada, A., S. Ban, Y. Yamada & T. Ikeda. 2005. Seasonal Variations of Plankton Food Web Structure in the Coastal Water off Usujiri Southwestern Hokkaido, Japan. *J. Oceanogr.*, 61(4): 645-654.

Shinada, A., S. Ban & T. Ikeda, 2008. Seasonal changes in the planktonic food web off Cape Esan, southwestern Hokkaido, Japan. *Plankton Benthos Res.*, 3(1): 18-26.

Shirai, Y., Y. Tomaru, Y. Takao, H. Suzuki, T. Nagumo & K. Nagasaki. 2008. Isolation and characterization of a singlestranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(13): 4022-4027.

Shum, K. T. & B. Sundby. 1996. Organic matter processing in continental shelf sediments: The subtidal pump revisited. *Mar. Chem.*, 53: 81-87.

Simon, M., B. C. Cho & F. Azam. 1992. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86: 103-110.

Singler, H. R. & T. A. Villareal. 2005. Vertical migration of *Rhizosolenia* mats and their significance to NO₃- fluxes in the central North Pacific Gyre. *J. Plankton Res.*, 27(6): 545-556.

Smayda, T. J. & C. S. Reynolds. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: Application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.*, 23: 447-461.

Smayda, T. J. & C. S. Reynolds. 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *J. Sea Res.*, 49: 95-106.

Sorokin, Y. & F. Dallochio. 2008. Dynamics of phosphorus in the Venice lagoon during a picocyanobacteria bloom. *J. Plankton Res.*, 30: 1019-1026.

Steele, J. H. 1974. The structure of marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.*, 19(6), 1015-1016.

Sritunyalucksana, K., J. Srisala, K. McColl, L. Nielsen & T. W. Flege. 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 255: 95-104.

Stickney, H. L., R. R. Hood & D. K. Stoecker. 2000. The impact of mixotrophy on planktonic marine ecosystems. *Ecol. Model.*, 125: 203–230,

Stoecker, D. K., A. Li, D. W. Coats, D.E. Gustafson & M. K. Nannen. 1997. Mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 152(11): 1-12.

Stoecker, D. K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46: 397-401.

Strathmann, R. R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 411-418.

Strickland, J. D. & T. R. Parsons. 1972. A practical handbook for the sea water analysis. *Fish. Res. Bd. Canada, Bull.*, 167. (2nd ed.), 311 p.

Strom, S. 2000. Bacterivory: Interactions Between Bacteria and their Grazers, 351-386. En: Kirchman, D. L. (ed.). *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley – Liss, U.S.A., 542 p.

Sundbäck, K., B. Jönsson, P. Nilsson & I. Lindström, 1990. Impact of accumulating drifting macroalgae on a shallow-water sediment system: an experimental study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58: 261-274.

Suttle, C., Chan, A. & T. Cottrell, 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*, 347. 467-469.

Suttle, C. A. 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb. Ecol.*, 28: 237-243.

Takahashi, Y, T. Itami, M. Maeda, N. Suzuki, J. Kasornchandra, K. Supamattaya, R. Khongpradit, S. Boonyaratpah, M. Kondo, K. Kawai, R. Kusuda, I. Hirono & T. Aoki. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA

in *Penaeus japonicus* Bate and systematic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricus. *J. Fish Dis.*, 19: 339-403.

Tanaka, T., N. Fujita & A. Taniguchi 1997. Predator-prey eddy in heterotrophic nanoflagellate-bacteria relationship in coastal marine environment: A new scheme for predator-prey associations. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13: 249-256.

Tanaka, T. & F. Rassoulzadegan. 2002. Full-depth profile (0–2000m) of bacteria, heterotrophic nanoflagellates and ciliates in the NW. Mediterranean Sea: Vertical partitioning of microbial trophic structures. *Deep-Sea Res. Pt. II*, 49: 2093-2107.

Tanaka, T., F. Rassoulzadegan & T. F. Thingstad. 2004. Orthophosphate uptake by heterotrophic bacteria, cyanobacteria, and autotrophic nanoflagellates in Villefranche Bay, northwestern Mediterranean: Vertical, seasonal, and short-term variations of the competitive relationship for phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 49:1063-1072.

Tang, K. F. J. & D. V. Lightner. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 189: 11-21.

Taylor, F., D. J. Balckbourn & J. Blackbourn, 1969. Ultrastructure of the chloroplasts and associated structures within the marine ciliate *Mesodinium rubrum* (Lohmann). *Nature*, 224: 819-821

Therkildsen, M. S., G. M. King & B. Lomstein. 1996. Urea production and turnover following the addition of AMP, CMP, RNA and a protein mixture to a marine sediment. *Aquat. Microb. Ecol.*, 10: 173-179.

Therkildsen, M. S., M. F. Isaksen & B. Lomstein. 1997. Urea production by the marine bacteria *Delacya venusta* and *Pseudomonas stutzeri* grown in a minimal medium. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13: 213-217.

Thingstad, T. F. & R. Lignell. 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13: 19-27.

Thingstad, T. F. 2000a. Control of bacteria growth idealized food webs, 229-260. En: Kirchman D. L. (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology, U.S.A., 542 p.

Thingstad, T. F. 2000b. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.*, 45(6):1320-1328.

Thingstad, T. F., G. Bratbak & M.Heldal, 2008. Aquatic phage ecology, 10: 251-280. En: Abedon, S. T. (ed.). *Bacteriophage Ecology - Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses* (1 edition). Cambridge University Press, New York, 508 p.

Thompson, P.A., M. Guo & P. J. Harrison. 1992. Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 28: 481-488.

Timmermans, K. R., B. Van der Wagt, M. J. W. Veldhuis, A. Maatman & de H. J. W. Baar. 2005. Physiological responses of three species of marine pico-phytoplankton to ammonium, phosphate, iron and light limitation. *J. Sea Res.*, 53: 109-120.

Tittel, J., V. Bissinger, B. Zippel, U. Gaedke, E. Bell, A. Lorke & N. Kamjunke. 2003. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: Implications for aquatic food webs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(22): 12776-12781.

Tittel, J., I. Wiehle, N. Wannicke, H. Kampe, J. Poerschmann, J. Meier, & Kamjunke, N. 2009. Utilization of terrestrial carbon by osmotrophic algae. *Aquat. Sci.*, 71: 46-54.

Tomaru, T., K. Tarutani, M. Yamaguchi & K. Nagasaki. 2004. Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.*, 34(3): 227-238.

Tsai, A. Y., K. P. Chiang, J. Chang & G. C. Gong. 2005. Seasonal diel variations of picoplankton and nanoplankton in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. *Limnol. Oceanogr.*, 50(4): 1221-1231.

- Tungaraza, C., V. Rousea, N. Briona, L. Lancelot, J. Gichuki, W. Baeyens & L. Goeyens. 2003. Contrasting nitrogen uptake by diatom and *Phaeocystis*-dominated phytoplankton assemblages in the North Sea. *J. Exp. Mar., Biol. Ecol.*, 292: 19-41.
- Turley, C. M. 1986. Urea uptake by phytoplankton at different fronts and associated stratified and mixed waters on the European shelf. *Br. Phycol. J.*, 21: 225-238.
- Turner, J. T. 2002. Zooplankton fecal pellets, marine snow and sinking phytoplankton blooms. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27: 57-102.
- Ulloa, A. E. 2005. Influencia de la disponibilidad de nutrientes sobre los cambios espacio-temporales de la comunidad de fitoplancton en el litoral del Municipio de Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México, 97 p.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkomnung der quantitativen Phytoplankton: methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Ange. Limnol.*, 9: 1 - 38.
- Valderrama, J. C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, 10: 109-122.
- Van Hulten, M.C., M. F. Tsai, C. A. Schipper, C. F. Lo, G. H. Kou & J. M. Vlak. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ibonucleotide reductase genes and repeat regions. *J. Gen. Virol. Pt. 2*, 81: 307-316.
- Vaqué, D., Ò. Guadayol, F. Peters, J. Felipe, L. Angel-Ripoll, R. Terrado, C. Lovejoy & C. Pedros-Alio. 2008. Seasonal changes in planktonic bacterivory rates under the ice-covered coastal Arctic Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 53: 2427-2438.
- Veldhuis, M. J. W., K. R. Timmermans, P. Croot, & B. Van der Wagt. 2005. Picophytoplankton; a comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *J. Sea Res.*, 53: 7-24.
- Valiela, I. 1995. The structure of marine communities over time: Long- and short- term changes. En: Valiela I. (ed.) *Marine ecological processes Marine Ecological Processes* (2nd ed.). Springer, New York, 686 p.

- Verity, P. G. 1981. Effects of temperature, irradiance, and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* Cleve. 1. Photosynthesis and cellular composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 55: 79-91.
- Vijayan K. K., R. V. Stalin, C. P. Balasubramanian, S. V. Alavandi, S. V. Thillai & T. C. Santiago. 2005. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 63: 107-111.
- Vicencio, M. D. 1979. Estudio ictiológico de dos lagunas costeras de la zona norte de Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 116 p.
- Villareal, T. A., S. Woods, J. K. Moore & K. CulverRymsza, 1996. Vertical migration of Rhizosolenia mats and their significance to NO₃- fluxes in the central North Pacific Gyre. *J. Plankton Res.*, 18(7): 1103-1121.
- Villegas-Aguilera, M. M. 2009. Fitoplancton silíceo de la zona eufórica, como señal de la productividad primaria en la cuenca Alfonso, Golfo de California. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, México, 95 p.
- Vörösmarty, C. J. & T. C. Loder. 1994. Spring-neap tidal contrasts in marsh-dominated estuaries. *Estuaries*, 17: 537-551.
- Vrede, T., A. Ballantyne, C. Mille-Lindblom, G. Algesten, C. Gudasz, S.Lindahl & A. K. Brunberg. 2009. Effects of N:P loading ratios on phytoplankton community composition, primary production and N fixation in a eutrophic lake. *Freshwat. Biol.*, 54(2): 331-344.
- Wallace, D. R. W. & C. D. Wirrick. 1992. Large air-sea gas fluxes associated with breaking waves. *Nature*, 356: 694-696.
- Wallberg, P., P. R. Jonsson & R. Johnstone. 1999. Abundance, biomass and growth rates of pelagic microorganisms in a tropical coastal ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.*, 18: 175-185.
- Wanninkhof, R. 1992. Relationship between wind speed and gas exchange over the ocean. *J. Geophys. Res.*, 97: 7373-7382.

Weinbauer, M. G. & C. A. Suttle. 1997. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13: 225-232.

Weinbauer, M. G. 2004. Ecology of procariotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28: 127-181.

Weston, N. & S. Joye. 2005. Temperature-driven decoupling of key phases of organic matter degradation in marine sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102(47): 17036-17040.

Weisse, T. 1989. The microbial loop in the Red Sea: Dynamics of pelagic bacteria and heterotrophic nanoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 55: 241-250.

Wilhelm, S. W. & Suttle, C. A. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience*. 49: 781-788.

Wilson I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3741-3751.

Wilson, W. H., S. Turner & N. H. Mann. 1998. Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effects on DMSP and DMS production. *Estuarine, Estuar. Coast Shelf Sci.*, 46: 49-59.

Winder, M., J. E. Reuter & S. G. Schladow. 2009. Lake warming favours small-sized planktonic diatom species. *Proc. R. Soc. B.*, 276: 427-435.

Wommack, K. E., T. T. Hill, M. Kessel, E. Tussek-Cohen & R. R. Colwell. 1992. Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2965-2970.

Wommack, J. & R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (1): 69-114.

Wongteerasupaya, C., S. Wongwisansri, V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G. L. Nash, B. Withyachumnarnkul & T. W. Flegel. 2003. DNA fragment of *Penaeus*

monodon baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with viral infections in six penaeid shrimp species. *Aquaculture*, 143: 23-32

Wu, J. L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya & K. Muroga. 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 129-135.

Wu, B. & S. Sun. 2006. Ammonia and urea excretion of the nemertean *Procephalothrix simulus* Iwata: effects of salinity, temperature, body weight and amputation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 337(1): 13-18.

Yamada, S. S. & C. F. D'Elia. 1984: Silicic acid regeneration from estuarine sediment cores. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 18: 113-118.

Yamochi, S. 1989. Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. *Bull. Osaka Pref Fish Exp Stn.*, 8: 1-110.

Yan, D. C., S. L. Dong, J. Huang, X. M. Yu, M. Y. Feng & X. Y. Liu. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, 59 (1): 69-73.

Yan, D. C., S. Y. Feng, J. Huang & S. L. Dong. 2007. Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 273: 423-426.

York, J. K., Z. Witek, S. Labudda, S. Ochocki & E. Aas. 2001. Comparison of primary production and pelagic community respiration rate in the coastal zone of the Gulf of Gdansk. *Oceanologia*, 43: 365-370.

Zar, J. H. 2009. *Biotatistical Analysis* (5^a Ed.). Prentice Hall, U.S.A., 944 p.

Zavala-Norzagaray, A. 2006. Incidencia de post-larvas de camarón en el sistema Lagunar San Ignacio-Navachiste-Macapule (2002-2003). Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, México, 88 p.

Zehr, J. P., J. B. Waterbury, P. J. Turner, J. P. Montoya, E. Omoregie, G. F. Steward, A. Hansen & D. M. Karl. 2001. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*, 412: 635-638.

Zeitzschel, B. 1969. Primary productivity in the Gulf of California. *Mar. Ecol.*, 3: 201-207.

Zhang, J., S. Dong, X. Tian, Y. Dong, X. Liu & D. Yan. 2006. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus*, Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, 261: 1181-1185.

Zlotnik, I. & Z. Dubinsky. 1989. The effect of light and temperature on DOC excretion by phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 34: 831-839.

Zubkov, M., B. Fuchs, G. Tarran, P. Burkill & R. Amann. 2003. High rate of Uptake of Organic Nitrogen Compounds by *Prochlorococcus* Cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1299-1304.

XII ANEXOS

Anexo 1

Tabla 10. Valores de profundidad total y disco Secchi, irradiancia solar, cociente de atenuación de la luz y profundidad de capa fótica para cada sitio de muestreo en la Laguna de Macapule durante diciembre de 2007 – diciembre de 2008.

| Estero El Tortugón | | | | | |
|--------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Fecha muestreo | Prof. Total (m) | Prof. Secchi (m) | Irradiancia solar ($W.m^{-2}$) | Coefficiente atenuación de luz | Prof. Capa Fótica (m) |
| 14/12/2007 | 4.5 | 1.5 | 353.63 | 1.07 | 4.32 |
| 21/01/2008 | 3.75 | 0.75 | 367.98 | 2.13 | 2.16 |
| 19/02/2008 | 2.9 | 1.1 | 444.95 | 1.45 | 3.17 |
| 27/03/2008 | 3.25 | 0.7 | 531.92 | 2.29 | 2.01 |
| 17/04/2008 | 1.5 | 0.6 | 549.04 | 2.67 | 1.73 |
| 08/05/2008 | 1.3 | 0.5 | 510.84 | 3.20 | 1.44 |
| 10/06/2008 | 2.0 | 0.5 | 537.40 | 3.20 | 1.44 |
| 02/07/2008 | 1.5 | 0.7 | 456.27 | 2.29 | 2.01 |
| 07/08/2008 | 2 | 0.75 | 432.91 | 2.13 | 2.16 |
| 03/09/2008 | 1.5 | 0.5 | 498.69 | 3.20 | 1.44 |
| 08/10/2008 | 1.97 | 0.65 | 456.51 | 2.46 | 1.87 |
| 07/11/2008 | 3 | 1 | 412.74 | 1.60 | 2.88 |
| 08/12/2008 | 2 | 1 | 389.12 | 1.60 | 2.88 |
| Boca de Macapule | | | | | |
| 14/12/2007 | 5.5 | 2 | 353.63 | 0.80 | 5.76 |
| 21/01/2008 | 7 | 0.5 | 367.98 | 3.20 | 1.44 |
| 19/02/2008 | 3.5 | 1 | 444.95 | 1.60 | 2.88 |
| 27/03/2008 | 4.5 | 1.15 | 531.92 | 1.39 | 3.31 |
| 17/04/2008 | 4 | 1.5 | 549.04 | 1.07 | 4.32 |
| 08/05/2008 | 5.3 | 1.8 | 510.84 | 0.89 | 5.18 |
| 10/06/2008 | 4.0 | 2.0 | 537.40 | 0.80 | 5.76 |
| 02/07/2008 | 4.0 | 1.5 | 456.27 | 1.07 | 4.32 |
| 07/08/2008 | 5 | 2 | 432.91 | 0.80 | 5.76 |
| 03/09/2008 | 4 | 1 | 498.69 | 1.60 | 2.88 |
| 08/10/2008 | 3.7 | 1 | 456.51 | 1.60 | 2.88 |
| 07/11/2008 | 4 | 2.1 | 412.74 | 0.76 | 6.04 |
| 08/12/2008 | 3.5 | 1.5 | 389.12 | 1.07 | 4.32 |

Anexo 2

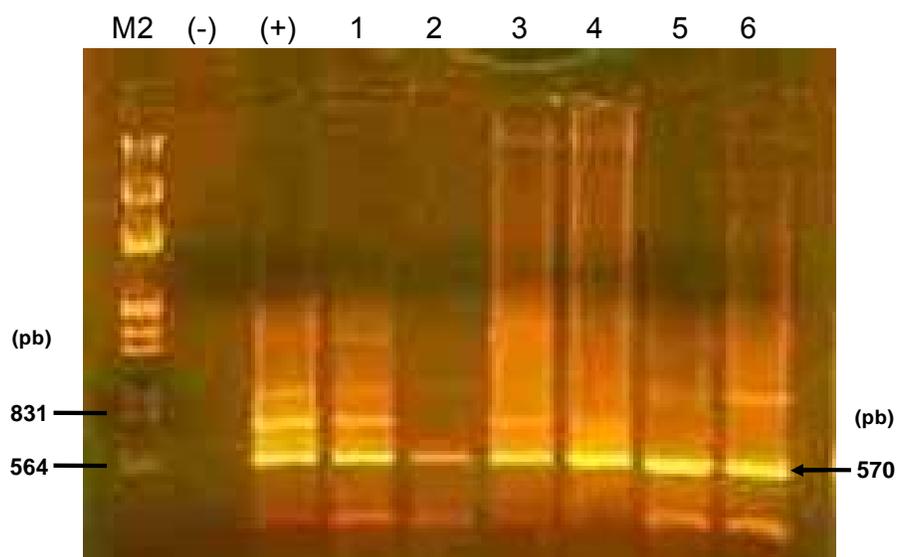
Detección molecular y cuantificación de ADN del WSSV en tejido de camarón.

En la tabla 11 se observan los resultados comparativos de la detección del WSSV por los diferentes procedimientos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996), semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀TM) y cuantitativa en tiempo real (IQ_{REAL}TM) a partir de extractos de camarones infectados con WSSV y durante los pasos intermedios del proceso de purificación del virus. Así mismo, en las figuras de la 30 a la 33 se presentan las electroforesis de los geles que validan la información presentada en la siguiente tabla.

Tabla 11. Detección y cuantificación de ADN de WSSV por PCR anidada y en tiempo real de muestras de tejido de camarón. * Obtenido a partir de la mezcla de pleópodos de los animales 154, 190 y 272. (+) Positivo. (-) Negativo. N.D. No hay dato.

| Código de muestra o fracción | Protocolo de extracción | PCR Anidada (Kimura <i>et al.</i> 1996) | PCR Anidada (IQ ₂₀₀₀ TM WSSV) | PCR Tiempo real (IQ _{REAL} WSSV) * | |
|--|----------------------------------|---|---|---|---|
| | | | | No. copias de ADN•μL ⁻¹ (extracto) | No. copias de ADN•mL ⁻¹ (extracto) |
| 59 | IQ _{REAL} TM | + | - | N.D. | N.D. |
| 154 | IQ _{REAL} TM | + | +(Severa) | N.D. | N.D. |
| 190 | IQ ₂₀₀₀ TM | + | +(Severa) | 3.70 x10 ⁴ | 3.70 x10 ⁷ |
| 210 | IQ ₂₀₀₀ TM | + | +(Muy ligera) | - | - |
| 272 | IQ ₂₀₀₀ TM | + | +(Severa) | N.D. | N.D. |
| Purificación del WSSV * | | | | | |
| Tejido (60 mg) | IQ _{REAL} TM | + | +(Severa) | 1.27 x10 ⁵ | 1.27 x10 ⁸ |
| 1º Sobrenadante (500 μL) | IQ _{REAL} TM | + | +(Severa) | 6.64x10 ⁴ | 6.64x10 ⁷ |
| Concentrado directo (500 μL) | IQ _{REAL} TM | + | +(Severa) | 1.42 x10 ³ | 1.42x10 ⁶ |
| Concentrado filtrado (500 μL) en ANODISC | IQ _{REAL} TM | + | +(Severa) | 8.22 x10 ² | 8.22 x10 ⁵ |

Aparentemente solo se observaron dos inconsistencias entre los tres métodos de detección con los camarones 59 y 210. El primero fue únicamente positivo para la PCR anidada según Kimura *et al.* (1996); mientras el segundo, no fue detectado con la PCR en tiempo real (Figuras 30; Tabla 11)



| No | Muestra | Kimura <i>et al.</i> (1996) |
|----|--------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Camarón 190-1-2009 | + |
| 2 | Camarón 210-1-2009 | + |
| 3 | Tejido (purificación) | + |
| 4 | Sobrenadante (500 µL)* | + |
| 5 | Concentrado directo (500 µL)* | + |
| 6 | Concentrado filtrado (500 µL)* | + |

Figura 30. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) para detección de WSSV en extractos de tejido camarón infectado y en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación del WSSV (*). (M2) Marcador molecular 1Kb; (+) Control positivo; (-) Control negativo (agua ultrapura).

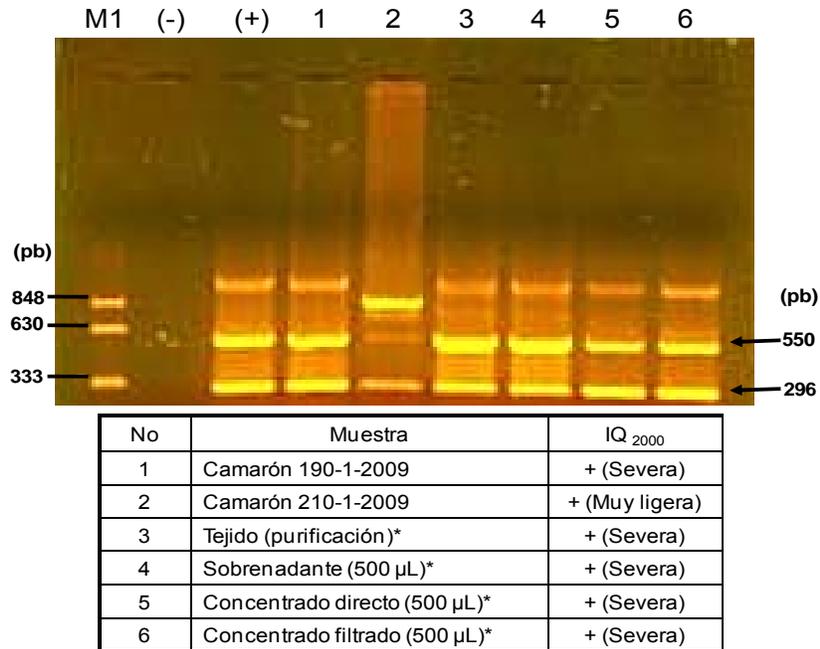


Figura 31. Productos de PCR anidada (Kimura *et al.*, 1996) y semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀) para detección de WSSV en extractos de tejido camarón infectado. (M1) Marcador molecular IQ₂₀₀₀; (M2) Marcador molecular 1Kb; (+) Control positivo para IQ₂₀₀₀; (+54) Control positivo (camarón confirmado por IQ₂₀₀₀); (-) Control negativo (agua ultrapura).

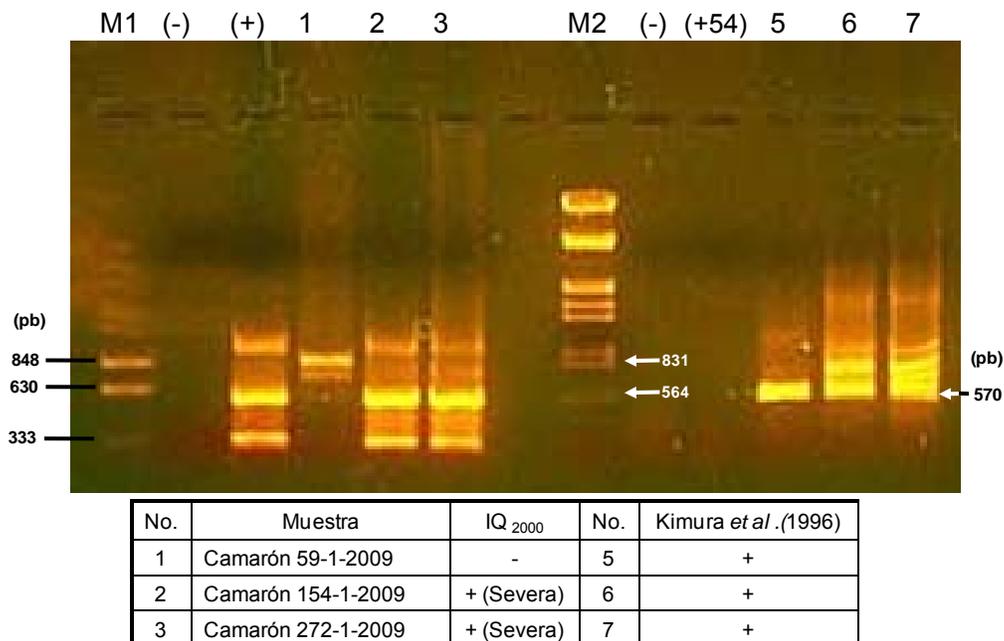


Figura 32. Productos de PCR anidada semi-cuantitativa (IQ₂₀₀₀) para detección de WSSV en extractos de tejido de camarón infectado y en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación del WSSV (*). (M1) Marcador molecular IQ₂₀₀₀; (+) Control positivo para IQ₂₀₀₀; (-) Control negativo (agua ultrapura).

Anexo 3

Tabla 12. Valores promedio mensuales de abundancia de PSV, PT (BP+PA), BP, PA, NF y NZ para cada sitio de muestreo (Reservorio y estanque tipo) en la granja camaronícola Doña Juana durante diciembre de 2007 – diciembre de 2008.

| Fecha Muestreo | Reservorio | | | | | |
|----------------|---|---|--|--|--|--|
| | PSV ($\times 10^7$ PSV·mL ⁻¹) | PT* ($\times 10^7$ cél·mL ⁻¹) | PB ($\times 10^6$ cél·mL ⁻¹) | PA ($\times 10^5$ cél·mL ⁻¹) | NF ($\times 10^4$ cél·mL ⁻¹) | NZ ($\times 10^3$ cél·mL ⁻¹) |
| Mar.08 | 6.54 | 0.80 | 0.79 | 1.13 | 1.44 | 1.13 |
| Abr.08 | 9.21 | 1.34 | 1.27 | 7.07 | 1.19 | 0.92 |
| May.08 | 6.54 | 1.10 | 1.06 | 2.12 | 2.19 | 0.38 |
| Jun.08 | 14.10 | 2.51 | - | - | - | - |
| Jul.08 | 9.19 | 2.22 | - | - | - | - |
| Ago.08 | 5.80 | 1.03 | - | - | - | - |
| Sep.08 | 7.99 | 1.77 | - | - | - | - |
| Oct.08 | 7.52 | 2.50 | - | - | - | - |

| Fecha Muestreo | Estanque tipo | | | | | |
|----------------|---|---|--|--|--|--|
| | PSV ($\times 10^7$ PSV·mL ⁻¹) | PT* ($\times 10^7$ cél·mL ⁻¹) | PB ($\times 10^6$ cél·mL ⁻¹) | PA ($\times 10^5$ cél·mL ⁻¹) | NF ($\times 10^4$ cél·mL ⁻¹) | NZ ($\times 10^3$ cél·mL ⁻¹) |
| Mar.08 | - | - | - | - | - | - |
| Abr.08 | - | - | - | - | - | - |
| May.08 | 6.98 | 1.18 | 11.43 | 4.15 | 3.71 | 0.97 |
| Jun.08 | 15.9 | 0.94 | - | - | - | - |
| Jul.08 | 8.25 | 1.51 | - | - | - | - |
| Ago.08 | 14.7 | 2.54 | - | - | - | - |
| Sep.08 | 6.72 | 2.81 | - | - | - | - |
| Oct.08 | 6.51 | 1.69 | - | - | - | - |

- No hay dato; * Picoplancton total: suma de BP y PA.

Anexo 4

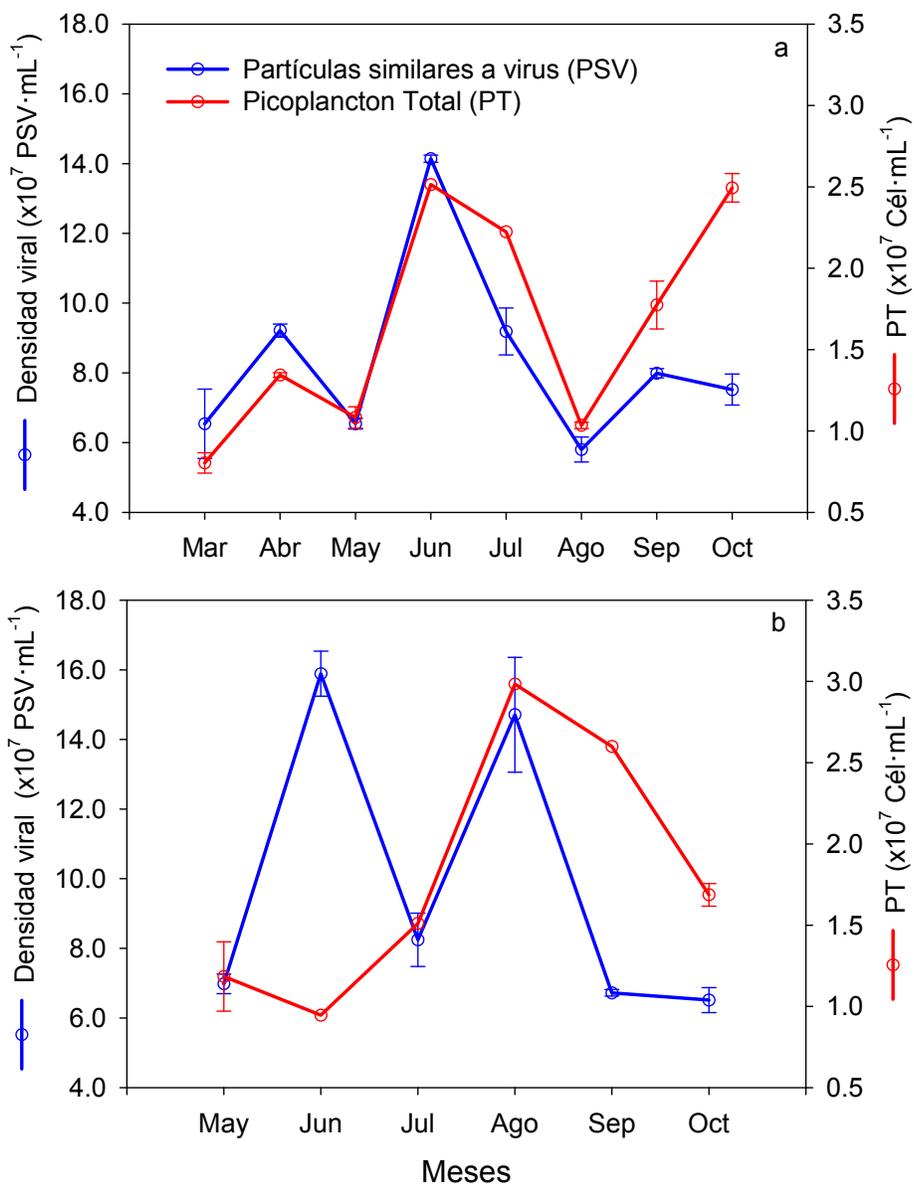


Figura 33. Variación temporal de la densidad de virioplancton (PSV) y picoplancton total (PT) en las estaciones del reservorio (a) y el estanque de cultivo (b) de la granja camaronícola Doña Juana entre marzo y octubre de 2008. Las barras de error indican el error estándar.