

**CYANOBACTERIAS EN LA BAHÍA DE MAYAGÜEZ: ABUNDANCIA,
DISTRIBUCIÓN Y SU RELACIÓN CON LAS PROPIEDADES BIO-ÓPTICAS**

Por

Yvette Ludeña Hinojosa

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

Arturo Massol Deyá, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Rafael Montalvo, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Fernando Gilbes Santaella, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Johannes Schellekens, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Lucy B. Williams, Ph.D.
Directora de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Mayagüez Bay is a complex environment with variety of physical and biological processes influencing the spatial and temporal variability of bio-optical properties. This research focused on the role of cyanobacteria because phytoplankton is a key component of the large bio-optical variability in marine environments. Their distribution was assessed by traditional and molecular techniques. The Bay was sampled during five cruises from July to December of 2005 in coastal stations (A1, G1, Y1, AAA) and oceanic stations (A2, G2). The abundance of cyanobacteria was low, representing only 3.6% of the total phytoplankton. Diatoms were the dominant group during the study period. Abundance of cyanobacteria and diatoms showed spatial and temporal changes, when rivers input were high. Diatoms abundance and Chlorophyll-a were higher at coastal stations than at oceanic stations. These two parameters were also consistently high at G1 and Y1 stations. A negative relationships was found between cyanobacteria abundance and Chlorophyll-a, whereas diatoms were positively correlated with Chlorophyll-a, indicating that this group contributes most to the Chlorophyll-a concentration in Mayagüez Bay. High temporal and spatial variability was found for all the bio-optical properties. The absorption, backscattering and attenuation coefficients of station G1 were the highest. In oceanic stations these coefficients were low. A clear relationship between cyanobacteria abundance and bio-optical properties could not be established. In contrast, diatoms abundance and Chlorophyll-a were positively correlated with bio-optical properties. Therefore, changes in diatoms abundance are very important for the optical variability of Mayagüez Bay. Spatial and temporal changes in the community structure of cyanobacteria were found by analyzing Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) of 16S rDNA cyanobacteria. Clones libraries revealed that the cyanobacteria community was also composed of picocyanobacteria.

RESUMEN

La Bahía de Mayagüez es un ambiente complejo con diversos procesos físicos y biológicos que influyen en la variabilidad espacial y temporal de las propiedades bio-ópticas. Esta investigación estuvo enfocada en el rol de las cianobacterias, debido a que el fitoplancton es considerado como una parte importante de la variabilidad bio-óptica en ambientes marinos. Su distribución se determinó por técnicas tradicionales y moleculares. Los muestreos en la Bahía se realizaron de julio a diciembre del 2005 en estaciones costeras (A1, G1, Y1, AAA) y en estaciones oceánicas (A2, G2). La abundancia de las cianobacterias fue baja, representando únicamente el 3.6% del total del fitoplancton. Las diatomeas fueron el grupo dominante durante el periodo del estudio. La abundancia de las cianobacterias y diatomeas mostró variaciones a nivel espacial y temporal, cuando la descarga de los ríos a la Bahía fue alta. La abundancia de diatomeas y Clorofila-a fueron más altos en las estaciones costeras que en las estaciones oceánicas. Estos dos parámetros fueron consistentemente altos en las estaciones G1 y Y1. Se encontró una relación negativa entre cianobacterias y clorofila-a, mientras que la relación fue positiva con diatomeas, indicando que este grupo contribuye más a la concentración de clorofila-a en la Bahía. Las propiedades bio-ópticas mostraron alta variación a nivel espacial y temporal. La estación G1 registró valores más altos de los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación. En las estaciones oceánicas estos coeficientes fueron bajos. No se pudo establecer una relación entre abundancia de cianobacterias y propiedades bio-ópticas. En contraste, la abundancia de diatomeas y clorofila-a fueron positivamente relacionadas con las propiedades bio-ópticas. Por lo tanto, cambios en la abundancia de diatomeas son importantes para la variabilidad bio-óptica de la Bahía de Mayagüez. Mediante el análisis de restricción de polimorfismo de longitud del fragmento terminal del 16S rDNA de cianobacteria, se observó cambios en la estructura de la comunidad de cianobacteria a nivel espacial y temporal. Librería de clones reveló que la comunidad de cianobacterias esta también conformada por picocianobacterias.

DEDICATORIA

A mi adorada madre, Angélica, por su inmenso amor, ejemplo y que ahora junto a Dios guía mi camino.

A mi padre, Edmundo y a mis hermanos Kely, Erick y David, por todo su amor y por brindarme toda la fuerza necesaria para lograr esta meta.

A Eric, por su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, por brindarme la oportunidad de seguir estudios de Maestría y por su apoyo como Asistente de Cátedra.

A mi Director de Tesis, Dr. Fernando Gilbes por su guía y consejos para concluir éste trabajo y por su confianza en formar parte de su equipo de investigación.

A los miembros del Comité Graduado, Dr. Arturo Massol y Dr. Rafael Montalvo por la revisión del manuscrito.

Un especial agradecimiento al Dr. Arturo Massol, por las facilidades en el uso de materiales y equipos del Laboratorio de Ecología Microbiana, por sus valiosas sugerencias y aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A NOAA-CREST, por la subvención para la ejecución de éste trabajo de investigación.

Al Dr. Juan González Lagoa, por donarme el equipo necesario para la colecta del fitoplancton.

A Patrik Reyes por su colaboración en la toma de muestras y a Vilmaliz Rodriguez por el procesamiento de datos de la Roseta Bio-óptica.

A M.S. Gladys Toro y Enid Rodríguez, por sus enseñanzas y consejos en las diferentes técnicas de Biología Molecular que forman parte de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología Microbiana por sus consejos y que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis padres y hermanos por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. A mi esposo Eric, por su amor, comprensión y constante estímulo.

Por último a todos mis amigos, por su amistad y por ser parte importante de mi estadía en Puerto Rico. En especial a Diana y Paola, por su cariño y por todo el apoyo brindado...Gracias por estar ahí!

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| ABSTRACT | ii |
| RESUMEN | iii |
| AGRADECIMIENTOS | v |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 7 |
| Objetivo principal..... | 7 |
| Objetivos específicos..... | 7 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 8 |
| Cianobacterias | 8 |
| Propiedades Bio-ópticas del agua..... | 15 |
| Propiedades ópticas Inherentes..... | 15 |
| Propiedades ópticas aparentes | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| Área de estudio | 20 |
| Plan de muestreo..... | 21 |
| Colección de muestras..... | 23 |
| Enumeración del Fitoplancton..... | 24 |
| Identificación de cianobacterias | 24 |
| Determinación de clorofila-a..... | 26 |
| Propiedades Bio-ópticas | 26 |
| Estructura de la comunidad de cianobacterias mediante análisis del 16S ADN ribosomal..... | 28 |
| Extracción de ADN de la comunidad microbiana..... | 28 |
| Polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción del 16S rADN (T-RFLP) de cianobacterias..... | 30 |
| Clonación del gen 16S ADN ribosomal de cianobacterias | 32 |
| Análisis estadístico | 37 |
| RESULTADOS | 38 |
| Abundancia de Fitoplancton..... | 38 |
| Identificación de cianobacterias | 41 |
| Determinación de Clorofila-a | 47 |
| Propiedades Bio-ópticas | 51 |
| Coeficiente de Absorción (a)..... | 51 |
| Coeficiente de Retrodispersión (b_b)..... | 53 |
| Coeficiente de Atenuación (c) | 55 |
| Coeficiente de atenuación difusa (K_d)..... | 57 |
| Temperatura y Salinidad..... | 60 |

| | |
|--|------------|
| Análisis de Correlación | 61 |
| Estructura de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez | 64 |
| Polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP)..... | 64 |
| Librería de clones del 16 rADN de cianobacterias de dos estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez. | 69 |
| DISCUSIÓN | 77 |
| Abundancia de Fitoplancton..... | 77 |
| Identificación de cianobacterias | 80 |
| Clorofila-a..... | 81 |
| Propiedades bio-ópticas..... | 84 |
| Coeficiente de atenuación difusa de la luz (K_d) | 90 |
| Análisis de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez | 92 |
| CONCLUSIONES | 97 |
| RECOMENDACIONES | 99 |
| LITERATURA CITADA | 100 |
| APÉNDICE | 109 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ubicación de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez..... | 22 |
| Figura 2. Roseta Bio-óptica utilizada para obtener las medidas de las propiedades ópticas y oceanográficas en la Bahía de Mayagüez..... | 28 |
| Figura 3. Análisis de la diversidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez..... | 36 |
| Figura 4. Composición y densidad de la comunidad del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez..... | 39 |
| Figura 5. Distribución de la densidad de cianobacterias en las estaciones a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez. Promedio de superficie y profundidad. A1, AAA, G1, Y1= estaciones costeras; A2 y G2= estaciones oceánicas. En julio sólo se presentan muestras de superficie..... | 40 |
| Figura 6. Distribución de la densidad de diatomeas en las estaciones a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez. A1, AAA, G1, Y1= estaciones costeras; A2, G2= estaciones oceánicas. En julio sólo se presentan muestras de superficie..... | 41 |
| Figura 7. Microfotografías de algunos de los géneros de cianobacterias identificados en la Bahía de Mayagüez. <i>Oscillatoria</i> (a), <i>Trichodesmium</i> (b), <i>Chroococcus</i> (c) y <i>Cyanosarcina</i> (d). Fotos tomadas en UPRM-Laboratorio de Microscopía..... | 46 |
| Figura 8. Dendrograma de la abundancia de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez, construida por el coeficiente de similitud de Bray-Curtis..... | 47 |
| Figura 9. Variación espacial y temporal de la concentración de Chl-a en la Bahía de Mayagüez. A1, AAA, G1, y Y1= estaciones costeras; A2 y G2 =estaciones oceánicas..... | 48 |
| Figura 10. Relación lineal entre la concentración de Chl-a y la densidad de cianobacterias y diatomeas..... | 50 |
| Figura 11. Valores máximos del coeficiente de absorción para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas..... | 52 |
| Figura 12. Valores máximos del coeficiente de retrodispersión para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas..... | 54 |
| Figura 13. Valores máximos del coeficiente de atenuación para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Promedio del coeficiente de atenuación vertical (K_d) en las diferentes estaciones de la Bahía de Mayagüez de julio a diciembre 2005..... | 58 |
| Figura 15. Valores del coeficiente de atenuación difusa (K_d) en las diferentes estaciones de la Bahía de Mayagüez, a nivel temporal. La leyenda aplica para todas las gráficas. | 59 |
| Figura 16. Relación entre la concentración de clorofila-a y el coeficiente de absorción (A), y atenuación (B) a 440 nm..... | 63 |
| Figura 17. Análisis de correspondencia de los T-RFs de la comunidad de cianobacterias en cada estación durante el periodo de estudio (a=agosto, s=septiembre, o=octubre y d= diciembre). I, II, III y IV, representan los grupos identificados..... | 68 |
| Figura 18. Árbol filogenético de la librería de clones del 16S rDNA de cianobacterias que representa la comunidad de cianobacterias en las estaciones G2 y AAA construido por el método de “Neighbor-joining”, aplicando como estimador la distancia-p. La escala de la barra indica el número de nucleótidos sustituidos por posición de secuencias. MAAA=clones de la estación AAA. MG= clones de la estación G2. Los números entre paréntesis representan la frecuencia en la que se encontró cada clon (Los números en las ramas representan las pseudoréplicas o “bootstraps”). | 70 |
| Figura 19. Análisis de cobertura para la librería de clones de las dos estaciones de muestro en la Bahía de Mayagüez. MAAA= librería de clones de la estación AAA, MG2= librería de clones de estación G2..... | 73 |
| Figura 20. Curva de Rarefacción de la librería de clones de MAAA y MG2. | 74 |
| Figura 21. T-RFLP de la comunidad de cianobacterias en octubre. Las flechas indican los T-RFs que posiblemente corresponden a <i>Synechococcus</i> identificados mediante el análisis <i>in-silico</i> . Como ejemplo se representan T-RFs únicos (cuadrados), T-RFs comunes en todas las estaciones (rectángulos). MSPM=marcador estandar de peso molecular) (<i>HaeIII</i> , <i>RsaI</i> y <i>MspI</i> =enzimas de restricción. | 76 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez. | 23 |
| Tabla 2. Porcentaje de los diferentes grupos taxonómicos que contribuyen a la densidad total de la comunidad del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez. | 38 |
| Tabla 3. Cianobacterias reportadas en la Bahía de Mayagüez durante los meses de estudio. | 43 |
| Tabla 4. Coeficiente de correlación de Pearson entre la densidad de los diferentes grupos taxonómicos del fitoplancton y la concentración de Chl-a. | 49 |
| Tabla 5. Análisis de variancia de los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación; entre estaciones, y a nivel espacial y temporal ($p < 0.05$)..... | 57 |
| Tabla 6. Profundidad de la zona eufótica (Zeu 490 nm) de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez. | 60 |
| Tabla 7. Coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración de Clorofila-a y los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación. | 62 |
| Tabla 8. Número de T-RFs del 16S rDNA de cianobacterias generados con las tres enzimas de restricción en las estaciones de muestreo (superficie) de la Bahía de Mayagüez, de agosto a diciembre | 66 |
| Tabla 9. Índice de diversidad de la librería de clones del gen 16S rDNA de cianobacterias en las dos estaciones en la Bahía de Mayagüez. | 72 |
| Tabla 10. Análisis <i>in-silico</i> de los T-RFs predichos para las secuencias de los clones de ambas librerías..... | 75 |

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas costeros del Caribe muestran una amplia diversidad de poblaciones fitoplanctónicas. En este grupo, las cianobacterias son reconocidas como un componente importante de la comunidad debido a que contribuyen significativamente a la productividad primaria. En general, las cianobacterias habitan ambientes hipersalinos, marinos y de agua dulce por lo que poseen un hábitat más amplio que los eucariotas fototróficos (Golubic, 1999; Graham y Wilcok, 2000).

Factores ambientales como la concentración de nutrientes, temperatura, luz, oxígeno, entre otros, pueden limitar el crecimiento del fitoplancton y por ende alterar la productividad primaria así como el nivel trófico de un cuerpo de agua. Dentro de estos, la penetración de la luz es un factor importante para entender los procesos fotosintéticos en un cuerpo de agua. En ambientes marinos de muchas regiones tropicales y sobretodo en zonas del Caribe (aguas oligotróficas), existe una alta penetración de la luz. Sin embargo, éstas se ven afectadas constantemente por la descarga de los ríos observándose diversos eventos estacionales que pueden afectar la calidad de la luz en la columna de agua alterando el desarrollo del fitoplancton (Farmer *et al.*, 1993).

Nuevas metodologías permiten monitorear la calidad de luz, la luz emergente, la concentración de clorofila-a, así como la colección *in-situ* de las propiedades ópticas de aguas naturales mediante el uso de instrumentos de percepción remota (Sathyendranath y Platt, 1997). Cambios en las propiedades ópticas son utilizados como herramientas para inferir la concentración de clorofila-a y estimar la productividad primaria. Además percepción remota permite determinar las variaciones espaciales y temporales de la densidad del fitoplancton

aumentando el interés de estimar la concentración de éstos constituyentes en ambientes marinos con medidas de reflectancia de la luz.

Las medidas ópticas (aparentes e inherentes) están determinadas principalmente por tres componentes: materia orgánica disuelta coloreada (CDOM, por sus siglas en inglés), clorofila-a y materia particulada suspendida (Gallegos y Jordán, 2002). Estas propiedades ópticas difieren en magnitud y escala entre aguas costeras y oceánicas (Sosik *et al*, 2001). La clorofila-a, tiene una influencia predominante en las propiedades ópticas del agua en comparación a las sustancias y partículas disueltas (Bricaud y Morel, 1986), por esta razón los modelos bio-ópticos están establecidos generalmente a base de la correlación empírica entre la concentración de clorofila-a y las propiedades ópticas del agua.

Las propiedades ópticas aparentes del agua incluyen: el coeficiente de atenuación difusa (K_d) (tasa de atenuación de la luz en el océano) y la reflectancia que hace referencia al color del océano. Las propiedades ópticas inherentes, que dependen únicamente de los materiales presentes en el agua (fitoplancton y partículas en suspensión), incluyen a los coeficientes de absorción, dispersión, atenuación, y de retrodispersión de la luz en un medio acuático a una determinada longitud de onda (Kirk, 1994; Stramski *et al.*, 2001), los cuales a su vez determinan la intensidad y composición espectral de la luz.

El coeficiente de absorción varía esencialmente de acuerdo a la composición del fitoplancton. En áreas oceánicas, los picos de absorción están dominados por este grupo de organismos, cuya variación ocurre principalmente por cambios en la composición de sus pigmentos, en especial de la clorofila-a, que es su principal pigmento fotosintético (Kirk, 1994, Babin *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2004). Sin embargo, en áreas costeras, además del fitoplancton, la materia orgánica y otras partículas en suspensión contribuyen a los procesos

de absorción, especialmente en zonas donde existe influencia por descarga de los ríos (Kirk, 1994; Sosik *et al.*, 2001; Belzile *et al.*, 2004).

El efecto de dispersión ocurre cuando un fotón interactúa con algún componente del medio haciendo que cambie de su forma original. En aguas costeras, el coeficiente de dispersión es mucho más alto debido a la presencia de materia particulada en suspensión y del fitoplancton. Este proceso puede variar entre los diferentes grupos del fitoplancton (Kirk, 1994, Belzile *et al.*, 2004).

La irradianza (E_d) es otro parámetro importante que provee información acerca de la cantidad de luz disponible para la fotosíntesis. Este factor disminuye de manera exponencial en relación a la profundidad (Kirk, 1994). El fitoplancton es fuertemente afectado por la irradianza debido a su capacidad de absorción (Nelson *et al.*, 1993). En las cianobacterias, la irradianza es un factor muy importante debido a que regula la flotabilidad de aquellas que poseen vesículas de gas. Las vesículas de gas, vienen a ser inclusiones citoplasmáticas que orientan su posición vertical en zonas donde la intensidad de luz sea óptima para la fotosíntesis (Madigan *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas cianobacterias que contienen vesículas de gas como *Trichodesmium* (cianobacteria filamentosa que forma “blooms” en muchos ambientes marinos tropicales y subtropicales) han sido vinculadas con incrementos en la dispersión total, así como el coeficiente de retrodispersión de la luz (Borstad *et al.*, 1992 citado por Subramaniam y Carpenter 1999).

Las cianobacterias, como parte importante del fitoplancton, poseen pigmentos accesorios de la clorofila-a comúnmente denominadas ficobilisomas. Estos pigmentos influyen su nicho ecológico debido a que aumentan el rango de absorción de luz utilizadas para la fotosíntesis, en especial, a longitudes de onda donde la clorofila-a tiene una absorción

baja permitiéndoles así colonizar ambientes donde existe variabilidad en términos de calidad y cantidad de luz (Six *et al.*, 2005).

Dentro de las cianobacterias existe un grupo muy importante, las picocianobacterias (0.2 – 2 μm) frecuentemente de los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus* (Olson *et al.*, 1990). Las picocianobacterias son parte importante del picoplancton y constituyen una proporción significativa de la biomasa y de la productividad primaria en ambientes marinos oligotróficos (Morel *et al.*, 1993). Este grupo también contribuye significativamente a la concentración de clorofila-a. Sin embargo, durante el análisis de clorofila-a convencional en el laboratorio, éstas no son generalmente consideradas debido a que pueden perderse en la etapa de filtración provocando una subestimación de la concentración de clorofila-a real. Se ha calculado que en estaciones oceánicas del Caribe y en las estaciones costeras de la Bahía de Mayagüez, el picoplancton contribuye entre el 9 y 20% a la concentración de clorofila-a (Lee, 2002) y que para propósitos de validación de sensores remotos este grupo algunas veces se estaría obviando.

Grupos de cianobacterias como las picocianobacterias están siendo estudiadas ampliamente por métodos alternos al cultivo e identificación clásica debido a la dificultad de cultivarlas en medios artificiales y a sus diminutos tamaños que limitan ser distinguidas mediante microscopía de luz (Castenholz, 1992; Wacklin, 2006). Por esta razón, muchos investigadores están empleando técnicas moleculares independientes de cultivo para determinar la diversidad de cianobacterias en diferentes ambientes naturales (Valentin *et al.*, 2001).

Muchos de estos trabajos se basan en el estudio de librería de clones del gen 16S rDNA (marcador filogenético de procariotas usado para la identificación y caracterización de

comunidades microbianas) así como el análisis de restricción de polimorfismo de longitud del fragmento terminal (T-RFLP, por sus siglas en inglés) a nivel de comunidades. Ambos proveen un alcance para evaluar y medir los cambios en la estructura de comunidades microbianas (riqueza, diversidad y otros) en respuesta a diferentes variables ambientales (Osborne *et al.*, 2006). En el presente estudio se integraron librería de clones y análisis de T-RFLP del gen 16S rDNA para describir la diversidad así como la variación espacial y temporal de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez.

Considerando que la composición de especies del fitoplancton está relacionada con las propiedades ópticas del océano, el estudio de las poblaciones de cianobacterias y su relación con las propiedades ópticas del agua ofrece la oportunidad de explicar mejor los factores que controlan las propiedades ópticas en la Bahía de Mayagüez.

Las propiedades ópticas en la Bahía de Mayagüez, presentan una alta variabilidad espacial y temporal debido a que está sujeta a la descarga de tres ríos principales (Añasco, Yagüez y Guanajibo). Estos ríos, introducen una alta cantidad de partículas en suspensión, compuestos orgánicos e inorgánicos y nutrientes disueltos (Gilbes, et al, 1996, Rosado, 2000); especialmente en épocas de intensa precipitación, afectándose la penetración de la luz y las poblaciones fitoplanctónicas (Gilbes *et al.*, 1996). Estos cambios podrían producir variadas respuestas fisiológicas en el fitoplancton haciendo que la competencia por la luz y nutrientes influya en las interacciones ecológicas entre los productores primarios. Esta dinámica competitiva entre los miembros del fitoplancton podría explicar la variabilidad observada en las propiedades ópticas de estos cuerpos de agua (Kirk, 1994; Sosick y Mitchell, 1995).

Estudios que establezcan la importancia de las cianobacterias y su efecto en las propiedades bio-ópticas son inexistentes para El Caribe. Por lo tanto, este estudio representa el primer reporte sobre la abundancia, diversidad y, la variación espacial y temporal de las cianobacterias en la Bahía de Mayagüez. La dinámica de las cianobacterias en este ecosistema impacta las propiedades bio-ópticas de la bahía alterando igualmente la señal de reflectancia detectada por sensores remotos.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar la abundancia y distribución de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez y establecer su relación espacial y temporal con las propiedades bio-ópticas.

Objetivos específicos

- Estimar la densidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez.
- Medir las propiedades ópticas inherentes y aparentes en la Bahía de Mayagüez.
- Determinar la relación entre la densidad de cianobacterias y la concentración de clorofila-a.
- Caracterizar la estructura de la comunidad de cianobacterias mediante la construcción y análisis de librería de clones y polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP) del 16S DNA ribosomal de cianobacterias.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cianobacterias

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos que poseen una estructura celular procariótica. Su pared celular es similar al de una bacteria gram negativa (Madigan *et al.*, 2003) y a menudo es delgada y gelatinosa. Las cianobacterias son morfológicamente diversas y pueden ser unicelulares y filamentosas; ambas pueden formar colonias y estar rodeadas por una capa de mucílago. En las colonias, las células y los filamentos están arreglados o agrupados en diferentes formas ya sea radialmente, en planos estrictos o irregularmente. Las formas filamentosas pueden llegar a formar densas capas superficiales o florecimientos (“blooms”) cuando hay un incremento en la temperatura, intensidad de luz y en la concentración de nutrientes principalmente de nitrógeno y fósforo (Mur *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2003)

Diversas cianobacterias marinas desarrollan estrategias que le permiten fijar el nitrógeno y convertirlo en amonio (especialmente en ambientes oligotróficos), actividad que realizan cuando la disponibilidad de nutrientes se encuentra limitada, por lo que son consideradas las principales fijadoras de nitrógeno en ambientes marinos y, por su importante contribución a la disponibilidad de nutrientes para otros grupos fotosintéticos (Carpenter, 1983). La fijación de nitrógeno se lleva a cabo en células vegetativas diferenciadas llamadas heterocistos y es catalizada por la enzima nitrogenasa (Karl *et al.*, 2002). Este proceso es característico de especies filamentosas como *Anabaena* (Madigan, 2003) pero, existen ciertas especies de cianobacterias que carecen de heterocistos como *Trichodesmium*, especie considerada la más abundante y principal fijadora de nitrógeno en ambientes marinos

tropicales y subtropicales (Subramaniam y Carpenter, 1999). Entre otras características morfológicas, algunas cianobacterias desarrollan estructuras como: aquinetos que son utilizadas para la sobrevivencia (células especializadas) cuando se encuentran bajo condiciones de estrés, y hormogonios que son pequeños segmentos de tricomas que varían en longitud y sirven como unidades de propagación (Humm y Wicks, 1980).

Las Cianobacterias se caracterizan por tener clorofila-*a* como pigmento principal, cuyo pico de absorción es a 440 y 680nm. Además, tienen ficobilisomas como: la ficocianina, la aloficocianina y la ficoeritrina. Los ficobilisomas o ficobiliproteínas son pigmentos accesorios a la clorofila-*a* que se encuentran en los tilacoides y están libres en el citoplasma muy cerca de la periferia celular (Mur *et al.*, 1999). Tienen diferentes picos de absorción en el rango de 500 a 630 nm, donde la energía que es absorbida es transmitida a la clorofila-*a* para ser usada en la fotosíntesis (Palenik y Russ, 1999; Rascher *et al.*, 2003).

La flotabilidad en muchas cianobacterias planctónicas, en especial de las formas filamentosas, se debe a la presencia de vesículas de gas. Estos vienen a ser organelos de baja densidad que le permite regular sus movimientos en la columna de agua de acuerdo a la intensidad de luz. A su vez, la flotabilidad esta regulada por la irradiación de la luz y por la concentración de nutrientes. Esto se resume de dos formas: (1) una alta tasa fotosintética (i.e. alta irradiación) incrementa la presión de turgencia celular debido a la acumulación de productos orgánicos de la fotosíntesis haciendo que las vesículas de gas colapsen, (2) contrariamente, bajos niveles de irradiación se reduce la presión de turgencia y permite la formación de vesículas haciéndolas menos densas y otorgándoles mayor flotabilidad (Oliver y Walsby, 1984). La flotabilidad de *Trichodesmium* además de su resistencia a altas presiones hidrostáticas en zonas profundas del mar, dependen estrictamente de la presencia de vesículas

de gas. *Trichodesmium* habita principalmente en aguas superficiales que tienen baja concentración de nutrientes y en condiciones de calma sus filamentos forman florecimientos que pueden ser suficientemente grandes y ser detectadas por percepción remota (Hoffmann, 1999).

La flotabilidad que depende básicamente de las condiciones de luz puede ser una ventaja importante de las cianobacterias en relación a otros organismos del fitoplancton. Estas pueden mantener una tasa de crecimiento superior cuando la intensidad de luz de la radiación fotosintéticamente disponible es baja utilizando poca energía para mantener su estructura y función celular (Källqvist, 1981, citado por Mur *et al.*, 1999). Mientras que, muchas de ellas pueden resistir o ser fotoinhibidas a altas irradianzas (Wacklin, 2006).

Existen muchos trabajos que describen la diversidad de cianobacterias. Sin embargo el estudio de la distribución esta obstaculizado por dificultades en la descripción y reconocimiento de su morfología. La mayoría de cianobacterias identificadas a nivel mundial se presentan en Geitler (1932), en la que se describe cianobacterias mayormente de regiones templadas. Sin embargo, para regiones tropicales, especialmente de hábitat marinos, no están bien reportadas (Hoffmann, 1999).

En contraste a la abundancia de cianobacterias en ambientes de agua dulce, existen pocas especies en ambientes marinos; de las cuales 4 taxones de cianobacterias están presentes en regiones tropicales que hacen una importante contribución ecológica: *Trichodesmium* y *Richelia* (cianobacterias filamentosas), *Synechococcus* y *Prochlorococcus* (picocianobacterias). Mientras que, existen reportes de otros géneros de cianobacterias que parecen no tener importancia dentro del ecosistema marino (Hoffmann, 1999).

Trichodesmium es más abundante cerca de la superficie del agua (Navarro, 1998). En el Caribe y en otras zonas tropicales y subtropicales muestran una máxima abundancia durante el verano, especialmente cuando se observa condiciones de viento en calma. Carpenter y McCarthy (1975) reportaron 17×10^6 cel. *Trichodesmium*/m³ en el Mar Caribe y, dos años más tarde, Carpenter y Price (1977) encontraron 2.7 y 10.3×10^6 cel/m³. Una variabilidad similar se observó en el Pasaje de Mona, donde Carpenter y Price (1977) reportaron $5.33-32.5 \times 10^6$ cel *Trichodesmium*/m³ y, recientemente Navarro (1998) observó que la abundancia de *Trichodesmium* osciló entre 0 a 1×10^6 cel/m³.

Miyazono *et al.*, (1992) estudiaron los cambios estacionales de la densidad poblacional de dos grupos del picoplancton: cianobacterias (que contienen ficoeritrina) y picoeucariotas (dominantes de clorofila) en la Bahía de Iwanai (Japón). La densidad de cianobacterias y los otros grupos del picoplancton oscilaron de 1.4×10^5 a 1.9×10^8 y de 4.0×10^4 a 4.3×10^6 células, respectivamente. Las cianobacterias aumentaron después del florecimiento de diatomeas, tiempo en el cual la concentración de nutrientes disminuyó y la zona eufótica se hizo más profunda. Sólo encontraron correlación significativa entre la abundancia de cianobacterias y la temperatura del agua. Ellos concluyeron que la estratificación del agua así como la profundidad de la zona eufótica son factores que determinan la distribución vertical de las cianobacterias, sugiriendo que la dominancia de cianobacterias en la Bahía de Iwanai está principalmente correlacionada con el sistema de masas de agua de la bahía.

Nagarkar y Williams (1999) encontraron una marcada distribución y abundancia temporal de especies de cianobacterias en la costa tropical de Hong Kong. Ellos observaron mayor número de especies de cianobacterias filamentosas durante el verano, mientras que

Lyngbya y *Oscillatoria spp* estuvieron presentes durante todo el año. Las formas cocoides permanecieron constantes durante todo el año, siendo *Aphanocapsa sesciacensis* la más abundante. *Gloeocapsa spp.* mostró un patrón estacional, siendo más abundante al final del invierno y al inicio del verano. Los valores de clorofila-*a* fueron más altos en invierno que en verano.

De León y Chalar (2001), estudiaron la dinámica y distribución espacial y temporal de la comunidad fitoplanctónica del embalse de Santo Grande (Uruguay) en relación a parámetros abióticos. Reportaron 187 taxones, de los cuales 20 correspondieron a la División Cyanophyta, siendo las formas filamentosas más dominantes que las cocoides. La abundancia de Cyanophyta (*Anabaena planctónica*, *Raphidiopsis mediterranea*) estuvo relacionada con la concentración de clorofila-*a*, a pesar que la concentración de fósforo estuvo muy baja.

Alpine y Cloren (1998) cuantificaron la tasa de crecimiento del fitoplancton en relación al gradiente de intensidad de luz que se presenta en la Bahía de San Francisco (Estados Unidos). Ellos asumieron que el gradiente de intensidad de luz en la Bahía de San Francisco, es el principal factor para el crecimiento de fitoplancton. Con este fin, incubaron muestras de agua exponiéndolas a diferentes intensidades de luz, para luego realizar el conteo y la identificación del fitoplancton. Los resultados mostraron que la tasa de crecimiento cambió espacialmente a lo largo de los gradientes horizontales de disponibilidad de luz, y fue más alto cuando la zona eufótica fue más profunda.

Diversas limitaciones existen en cuanto a la identificación de cianobacterias basado en la clasificación morfológica, en especial de aquellas cianobacterias de morfología simple (Nübel *et al.*,1999). Por esta razón, se han realizado estudios basado en el análisis de secuencias del gen 16S rDNA (marcador filogenético) de cianobacterias provenientes de

muestras ambientales (Nübel *et al.*, 1997 West *et al.*, 2001). Este gen es utilizado como una herramienta molecular para examinar comunidades microbianas. Esta presente en todos los organismos, tiene regiones altamente conservadas así como regiones variables y su tasa de evolución es relativamente baja (Engebretson y Moyer, 2003).

Dentro de estos estudios que se basan en el análisis de gen 16S rDNA, están las técnicas moleculares independientes de cultivo, utilizadas como herramienta para el análisis de la estructura y diversidad de comunidades de cianobacterias. Estas técnicas incluyen, clonación del gen 16S rDNA basada en la construcción de librerías de clones, restricción de polimorfismo de longitud del fragmento terminal (T-RFLP), hibridización fluorescente *in situ* (FISH), gradiente de denaturación en un gel de electroforesis (DGGE) y otros.

Nübel *et al.* (1999) caracterizaron la riqueza y distribución de cianobacterias y diatomeas en una variedad de tapetes microbianos en un sistema salino de Baja California en México, mediante el análisis morfológico y la secuenciación del gen de 16S rRNA de librería de clones a partir de cortes de los tapetes microbianos. Ambos métodos aparentemente revelaron los mismos resultados, sin embargo encontraron que el análisis morfológico detectó una riqueza significativamente menor que el análisis del 16S rDNA. El número de secuencias del 16S rRNA claramente excedió el número de morfotipos identificados. Por lo que sus resultados reflejaron las limitaciones de la clasificación morfológica e indicaron que el análisis de secuencias de ácidos nucleicos es más sensitivo para el estudio de la diversidad ecofisiológica de estos organismos.

El análisis de T-RFLP ha mostrado ser efectivo en determinar la diversidad e identificar diferencias entre comunidades microbianas (Blackwood *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2003). Esta técnica consiste en cuantificar la señal de intensidad de la fluorescencia de los

fragmentos de restricción terminal (T-RF) en un patrón de bandas de una determinada comunidad (Blackwood *et al.*, 2003). El uso de iniciadores marcados fluorescentemente usados durante la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que son homólogos a secuencias altamente conservadas (16S rDNA) permite obtener fragmentos terminales luego de ser digeridos con enzimas de restricción. Después de la digestión enzimática, cada T-RF puede ser definido como una unidad operacional taxonómica (OTU) y a menudo ser inferida como una única población dentro de una comunidad (Engelbreton y Moyer, 2003). El número de T-RFs, es utilizada como una medida de la diversidad y composición de las poblaciones dominantes en la comunidad (Liu *et al.*, 1997; Ouellette y Wilhelm, 2003). Hasta el momento, trabajos relacionados con el uso de T-RFLP para el análisis de comunidades de cianobacterias de ambientes marinos son escasos. Investigaciones previas sólo revelan el uso de T-RFLP para estudiar comunidades bacterianas en sedimentos marinos (Conn y Franco, 2004).

Lopez *et al.* (2003) determinaron la diversidad y la abundancia relativa de cianobacterias asociada a la enfermedad banda negra (BBD) en arrecifes de coral en el Mar Caribe y el Pacífico-Indico, mediante la construcción de librería de clones y análisis de T-RFLP. Los resultados mostraron que al menos tres diferentes taxones de cianobacterias están involucrados en la enfermedad, de las cuales secuencias de 14 clones de cianobacterias de muestras del Caribe (llamadas LR-3L) fueron similares a *Geitlerinema* y *Phormidium* (Orden Oscillatoriales). Mientras que en el Pacífico-Indico se analizaron 11 clones cuyas secuencias mostraron similitud con muchas cianobacterias filamentosas, especialmente con *Trichodesmium* spp. A su vez, dos nuevas secuencias de cianobacterias (CD1C11 y PNG-50)

fueron reportadas en este estudio. El análisis de TRFLP, reveló que estas secuencias fueron las más abundantes en la BBD.

Propiedades Bio-ópticas del agua

Las propiedades ópticas y la radiación solar bajo el agua son de especial interés para investigar los procesos biológicos y dinámicos en un cuerpo de agua (Herleví, 2002). La cantidad y la calidad espectral de la luz que entra en un cuerpo de agua, no sólo varía o se atenúa con la profundidad, también está sujeto a cambios que se producen por la absorción del agua misma, así como la absorción y dispersión de las partículas suspendidas, particularmente el fitoplancton. Todos estos constituyentes determinan el estado bio-óptico del agua, donde la disponibilidad de luz para el fitoplancton en la columna de agua es de diferente calidad espectral en la superficie y a grandes profundidades (Staal y Stal, 2003). En zonas costeras especialmente de los trópicos las intensas precipitaciones producen cambios en la descarga de los ríos afectando importantes parámetros como: salinidad, concentración de nutrientes, atenuación de la luz, y sobretodo en la cantidad de sedimentos suspendidos resultando así en una variación en las propiedades bio-ópticas (Rosado, 2000; Quiñones, 2004-dato no publicado).

Propiedades ópticas Inherentes

Las propiedades de absorción y dispersión de la luz en un medio acuático están determinadas como el coeficiente de absorción (a) y el coeficiente de dispersión (b) a una determinada longitud de onda (λ); la suma de ambas magnitudes es referida como el coeficiente de atenuación c ($c = a + b$), o la fracción de luz incidente que se pierde por ambos

procesos. Estas medidas han sido definidas por Preisendorfer (1961) como propiedades ópticas inherentes, debido a que sus magnitudes dependen únicamente de las sustancias que comprende el medio acuático. El medio acuático tiene un coeficiente total de absorción el cual es la suma de los coeficientes de absorción de todos los componentes o sustancias que absorben luz a una determinada longitud de onda (Kirk, 1994). Se ha observado generalmente que en ambientes marinos las propiedades de absorción y dispersión de estos componentes difieren en magnitud y escala entre las zonas costeras y oceánicas (Sosik *et al.*, 2001).

La absorción de la luz ocurre básicamente cuando un fotón es capturado por una molécula que incrementa su energía a una cantidad correspondiente a la energía del fotón (Kirk, 1994). La absorción de luz en un cuerpo de agua se debe esencialmente a cuatro componentes: los pigmentos del fitoplancton (por ejemplo clorofila-a) y de los macrófitos (biota fotosintética), materia orgánica disuelta coloreada (CDOM-grupo de compuestos que varían en tamaño y composición química) y el agua misma. La clorofila-a del fitoplancton tiene un pico de absorción en la parte azul (430-500 nm) y otro en la parte roja (650 – 680 nm) del espectro electromagnético (Herlevi, 2002; Kirk, 1994; Stramski *et al.*, 2001) mientras que el agua tiene un pico de absorción en la parte roja (Kirk, 1994).

En muchas regiones oceánicas la variabilidad y la distribución de la luz son controladas principalmente por la absorción del fitoplancton y en especial por la concentración de sus pigmentos fotosintéticos (Helsinki, 2002; Millar *et al.*, 2003). Esto depende también de su tamaño y forma celular (Nuñez *et al.*, 2004). Se ha señalado que la absorción de la luz en cianobacterias se ve afectada por la carencia de cloroplastos y por ende por el bajo contenido de clorofila-a (Agusti y Phlips, 1992).

El efecto de dispersión afecta la penetración vertical de la luz y esto ocurre cuando un fotón interactúa con algún componente del medio, de tal forma que este diverge de su forma original, así el fotón dispersado puede estar disponible para la fotosíntesis. En zonas oceánicas no productivas los valores de dispersión son muy bajos, mientras que en zonas costeras es mucho más alto debido a la presencia de sedimentos, materia particulada y el fitoplancton. Niveles altos de ciertas especies de fitoplancton pueden dar lugar a coeficientes de dispersión elevados, sobretodo en áreas oceánicas; y esto depende generalmente de la composición de especies de fitoplancton (Stramsky *et al.*, 2001). Así por ejemplo, las diatomeas dispersan la luz más intensamente debido a la estructura mineralizada (sílice) de su pared celular al igual que las cianobacterias debido a la presencia de las vacuolas de gas (Dubelaar *et al.*, 1987; Kirk, 1994).

Las picocianobacterias considerados los mayores contribuidores a la producción primaria en ambientes oligotróficos (especialmente de regiones tropicales) tienen mucha influencia en las propiedades ópticas de estos ambientes, debido a que sus coeficientes de absorción y dispersión están en relación a su pequeño tamaño y al contenido de sus pigmentos (Moore *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 1993). Así se ha determinado que *Prochlorococcus* tiene un coeficiente de absorción más alto que *Synechococcus* debido a su alta pigmentación, mientras que su tamaño pequeño hace que su coeficiente de dispersión sea más bajo que *Synechococcus* (Morel *et al.*, 1993).

Otro importante parámetro que provee información de la abundancia y distribución de las partículas suspendidas en ambientes marinos es la luz retrodispersada o b_b (Kirk, 1994). Esta se produce cuando un fotón interactúa con una partícula y es dispersada en dirección contraria a la dirección de la luz incidente, de tal forma que aquellos fotones retrodispersados

al salir del océano pueden ser detectados por los sensores ópticos y otorgar información remota (Herleví, 2002; Boss *et al.*, 2004). En efecto, la tasa de la luz retrodispersada puede ser usada para conocer los principales contribuidores de la dispersión de la luz en el agua.

Propiedades ópticas aparentes

El coeficiente de atenuación difusa (K_d) y la reflectancia son consideradas como propiedades ópticas aparentes (Preisendorfer 1961, citado en Kirk, 1994, Sosik *et al.*, 2001). El valor de K_d viene a ser el coeficiente de atenuación para la irradianza descendente (E_d) y es usado para describir la atenuación espectral de la luz en el agua o el estado físicamente bio-óptico del agua. Sus valores dependen de las propiedades ópticas inherentes del agua y están en función a la profundidad y a la distribución de la irradianza (Kirk, 1994; Sarangi *et al.*, 2002). Como resultado de la absorción y dispersión de la luz, E_d disminuye con la profundidad de manera exponencial.

Uno de los parámetros importantes para medir la radiación fotosintéticamente disponible (PAR por sus siglas en inglés) bajo el agua, es el coeficiente de atenuación vertical de PAR o K_d (PAR). El valor de K_d (PAR) no es constante con la profundidad, este es más alto a pocos metros de la superficie del agua y es mas bajo cuando incrementa la profundidad. Este cambio en la tasa de atenuación de la PAR es generalmente observado en muchos ambientes marinos, donde las zonas oceánicas presentan los valores mas bajos debido a la tasa baja de absorción y dispersión; mientras que los valores más altos se encuentran en aguas muy turbias, la cual está relacionada con florecimientos de muchas especies del fitoplancton, cuya absorción cubre básicamente todo el rango de PAR (Kirk, 1994). Se ha reportado que las cianobacterias se benefician a muy bajas intensidades de luz

donde la absorción de la PAR varía ampliamente entre las especies comparado a otras poblaciones fitoplanctónicas (Agusti y Phlips, 1992; Wacklin, 2006).

Hasta la fecha, se han realizado estudios de las propiedades ópticas en la Bahía de Mayagüez, lo cual muestra una alta complejidad debido a la descarga de los ríos que viene a ser el principal factor que regula estas propiedades (Rosado, 2002). Además, otros estudios reportaron que la descarga continua de sedimentos afecta las condiciones de crecimiento del fitoplancton (Gilbes, *et al*; 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Bahía de Mayagüez está localizada al oeste de Puerto Rico e incluye un área de 47 Km² de un total de 100 Km² del complejo de la Bahía Mayagüez-Añasco. El arrecife insular en la Bahía de Mayagüez tiene 5 a 6 Km de ancho y la profundidad del agua hacia el borde del arrecife es de 15 a 25 m (Alfaro, 2002). La Bahía de Mayagüez, recibe la influencia de los ríos Añasco, Yagüez y Guanajibo (Figura 1). Estos ríos representan un aporte considerable de materia orgánica disuelta y sedimentos, especialmente en la época de lluvia (Gilbes *et al.*, 1996). La época de mayor precipitación generalmente se asocia a septiembre mientras la más baja suele ser en mayo (Alfaro, 2002). Además, la Bahía de Mayagüez, recibe el efluente de aguas residuales producto del tratamiento secundario de la Autoridad de Acueductos y Alcantarillados (AAA) de Puerto Rico.

El Río Añasco es el más grande de la costa oeste de Puerto Rico. Su cuenca hidrográfica contiene gran cantidad de materia orgánica en el horizonte superficial (PUTPR, 2006). Al igual que la cuenca del Río Guanajibo, la zona está dedicada a la actividad agrícola, contando con muchas reservas agrícolas. Este río cuenta con una variedad de tributarios que fluye hacia suroeste. Mientras que la cuenca del Río Yagüez está altamente urbanizada e industrializada, y se caracteriza por contener cantidades elevadas de materia orgánica (PUTPR, 2006). Además, esta zona se ve afectada por la descarga de aguas residuales y otras actividades humanas (Gilbes, *et al.*; 1996).

Plan de muestreo

Los muestreos se realizaron mensualmente de julio a diciembre del 2005 en seis estaciones de muestreo: A1, A2, AAA, G1, G2 y Y1 (Figura 1). Las estaciones costeras (A1, AAA, G1 y Y1) se establecieron tomando en cuenta la proximidad a los ríos Añasco (A), Yagüez (Y), Guanajibo (G) y a la descarga de la planta de tratamiento secundaria de la AAA (Tabla 1). Los datos de precipitación (mm^3) y el caudal de los ríos (m^3/s), que descargan en la bahía fueron obtenidos del “United States Geological Survey” (USGS- www.usgs.gov, datos de julio a diciembre del 2005)

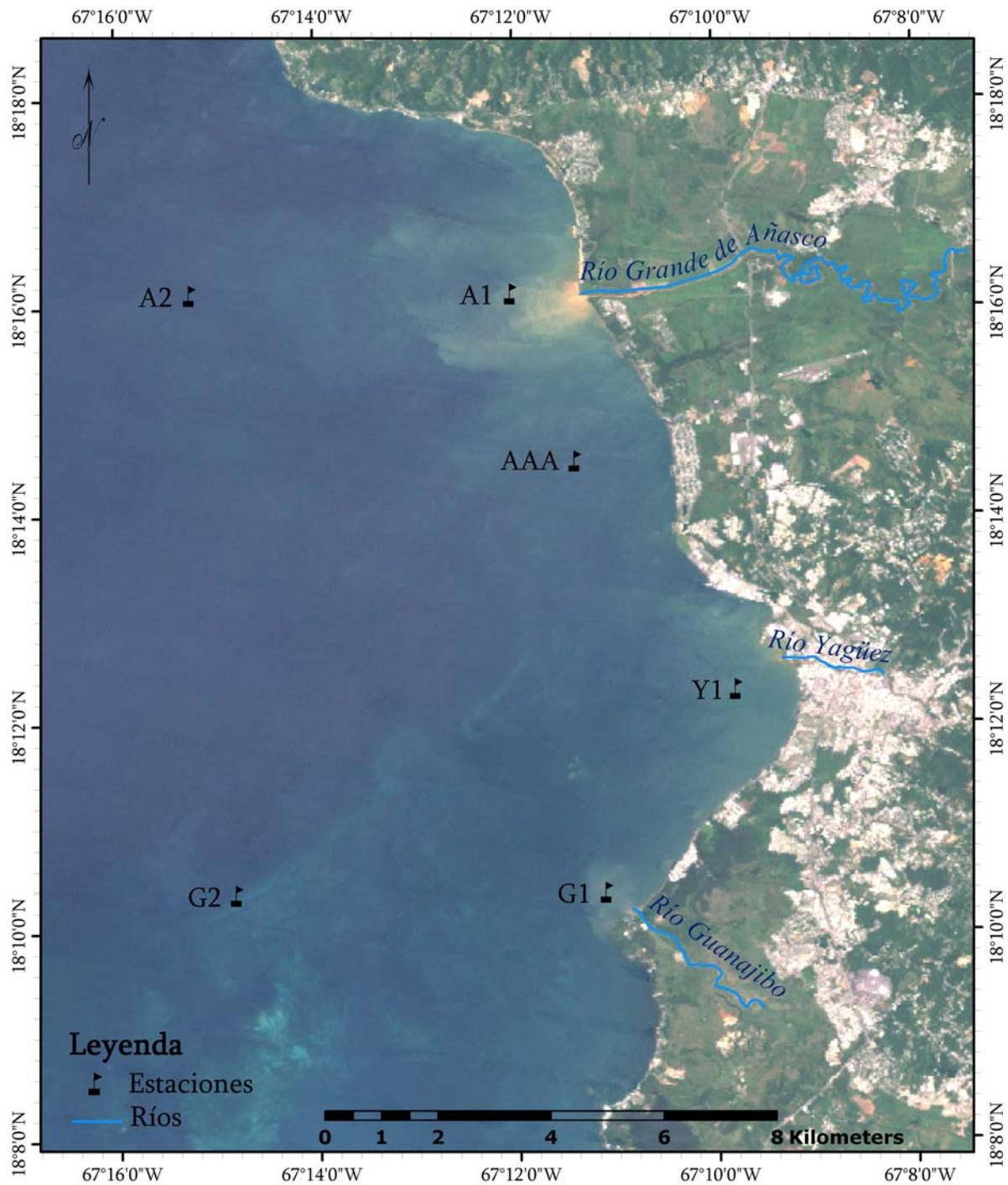


Figura 1. Ubicación de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez

Tabla 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez.

| | Estación | Latitud | Longitud | Descripción | Profundidad media (m) |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|--|------------------------------|
| Costeras | A1 | 18° 16.00' | 67 ° 12.00' | Cercana a la desembocadura del Río Añasco | 3.0 |
| | AAA | 18° 14.40' | 67 ° 11.40' | Cercana al efluente planta de tratamiento AAA-PR | 5.0 |
| | G1 | 18° 10.25' | 67 ° 11.10' | Cercana a la desembocadura del Río Guanajibo | 5.0 |
| | Y1 | 18° 12.20' | 67 ° 09.78' | Cercana a la desembocadura del Río Yagüez | 3.0 |
| Oceánicas | A2 | 18° 16.00' | 67 ° 15.20' | Lejana a la desembocadura del Río Añasco | 12.0 |
| | G2 | 18° 10.25' | 67 ° 14.80' | Lejana a la desembocadura del Río Guanajibo | 3.0 |

Colección de muestras

Para el análisis cuantitativo de fitoplancton, en cada estación se colectaron siete litros de agua con una bomba de extracción a dos profundidades: superficie (a un metro por debajo de la superficie) y profundidad media de cada estación. Estas muestras se filtraron en el lugar de muestreo a través de una malla de 20 µm de diámetro. La biomasa atrapada en el filtro fue resuspendida en 50 ml de agua de mar de cada estación, previamente filtrada e inmediatamente fue fijada con 4% de glutaraldehído de concentración final. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y se almacenaron a temperatura ambiente.

Las muestras para el análisis de clorofila-a en cada estación, fueron colectadas por triplicado en botellas ámbar de 250ml. Estas se mantuvieron en refrigeración hasta su transporte al laboratorio.

Enumeración del Fitoplancton

El conteo de cianobacterias así como de cada grupo del fitoplancton se realizó en una cámara de conteo celular Sendgwick Rafter. En ésta se colocó una alícuota de 1 ml de la muestra fijada en glutaraldehído previamente homogenizada y se dejó en reposo por un máximo de 5 minutos. El conteo se realizó en un Microscopio de Luz a 100X de magnificación contando un total de 30 campos ópticos. Durante el conteo de cianobacterias se consideró a una célula, colonia o filamento como un solo organismo. Las colonias y filamentos estaban rodeadas por mucílago. Para calcular la abundancia (número de células por mililitro) de cada grupo taxonómico se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Cell/ mL} = \frac{N \times 1.000 \text{ mm}^3}{A \times D \times F}$$

Donde:

N: número total de células contadas

A: área del campo óptico contado (1. 766 mm²)

D: profundidad del campo óptico (1 mm profundidad de la cámara de Sendgwick Rafter).

F: número de campo óptico contados

Identificación de cianobacterias

Los diferentes morfotipos de cianobacterias presentes fueron observadas y fotografiadas (Cámara Spot Insight Color, Modelo 3.2.0) en el microscopio Confocal de rastreo (Fluo ViewTM 300 Confocal Microcope-Olimpus, USA) y en el de contraste de interferencia

diferencial de Nomazky (Olympus BH2 RFCA). Las mismas fueron identificadas usando el sistema de clasificación de Komarek y Anagnostidis: Chroococcales (1999) y Komarek y Anagnostidis: Oscillatoriales (2005). Para la identificación se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: diámetro y longitud de las células vegetativas y terminales, longitud total del filamento; morfología de las células terminales, presencia o ausencia de heterocisto, vesículas de gas y de mucílago; formación de colonias y contenido celular. Finalmente se estimó el índice de diversidad Shannon-Weiner (H') y Simpson's (D) (Figura 3).

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Donde:

p_i = Proporción de individuos de la especie i : n_i / n

n_i = Número de individuos del taxón i ésimo

n = Número total de individuos en la muestra ($\sum n_i$)

$$D = \sum p_i^2$$

Donde:

p_i = Proporción de individuos de la especie i : n_i / n

n_i = Número de individuos del taxón i ésimo

n = Número total de individuos en la muestra ($\sum n_i$)

Se utilizó el índice de Bray Curtis para medir la similitud de la abundancia de cianobacterias entre estaciones mediante el análisis de agrupamiento. El análisis se realizó en el programa estadístico PAST (PALaeontological STatistics) (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

Determinación de clorofila-a

El análisis de clorofila-a (Chl-a) a nivel de superficie y profundidad en cada estación se determinó en oscuridad filtrando 250 ml de agua mediante una bomba de vacío, a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 0.7 μm y 47 mm de diámetro. Para la extracción de Chl-a, el filtro se colocó en un tubo de 15 ml y se adicionó 10 ml de 100% metanol dejando incubar a 4°C por un máximo de 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra fue centrifugada a 3,500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo de 15 ml. Las lecturas de fluorescencia de la Chl-a en el sobrenadante se realizaron en un fluorómetro TD-700 de Turner Desings (Welshmeyer, 1994), previamente calibrada con soluciones estándares de Chl-a (Sigma Aldrich Cat.# C5753). Finalmente, la concentración de Chl-a en $\mu\text{g/L}$ de cada muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{Chl-a } (\mu\text{g/L}) \text{ no corregida x vol. extracción (L)}}{\text{Volumen de muestra filtrada (L)}}$$

Propiedades Bio-ópticas

Las medidas de las propiedades bio-ópticas fueron tomadas en las mismas seis estaciones de la Bahía de Mayagüez. Estas medidas fueron hechas en la columna de agua hasta un máximo de 150 metros usando una Roseta Bio-óptica (Figura 2). En estaciones de poca profundidad las medidas se realizaron hasta cerca del fondo. La Roseta utilizada contiene diversos instrumentos oceanográficos y bio-ópticos que permiten medir las propiedades ópticas a diferentes longitudes de onda y por cada segundo. Los perfiles de

absorción (a) y atenuación (c) se midieron en nueve longitudes de onda (412, 440, 488, 510, 532, 555, 650, 676 y 715 nm) con el sensor AC-9 (WetLabs) y las medidas de retrodispersión de la luz (b_b) fueron tomadas a seis longitudes de onda (442, 470, 510, 589, 620 y 671 nm) con el sensor HydroScat-6 (Hobi Labs). La irradianza (E_d) se midió a seis longitudes de onda (412, 443, 491, 510, 664, 684 nm) usando el radiómetro OCR-507 (Satlantic). La profundidad, la temperatura y la salinidad se midieron con un CTD SBE-19 (SeaBird). Todos los datos, se almacenaron en una memoria interna que luego del muestreo fueron transferidos directamente a la computadora.

El coeficiente de atenuación difusa (K_d) en cada estación se calculó a 412, 443, 491 y 684 nm; tomando en cuenta las medidas de E_d a dos profundidades, z_1 y z_2 , utilizando la siguiente ecuación (Kirk, 1994; Morel, 2001):

$$K_d = \frac{1}{z_1 - z_2} \ln \frac{E_d(z_1)}{E_d(z_2)}$$

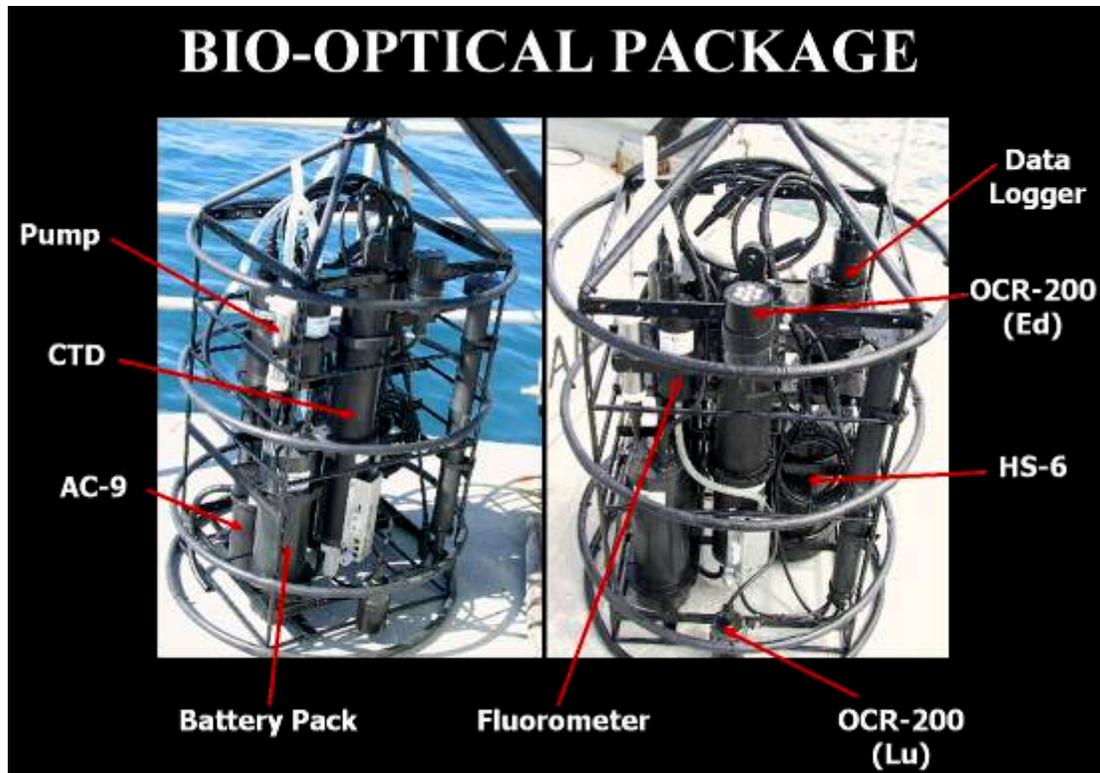


Figura 2. Roseta Bio-óptica utilizada para obtener las medidas de las propiedades ópticas y oceanográficas en la Bahía de Mayagüez.

Estructura de la comunidad de cianobacterias mediante análisis del 16S ADN ribosomal.

El estudio de la comunidad y diversidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez se realizó mediante el análisis de T-RFLP y la construcción de librería de clones (Figura 3). En éste caso, se colectó un litro de agua a nivel de superficie en botellas ámbar de 1 L estériles y fueron transportadas al laboratorio en refrigeración.

Extracción de ADN de la comunidad microbiana

Utilizando una membrana de policarbonato estéril de 0.2 μm se filtró 1 L de agua. Los filtros se cortaron en pedazos pequeños de aproximadamente 0.5 cm^2 , se colocaron dentro de

un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se adicionó 100 µL de TES (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8, Sacarosa 25%). La muestra fue homogenizada por agitación en un vortex (aproximadamente 2 min para resuspender las células retenidas en el filtro). La lisis celular se realizó con 40 µl de lizosima (5 mg/ml), 40 µl de EDTA (0.25 M) y nuevamente se mezcló con vortex para incubar la suspensión a 37°C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 175 µl de H₂O destilada, 50 µl SDS (10%) y 5 µl de RNAasa; luego de mezclar con vortex, ésta suspensión se incubó a 37°C por 20 minutos. Para completar el proceso de lisis celular, se añadió 10 µl de Proteinasa K (Promega[®]) y se incubó nuevamente a 37°C por 30 minutos. A esta mezcla se le añadió 85 µl de TE (sin sacarosa) y 120 µl de NaCl, se homogenizó y se incubó a 65°C por 20 minutos. Para precipitar proteínas y debris celular se añadió 75 µl de Acetato de Potasio y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces dejando incubar a 4°C por 15 minutos. Finalmente, el extracto celular fue colectado luego de centrifugarse a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante (que contiene el ADN total) fue centrifugado a 14,000 rpm por 5 minutos en repetidas ocasiones hasta no observar proteínas ni debris celular en el fondo del tubo.

Para precipitar completamente el ADN se utilizó etanol al 95% y se dejó incubar a 4°C toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente. El tubo conteniendo el ADN se lavó con etanol al 70%, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos adicionales. Finalmente el sobrenadante fue descartado y el ADN fue resuspendido en 30 µl de TE, pH 8.0 (Sambrook y Russell,1989).

La concentración de ADN fue estimada en una gel de 1% agarosa utilizando como marcador a Lambda cortada con la enzima *HindIII*.

Polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción del 16S rADN (T-RFLP) de cianobacterias.

Amplificación del gen 16S rADN (PCR)

El DNA de cada estación fue utilizado para amplificar el 16S ADN ribosomal (rADN) de sólo las cianobacterias. Para lograr esta amplificación selectiva se utilizaron los siguientes iniciadores (“primers”): 27F-IR700 marcado fluorescentemente en el extremo 5’ terminal con IR700 por LI-COR, Inc (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’) y una mezcla equimolar de 781Ra (5’-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3’) y 781Rb (5’-ACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3’) (Nübel *et al.*, 1997). La reacción de amplificación se llevó a cabo en una reacción total de 25 µl y consistió en: 5 µl del buffer de reacción de la Taq polimerasa (10X), 3.0 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de BSA (10 mg/ml), 1.25 µl de DMSO (20%), 1.0 µl de una mezcla de dNTP’s (2.5mM de cada uno en una proporción 1:1:1:1), 0.75 µl del iniciador 27F (1.0 pM/µl) y 0.75 µl del iniciador 781Rayb (40pM/ µl), 100 ng de DNA ambiental, 0.25 µl de la enzima Taq polimerasa (2.5 U) y agua desionizada estéril dependiendo de la cantidad de ADN utilizado. La amplificación se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 y se siguieron los siguientes parámetros: un paso inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos que consistieron en 94°C por un minuto, 55°C por 1.30 minutos de apareamiento, 72°C por 1.30 minutos y un periodo de extensión final a 72°C por 3 minutos. Para minimizar apareamientos inespecíficos de los iniciadores, la Taq polimerasa se añadió a la reacción después del primer paso de denaturación (adaptado del protocolo de Nubel *et al.*, 1997). Todo el proceso se llevó a cabo en oscuridad.

Las muestras amplificadas fueron reveladas en un gel de agarosa al 1 % en 1X de Tris-acetato-EDTA (TAE), utilizando como marcador molecular pGEM cortado con las enzimas *HindIII*, *RsaI* y *SinI*.

Los productos del PCR de 16S rADN de cianobacterias (correspondiente a cada estación) fueron digeridos con las enzimas de restricción *HaeIII*, *MspI* y *RsaI* en una reacción total de 10 µl. Cada reacción de digestión consistió en: 0.5 µl de cada enzima (10U/µl), 1.0 µl del amortiguador enzimático (10X) correspondiente a cada enzima y agua desionizada estéril dependiendo de la cantidad del producto de PCR utilizado. La digestión se realizó a 37°C durante 4 horas seguida de un proceso de inactivación de las enzimas a 65°C por 10 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de oscuridad.

Para el análisis de la restricción del fragmento terminal, las muestras de la digestión fueron procesadas en un Analizador de NEN[®]DNA LI-COR Biosciences Modelo 4300 (LI-COR Inc) y visualizadas en una gel de acrilamida a una concentración de 6.5 % y 0.25 mm de grosor, preparada con 150 µl de Persulfato de Amonio al 10% y 20 ml de TEMED al 15% con un tiempo de polimerización de 2 horas aproximadamente. Para la separación de los fragmentos, 1 µl de cada digestión se mezcló con la solución IR2 (en una proporción 1:1) que contenía formamida desionizada al 10% (LI-COR Bioscience). Seguidamente las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 4 minutos y transferidas inmediatamente a 4°C previo a la electroforesis. Antes de procesar las muestras y para eliminar impurezas (urea) y crear una temperatura uniforme en todo el gel, se realizó una pre-corrída a 1500 Voltios y 40 mA por 20 minutos usando el buffer TBE 1X (KB^{Plus}-LI-COR). Terminada la pre-corrída, se cargó un total de 1.0 µl de cada muestra desnaturalizada en la gel, utilizando un marcador de peso

molecular de 50-700 pb (KB^{Plus}-LICOR) en los carriles extremos e intermedios. La corrida se realizó durante 4 horas utilizando los mismos parámetros de la pre-corrída.

Análisis estadístico de T-RFLP

Después de la electroforesis, el tamaño (pares de bases) de los fragmentos de restricción terminales (T-RFs, por sus siglas en inglés) observadas en cada estación, y la intensidad de la emisión de fluorescencia (altura de los picos) fueron analizados con el programa Gel-Pro Analyzer. Como una medida de la abundancia relativa de cada T-RF se utilizó la altura de los picos. La abundancia relativa de cada fragmento terminal fue normalizada dividiendo la altura de cada pico por la altura total de todos los picos dentro de una muestra.

Para comparar los cambios en la comunidad de cianobacterias a nivel espacial y temporal, se realizó un Análisis de Correspondencia en el programa estadístico PAST, considerando la abundancia relativa de los T-RFs generados por las tres enzimas de restricción. Para el análisis, sólo se tomaron en cuenta fragmentos entre 50-700pb. El análisis de correspondencia produce una gráfica de las muestras a lo largo de dos o más ejes de referencia (dimensiones) que contienen una fracción del total de la variabilidad. Las muestras con comunidades similares se agrupan en la gráfica multidimensional, mientras que datos dispersos representan mayor variabilidad entre las comunidades (Ayala *et al.*, 2004).

Clonación del gen 16S ADN ribosomal de cianobacterias

Para el análisis de clones del 16S ADN ribosomal de cianobacterias se eligieron dos estaciones de muestreo: una costera (AAA) y otra oceánica (G2) correspondientes a la

superficie del agua del mes de septiembre. Para la clonación del gen 16S rADN de cianobacterias, los productos de PCR fueron amplificados utilizando el iniciador universal de bacterias 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y una mezcla equimolar de los iniciadores CYA781Ra y CYA781Rb. La reacción de amplificación consistió en: 5 µl de amortiguador de la enzima Taq polimerasa (10X), 3.0 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de BSA (10mg/ml), 1.25 µl de DMSO (20%), 2.0 µl de una mezcla de dNTP's (2.5mM de cada uno en una proporción 1:1:1:1), 0.5 µl del iniciador 8F (50 pM/ µl), 0.5 µl del iniciador CYA781Ra y b (40 pM/ µl), 100 ng de ADN total, 0.25 µl de la enzima Taq polimerasa (2.5 U) y agua desionizada estéril para completar el volumen total a 25 µl. La amplificación se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 y se siguieron los mismos parámetros descritos anteriormente. Los productos de PCR amplificados (aproximadamente 800 pb) se purificaron de acuerdo a las instrucciones de Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up system (Promega[®]).

Una vez purificados, estos fueron clonados en el vector pGEM-T, siguiendo las instrucciones de pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega[®]). Luego 100 µl de cada transformación fueron esparcidos en un medio Luria Bertani (LB) agar que contenían X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-B-D-galactopiranosidasa), IPTG (isopropil-B-D-galactopiranosidasa) y 50 mg/ml de ampicilina (1ml/ 1L de medio). Después de la incubación a 37°C por aproximadamente 18 horas, se seleccionaron aleatoriamente un total de 25 a 28 clones de cada librería genómica. Cada clon seleccionado fue purificado en un medio LB agar conteniendo 50 mg/ml de ampicilina. La amplificación del inserto (16S rADN) se realizó por PCR de colonia. Cada colonia o clon se resuspendió en 100 µl de caldo LB mas ampicilina (50 mg/ml). Seguidamente se llevó a ebullición (90-100°C) por 3-5 minutos, se tomó 1.0 µl

del sobrenadante (ADN) y se añadió a un volumen de 50 µl de reacción total de PCR conteniendo: 5 µl de amortiguador de la enzima Taq polimerasa (10X), 6.0 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de BSA (10mg/ml), 1.0 µl de una mezcla de dNTP's (2.5mM de cada uno en una proporción 1:1:1:1), 1.0 µl del iniciador T7 (50 pM/µl) (5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'), 1.0 µl del iniciador SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa (2.5 U) y 34 µl de agua desionizada. La amplificación se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 y se siguieron los siguientes parámetros: 95°C por un minuto seguido por 30 ciclos que consistieron en 94°C por un minuto, 52°C por un minuto, 72°C por 2 minutos con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Secuenciación de los clones y análisis filogenético

Los productos de PCR de los clones de cada librería fueron purificados de acuerdo a las instrucciones de Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up system (Promega[®]) y se revelaron en una gel de agarosa al 1%. Las concentraciones de cada producto de amplificación se determinaron en relación al marcador de peso molecular Lambda cortado con *HindIII* y *EcoRI*. Cada producto amplificado (50 ng/ µl) fue enviado a la compañía Macrogen en Korea (<http://www.macrogen.com>) para la secuenciación del ADN utilizando T7 como iniciador.

Para realizar una identificación preliminar, las secuencias de cada clon fueron analizadas con la base de datos disponibles en el programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) y para la detección de secuencias quiméricas se utilizó "Chek-Chimera" disponible en "Ribosomal Database" (RDB: <http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>). Seguidamente las secuencias fueron copiadas en el programa FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) para limpiar y

corregir cualquier error en el formato de las secuencias antes de ser alineadas. Las secuencias fueron alineadas en el programa ClustalW desarrollado en el programa Editor de alineamiento de secuencias-BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) utilizando la base de datos de las secuencias del gen 16S rADN disponibles en “Greengenes” (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>). El análisis de cluster y la generación del árbol filogenético se realizó en el programa MEGA 3.1 (<http://www.megasoftware.net>).

Se calculó los índices de diversidad de Shannon-Weiner (H), Simpson's (D), índice de Jackard (estimador de riqueza de filotipos), SChao, SAce y el número de filotipos o unidades taxonómicas operacionales (OTU's), de cada librería fueron calculados utilizando DOTUR (<http://plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotar.html>). Además, se estimó el índice de cobertura de ambas librerías mediante el programa ASLO (Limnology and Oceanography; Methods: <http://www.aslo.org/lomethods/free/2004/0114.html>).

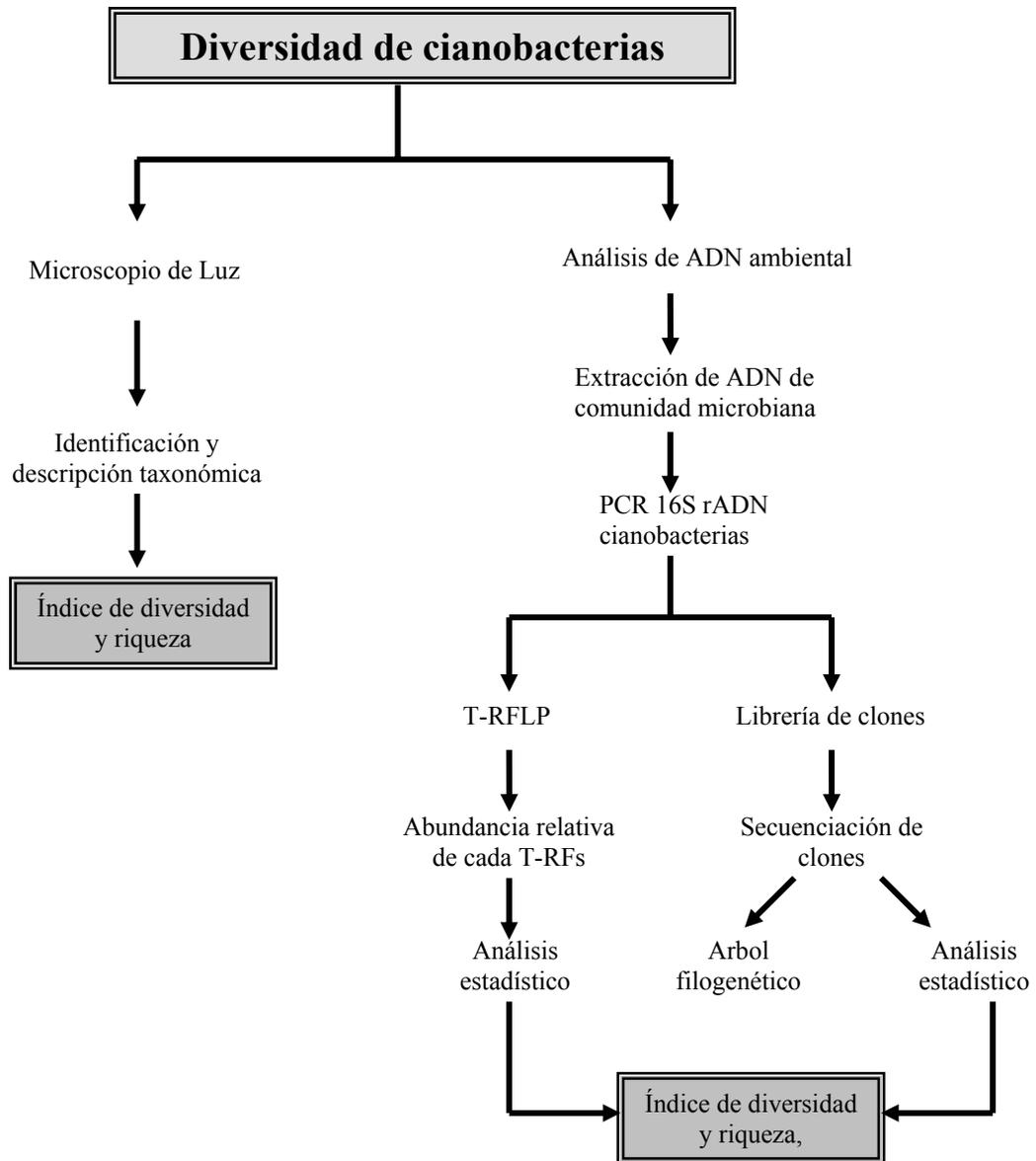


Figura 3. Análisis de la diversidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez.

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia ($p < 0.05$) de la abundancia de cianobacterias y diatomeas, concentración de clorofila-a, propiedades bio-ópticas (absorción, atenuación y restrodispersión de la luz), así como de temperatura y salinidad a nivel espacial (estaciones) y temporal (meses). Debido a la falta de normalidad, algunos datos fueron transformados a $\log_{10}(x+1)$.

Posteriormente, para observar el grado de dependencia entre variables se realizó un análisis de correlación de Pearson. La abundancia de cianobacterias y diatomeas se correlacionaron con la concentración de clorofila-a y con las medidas de absorción, atenuación y retrodispersión de la luz. Todos los tratamientos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico de Infostat (versión 2006e-1).

RESULTADOS

Abundancia de Fitoplancton

La comunidad del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez estuvo representada por cuatro divisiones taxonómicas: Ochrophyta (diatomeas), Pyrrophyta (dinoflagelados), Chlorophyta (algas verdes) y cianobacterias. El grupo dominante durante el estudio fueron las diatomeas, representando el 83.4% del total de fitoplancton, mientras el grupo menos abundante fueron las cianobacterias representando el 3.6% (Tabla 2). La figura 4, muestra la composición y la variación de la densidad de fitoplancton a nivel temporal.

Tabla 2. Porcentaje de los diferentes grupos taxonómicos que contribuyen a la densidad total de la comunidad del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez.

| GRUPO | PORCENTAJE (*) |
|------------------------|----------------|
| Ochrophyta (diatomeas) | 83.4 |
| Cianobacteria | 3.6 |
| Pyrrophyta | 8.4 |
| Chlorophyta | 4.5 |
| Total | 99.9% |

(*) Promedio de la densidad de ambas profundidades.

Los meses de menor densidad de cianobacterias fueron julio (5.76 cel/ml) y diciembre (2.56 cel/ml), mientras que el mes con mayor densidad fue agosto (19.41cel/ml). Se observó que las estaciones costeras (A1, AAA, G1, y Y1) presentaron valores ligeramente más altos que las estaciones oceánicas (A2 y G2). La estación G1 registró la densidad más alta de

cianobacterias con un máximo de 16.52 cel/ml en agosto; seguida de G2, que registró 6.58 cel/ml en septiembre. La estación Y1 alcanzó la densidad mas baja (0.88 cel/ml) durante el periodo de estudio (Apéndice 1). Según los resultados de ANOVA, la densidad de cianobacterias no presentó diferencias significativas a nivel de superficie y profundidad ($p=0.85$) y a nivel temporal ($p=0.161$). Sin embargo, a nivel espacial mostró diferencias significativas ($p=0.02$) (Apéndice 2, 3 y 4). Tomando en cuenta que la densidad de cianobacterias no fue significativa a nivel de superficie y profundidad, los análisis se realizaron con el promedio de ambos valores. La figura 5 muestra la distribución de la densidad de cianobacterias en las estaciones a nivel temporal.

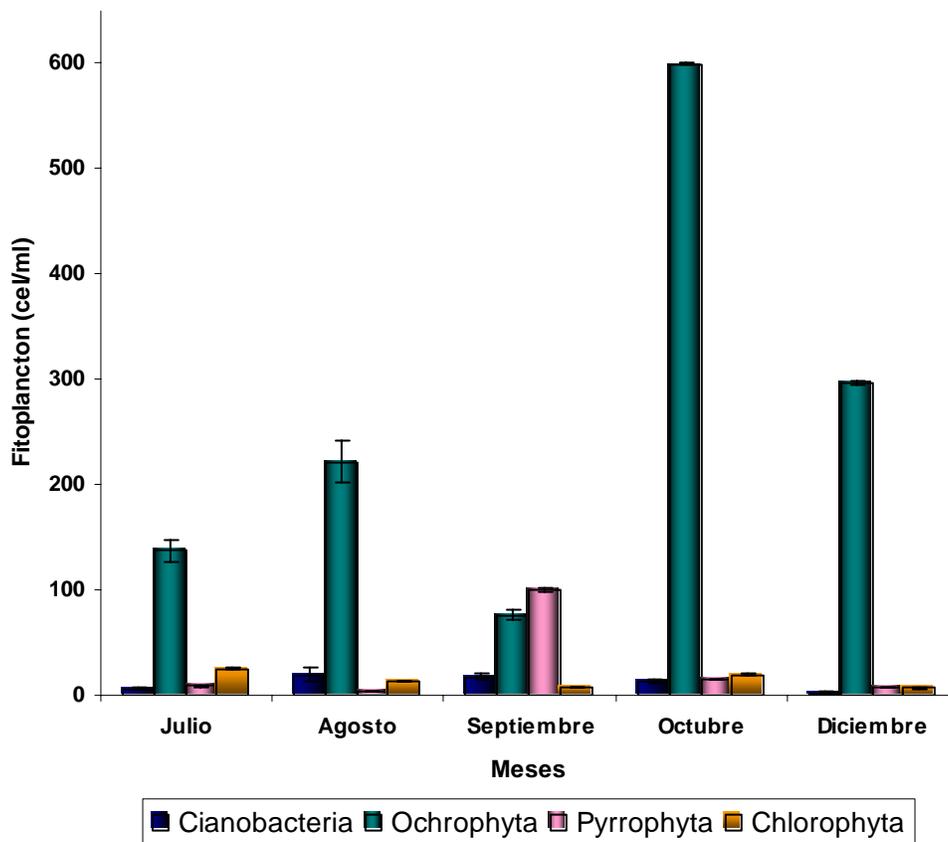


Figura 4. Composición y densidad de la comunidad del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez.

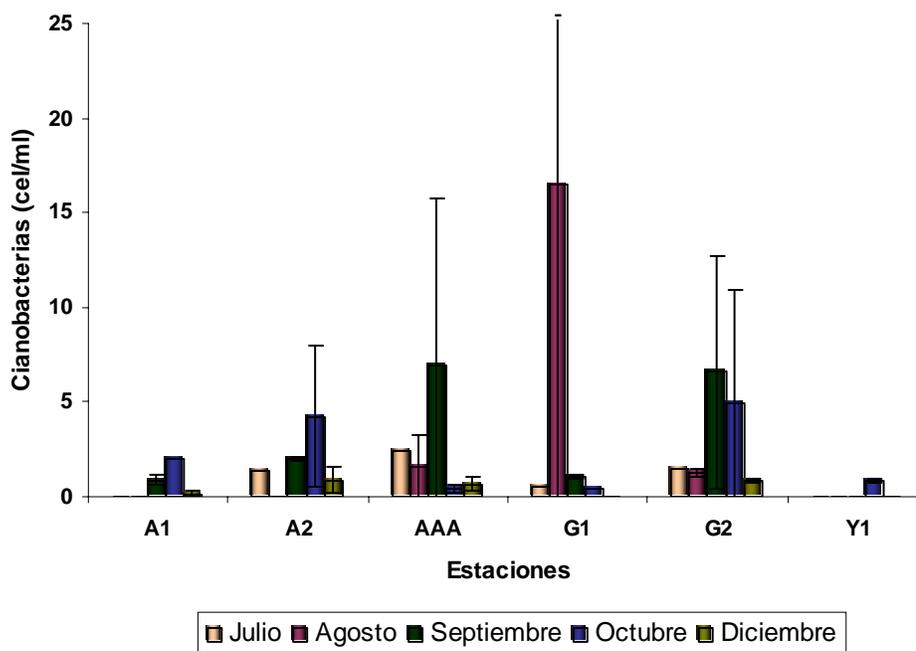


Figura 5. Distribución de la densidad de cianobacterias en las estaciones a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez. Promedio de superficie y profundidad. A1, AAA, G1, Y1= estaciones costeras; A2 y G2= estaciones oceánicas. En julio sólo se presentan muestras de superficie.

Con respecto a la densidad de diatomeas, los meses de menor densidad se registraron en julio (137.06 cel/ml) y septiembre (76.38 cel/ml), y el más alto en octubre (599.85 cel/ml) (Figura 4). A nivel espacial los valores más bajos se registraron en las estaciones oceánicas y las más altas en las costeras. La estación G1 y Y1 registraron la densidad más alta con un máximo en octubre de 129.29 y 140.04 cel/ml, respectivamente (Apéndice 5). La figura 6 muestra la distribución de la densidad de diatomeas para las diferentes estaciones a nivel temporal. Los resultados de ANOVA indican que la densidad a nivel de superficie y profundidad ($p=0.751$) y a nivel estacional ($p=0.144$) no presentaron diferencias significativas; mientras que si hubo diferencias significativas a nivel temporal ($p < 0.001$) (Apéndice 6, 7 y 8).

La abundancia de Pyrrophyta y Chlorophyta, fueron relativamente similares durante el periodo de estudio. Sin embargo, en septiembre Pyrrophyta alcanzó su máxima densidad (100 cel/ml) en relación a los otros grupos taxonómicos (Figura 4).

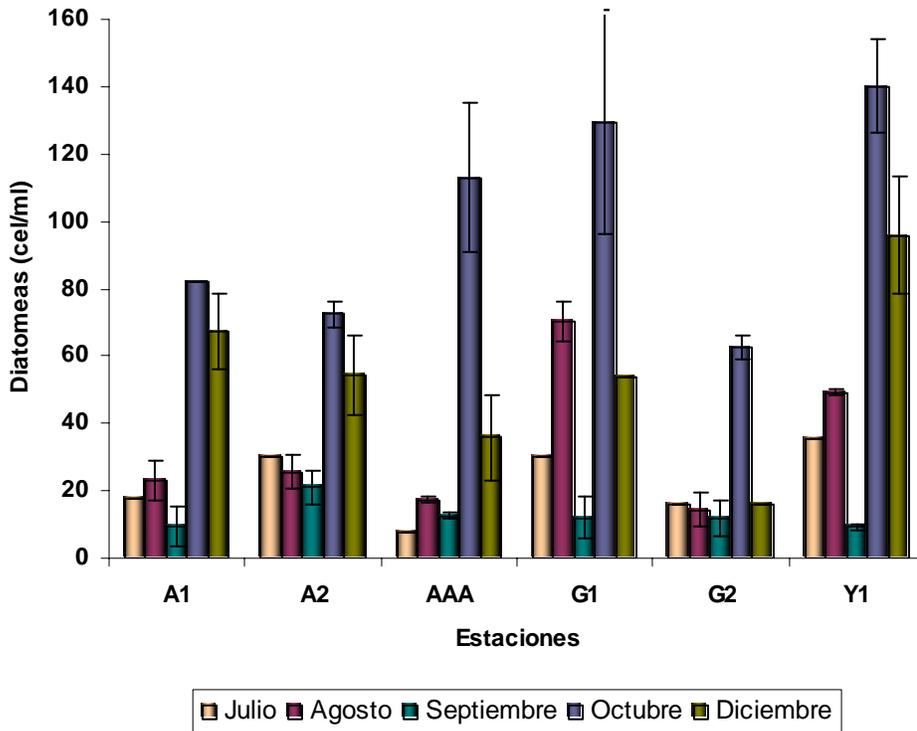


Figura 6. Distribución de la densidad de diatomeas en las estaciones a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez. A1, AAA, G1, Y1= estaciones costeras; A2, G2= estaciones oceánicas. En julio sólo se presentan muestras de superficie.

Identificación de cianobacterias

Se identificaron ocho géneros de cianobacterias entre filamentosas y cocoides, cuya descripción taxonómica son listados en la Tabla 3. Las formas filamentosas estuvieron presentes en todas las estaciones, mientras que las formas cocoides sólo se observaron en las estaciones oceánicas. Los géneros dominantes fueron *Trichodesmium* y *Oscillatoria*, y entre

otros se encontraron a: *Spirulina*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Cyanosarcina*, *Chroococcus* y *Merismopedia* (Figura 7). *Cyanosarcina* y *Chroococcus* se reportaron únicamente en las estaciones A2 y G2.

Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Weiner y Simpson's, tomando en cuenta el número de géneros de cianobacterias encontradas por estación en la Bahía de Mayagüez. El índice de Shannon-Weiner fue de 0.37 y el índice Simpson's fue de 0.17. A su vez, para comparar la similitud de cianobacterias entre estaciones, se realizó un dendrograma utilizando el coeficiente de Bray Curtis. En dicho análisis se observa la formación de dos grupos. Un grupo formada por las estaciones A1, G1 y Y1 las cuales se diferencian de las estaciones A2, AAA y G2. Se puede observar que las estaciones más similares fueron A2 y G2 (Figura 8).

Tabla 3. Cianobacterias reportadas en la Bahía de Mayagüez durante los meses de estudio.

| Morfotipo | Descripción | Género | Orden |
|------------------|---|---------------------|---------------|
| A | <p>Colonias microscópicas, planas con muchas células arregladas en columnas perpendiculares y envueltas por una capa de mucílago. Células esféricas de 3-6.5 μm de diámetro, con contenido verde-azul.</p> <p>Distribución. Especies marinas, de agua dulce, distribuidas en regiones tropicales</p> | <i>Merismopedia</i> | Chroococcales |
| B | <p>Células esféricas verde azules, rodeadas por una envoltura mucilaginosa. División celular en al menos tres planos. Algunas veces forman aglomeraciones celular, pero nunca en columnas.</p> <p>Distribución. Especies marinas, de agua dulce, distribuidas en regiones tropicales.</p> | <i>Chroococcus</i> | Chroococcales |
| C | <p>Células esféricas, ovals o irregularmente redondas, de 5-7 μm de diámetro. Rodeadas de una delgada capa de mucílago y usualmente empaquetadas. Colonias irregulares, arregladas en paquetes tridimensionales en colonias viejas.</p> <p>Distribución. Especies marinas y de agua dulce</p> | <i>Cyanosarcina</i> | Chroococcales |

| | | | |
|----------|--|----------------------|-----------------|
| D | <p>Filamentosas sin heterocisto, usualmente formando colonias (florecimientos) o algunas veces solitarias. Tricomas sin mucílago, rectas o curvadas de 6-15µm de ancho. Células isodiamétricas o algunas mas largas que anchas, de 6-22 µm de ancho. Células apicales ligeramente anchas y redondeadas, generalmente verde-pardo. Protoplasma finamente granular con aerotopos (vesículas de gas) dispersos irregularmente.</p> <p>Distribución. Especies marinas u oceánicas, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, mar del Caribe, Mediterraneo, Islas Canarias y el Mar Rojo.</p> | <i>Trichodesmium</i> | Oscillatoriales |
| <hr/> | | | |
| E | <p>Filamentos rectos o ligeramente curvados. Tricomas cilíndricos con mucílago, constreñidas y no constreñidas. Células generalmente mas cortas que anchas, algunas veces isodiamétricas, sin aerotopos.</p> <p>Distribución. Muy variable, presente en diversos ecotipos (marinos y de agua dulce), particularmente en regiones tropicales.</p> | <i>Lyngbya</i> | Oscillatoriales |
| <hr/> | | | |
| F | <p>Tricomas cortos a largos, cilíndricos helicoidalmente anillado (con espacio entre ellos) de 0.3-7.5 µm de ancho; verde azules, verde-oliva, pardas o verde grisáceas. No constreñidas. Células isodiamétricas o mas largas que anchas; sin aerotopos. Células apicales redondeadas o semiesféricas.</p> <p>Distribución. Agua dulce y marina, distribuida en regiones templadas y</p> | <i>Spirulina</i> | Oscillatoriales |

tropicales.

- G** Tricoma cilíndrico, ligeramente curvada, de 2.5-11 μm de ancho, no constreñidos o ligeramente constreñidos. Verde azules a violetas. Tallo expandido, delgada, fasciculado en especies marinas. Células isodiamétricas o mas largas o cortas que anchas. Células apicales agudas (puntiagudas), estrechas o redondeadas. Protoplasma con gránulos dispersos, sin aerotopos.

Phormidium Oscillatoriales

Distribución. Agua dulce y marina.

- H** Tricomas generalmente solitarios, cilíndricos, rectos o ligeramente curvados, mayor a 6.8 μm de ancho (por encima de 70 μm), usualmente constreñidos y sin mucílago. Células cortas discoidales, más cortas que anchas. Células apicales redondeadas, convexas con protoplasma granular y sin aerotopos.

Oscillatoria Oscillatoriales

Distribución. Ampliamente distribuidas a nivel mundial en ambientes de agua dulce y marinos

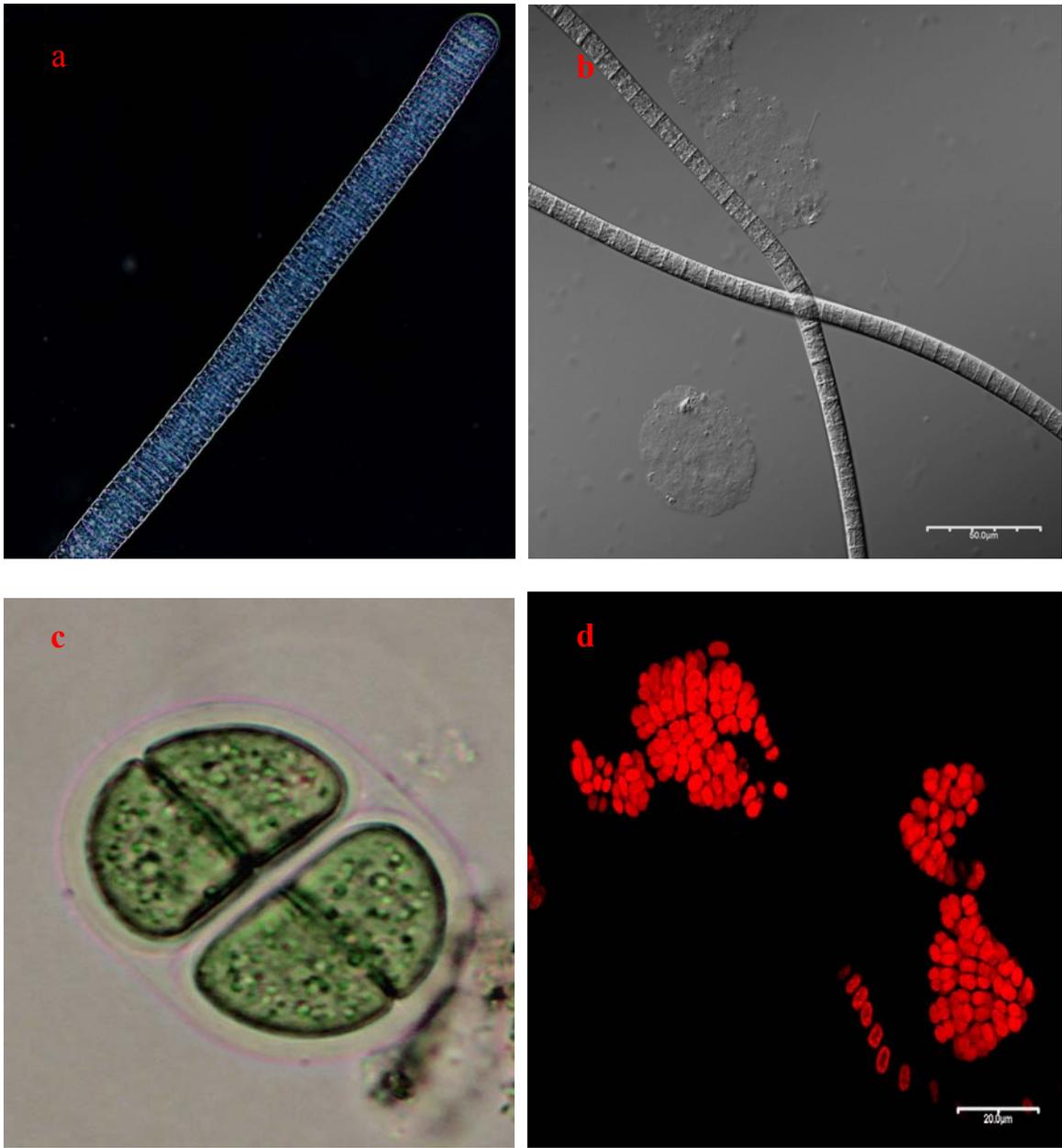


Figura 7. Microfotografías de algunos de los géneros de cianobacterias identificados en la Bahía de Mayagüez. *Oscillatoria* (a), *Trichodesmium* (b), *Chroococcus* (c) y *Cyanosarcina* (d). Fotos tomadas en UPRM-Laboratorio de Microscopía.

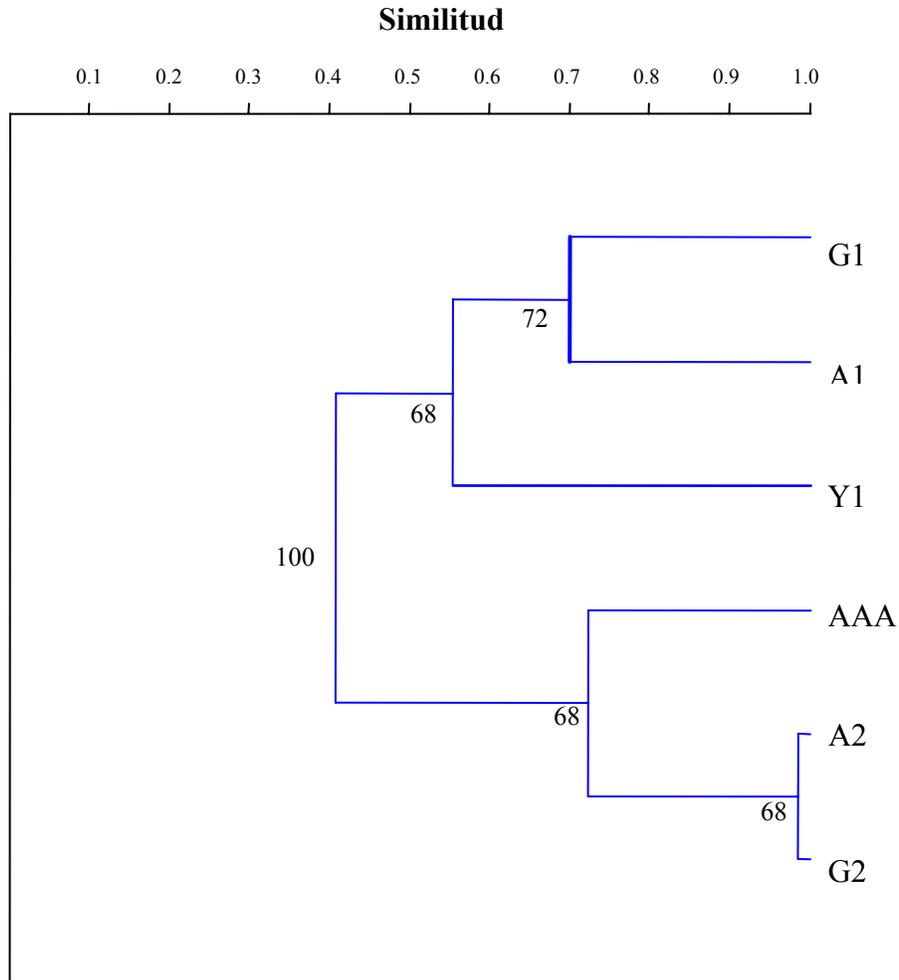


Figura 8. Dendrograma de la abundancia de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez, construida por el coeficiente de similitud de Bray-Curtis.

Determinación de Clorofila-a

Los valores más altos de Chl-a se registraron en octubre en todas las estaciones de muestreo, alcanzando el valor máximo G1 con 1.47 $\mu\text{g/L}$, seguida de Y1 que registró 1.21 $\mu\text{g/L}$. Mientras que la más baja fue en A2 con 0.08 $\mu\text{g/L}$, concentración que fue registrada en septiembre (Apéndice 9). En general, los resultados muestran que las concentraciones más bajas de Chl-a se encontraron en las estaciones oceánicas y las más altas en las costeras (Figura 9). Según resultados de ANOVA, no existen diferencias significativas en la

concentración de Chl-a a nivel de superficie y profundidad ($p=0.32$), mientras que si existe diferencias significativas a nivel temporal y espacial ($p=0.001$ y $p=0.001$, respectivamente) (Apéndice 10, 11 y 12). Tomando en cuenta que la concentración de Chl-a, no fue significativa a nivel de superficie y profundidad, los análisis se realizaron con el promedio de ambos valores

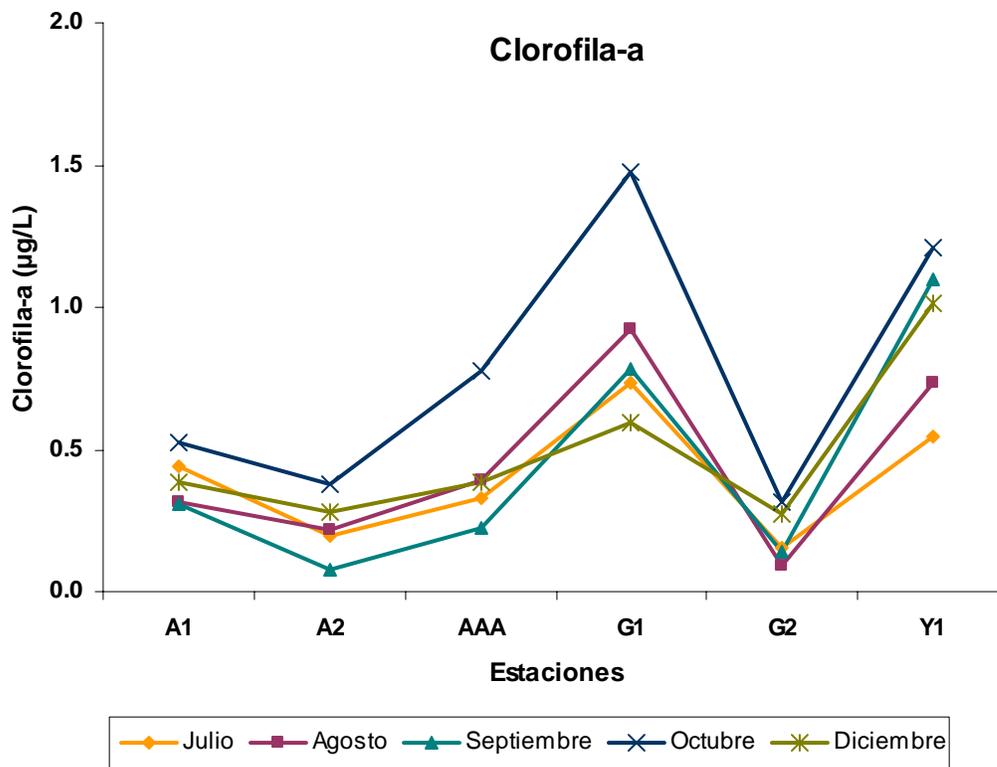


Figura 9. Variación espacial y temporal de la concentración de Chl-a en la Bahía de Mayagüez. A1, AAA, G1, y Y1= estaciones costeras; A2 y G2 =.estaciones oceánicas.

La correlación entre la abundancia de cianobacterias y Chl-a, fue negativa ($r = -0.26$, $p = 0.04$), en comparación a la abundancia de diatomeas que mostró una correlación lineal positiva ($r = 0.57$, $p < 0.001$) (Figura 10). Pyrrophyta y Chlorophyta no mostraron ninguna correlación significativa con Chl-a (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficiente de correlación de Pearson entre la densidad de los diferentes grupos taxonómicos del fitoplancton y la concentración de Chl-a.

| Variables | r | p<0.05 |
|----------------------------|----------|------------------|
| Cianobacterias - Chl-a | -0.26 | 0.04 |
| Diatomeas - Chl-a | 0.57 | <0.001 |
| Pirrophyta - Chl-a | 0.15 | 0.26 |
| Chlorophyta - Chl-a | 0.23 | 0.08 |
| Total Fitoplancton – Chl-a | 0.71 | <0.001 |

r=Coeficiente de correlación
Chl-a= Clorofila-a

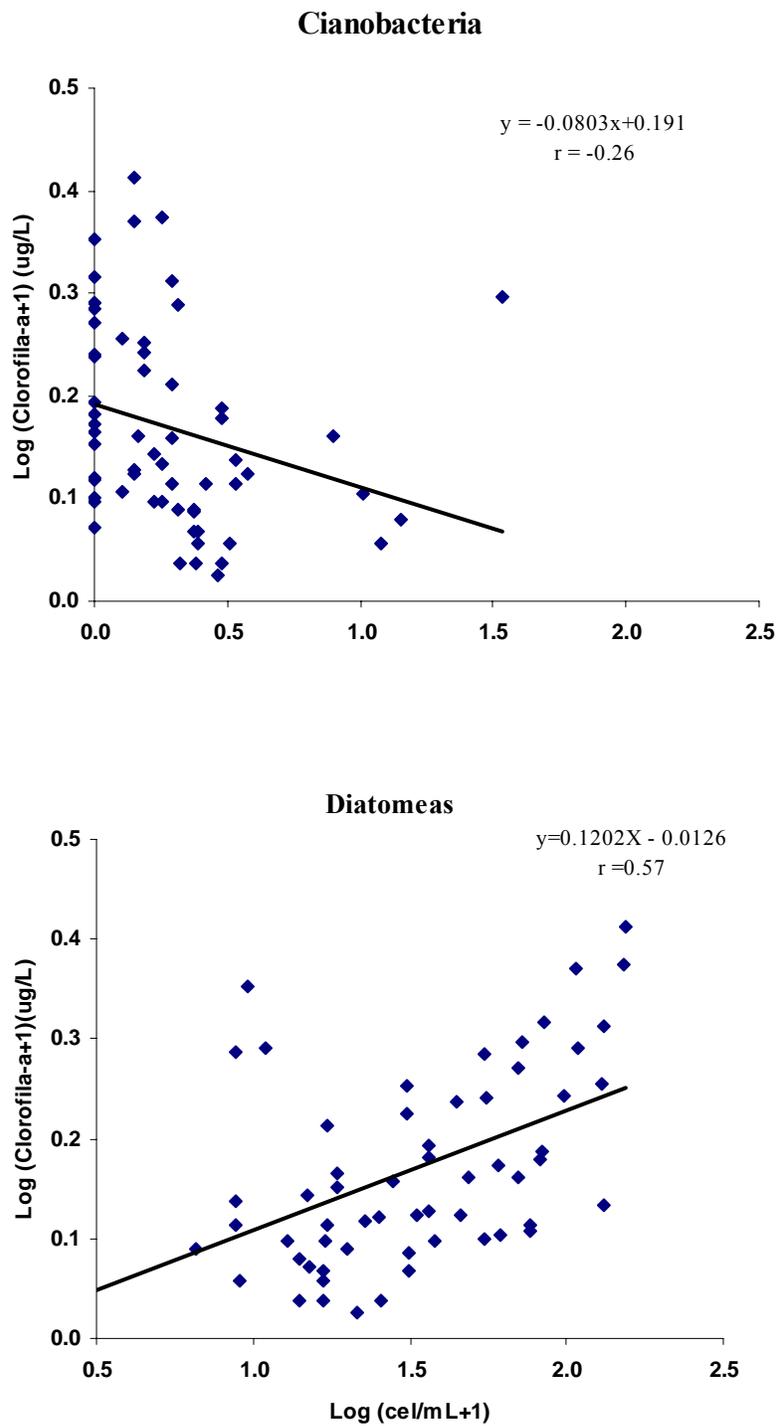


Figura 10. Relación lineal entre la concentración de Chl-a y la densidad de cianobacterias y diatomeas.

Propiedades Bio-ópticas

Coefficiente de Absorción (a)

A nivel de superficie, G2 presentó los valores mas bajos de absorción durante los meses de estudio en todas las longitudes analizadas (412, 440, 488 y 676 nm), cuyos valores mínimos se registraron en agosto y osciló entre $0.04-0.09\text{m}^{-1}$. Sin embargo en octubre se observó un aumento y osciló entre $0.07-0.15\text{m}^{-1}$. Los valores más altos se registraron en G1 en todo los meses de estudio, alcanzando valores máximos en agosto entre $1.56 - 3.22 \text{ m}^{-1}$, en todas las longitudes analizadas (Figura 11). Sin embargo, en septiembre, se observó que A1 registró los valores más altos de absorción que las otras estaciones en un rango de $0.21-0.43 \text{ m}^{-1}$.

A nivel de profundidad A2 y G2, presentaron los valores más bajos de absorción en todos los meses de estudio, mientras que los más altos se registraron en G1, cuyos valores máximos fueron en diciembre, entre $2.27-4.14 \text{ m}^{-1}$, en todas las longitudes analizadas (Figura 11). En general, las estaciones costeras mostraron una máxima absorción a 412 nm, las mismas disminuyeron a medida que aumentaba la longitud de onda. Este comportamiento no se observó en las estaciones oceánicas, los valores de absorción se mantuvieron relativamente constantes a mayores longitudes de onda. Este patrón se observó para ambas profundidades. Según los resultados de ANOVA, el coeficiente de absorción, no mostró diferencias significativas entre profundidades, mientras que hubo diferencias significativas a nivel espacial y temporal (Tabla 5).

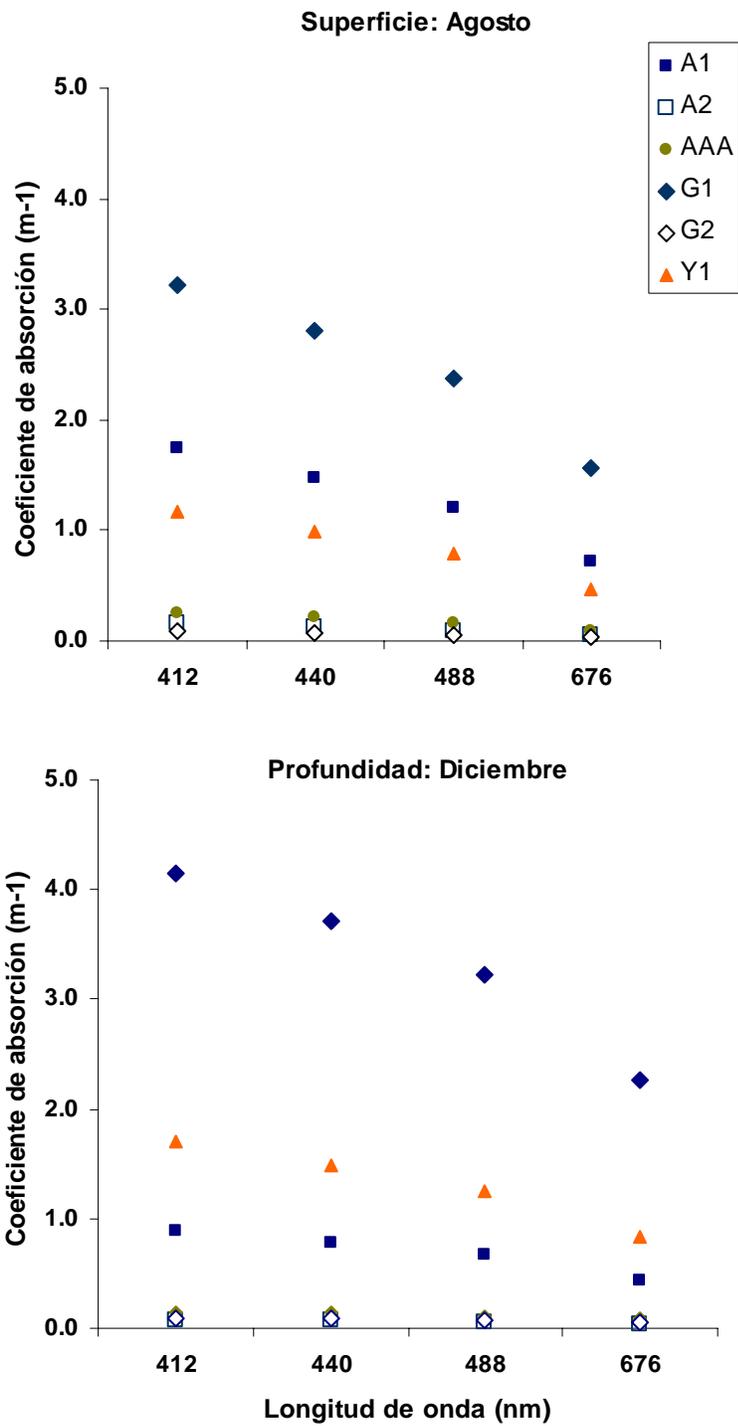


Figura 11. Valores máximos del coeficiente de absorción para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas.

Coefficiente de Retrodispersión (b_b)

Se observó que a nivel de superficie, las estaciones A2 y G2, alcanzaron los valores más bajos del coeficiente de retrodispersión durante el periodo de estudio, en todas las longitudes analizadas (442, 470 y 671 nm). Mientras que los más altos se registraron en G1 en todos los meses de estudio, con excepción de septiembre, de éstas agosto registró los valores más altos en todas las longitudes de onda y osciló entre 0.17-0.22 m^{-1} (Figura 12). En septiembre, A1 registró los valores más altos que las otras estaciones, en todas las longitudes analizadas, alcanzando valores de 0.13-0.17 m^{-1} .

Así mismo, a nivel de profundidad, A2 y G2 registraron los valores más bajos durante el periodo de estudio y los más altos se registraron en G1, alcanzando su valor máximo en agosto entre 0.20-0.33 m^{-1} en todas las longitudes analizadas (Figura 12). El coeficiente de retrodispersión no presentó diferencias significativas entre profundidades, según resultados de ANOVA; mientras que si encontró diferencias significativas a nivel espacial y temporal (Tabla 5).

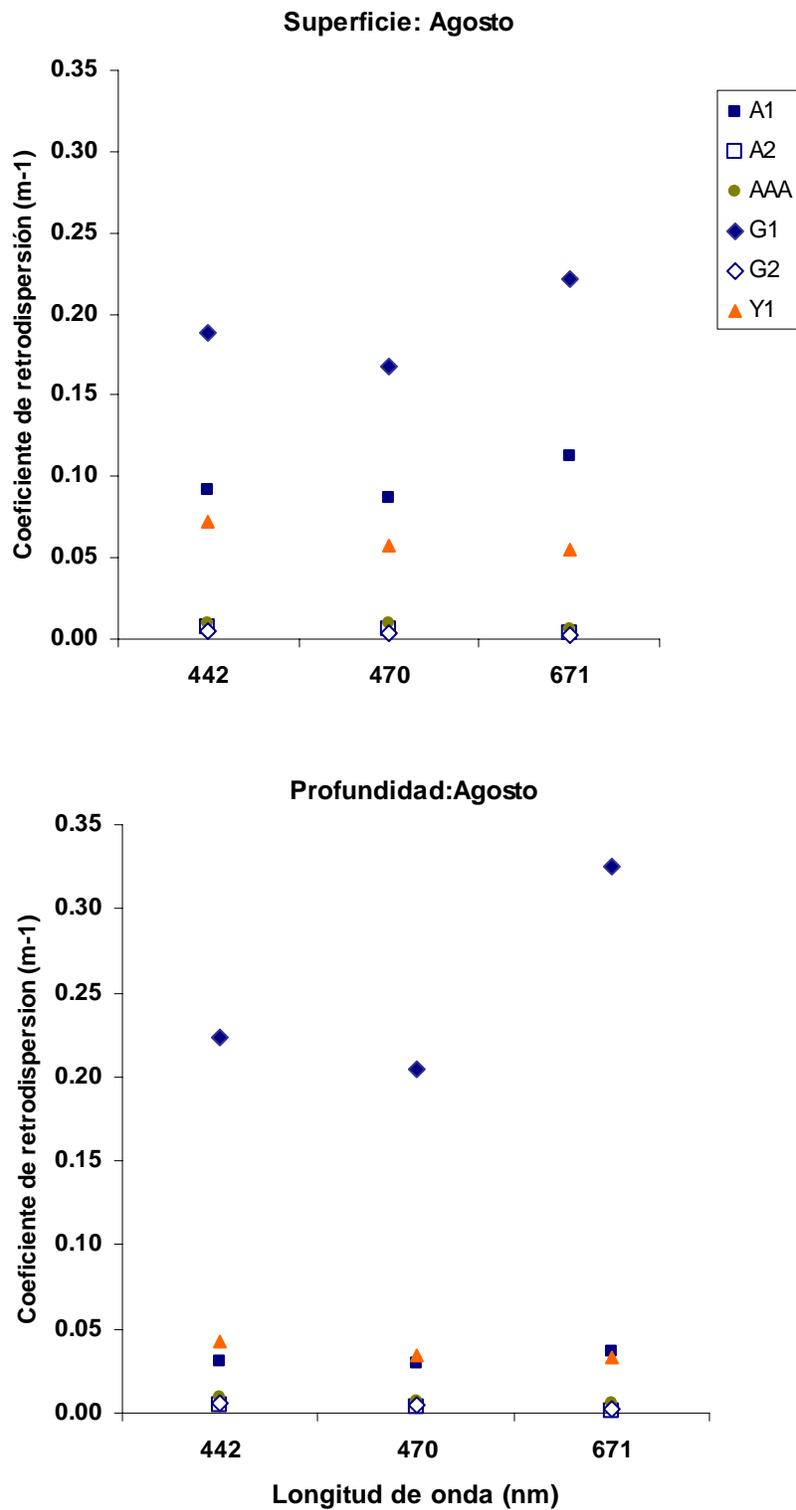


Figura 12. Valores máximos del coeficiente de retrodispersión para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas.

Coefficiente de Atenuación (c)

El coeficiente de atenuación a nivel de superficie, fue más bajo en A2, G2 y AAA durante los meses de estudio, en todas las longitudes analizadas (412, 440, 488 y 676 nm). Los más altos se registraron en G1, alcanzando su valor máximo en agosto en un rango de 7.20-9.18 m^{-1} (Figura 13). No obstante, en septiembre, los valores de atenuación disminuyeron en G1, observándose los más altos en A1, en un rango de 6.19-8.14 m^{-1} , en todas las longitudes analizadas.

A nivel de profundidad, el coeficiente de atenuación más baja se encontró en A2 y G2, durante los meses de estudio en todas las longitudes de onda. Los más altos se registraron en G1, cuyos valores máximos se registraron en diciembre, en todas las longitudes de onda en un rango de 10.54-12.03 m^{-1} (Figura 13). No obstante, en septiembre, los valores más altos se observaron en Y1, en todas las longitudes de onda, oscilando entre 4.19-5.40 m^{-1} . En general, se observó que los coeficientes de atenuación fueron más bajos a 676nm, y los más altos a 412 nm, en todo el periodo de estudio. La prueba de ANOVA encontró diferencias significativas entre profundidades, a nivel temporal y espacial (Tabla 5). Se observó que los coeficientes de atenuación en las estaciones costeras fueron más altos en a nivel de profundidad que en superficie.

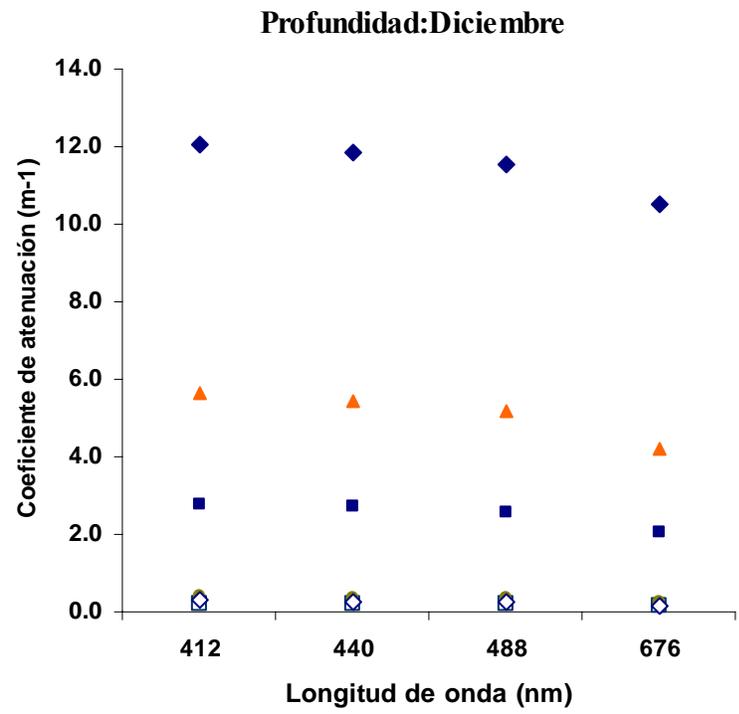
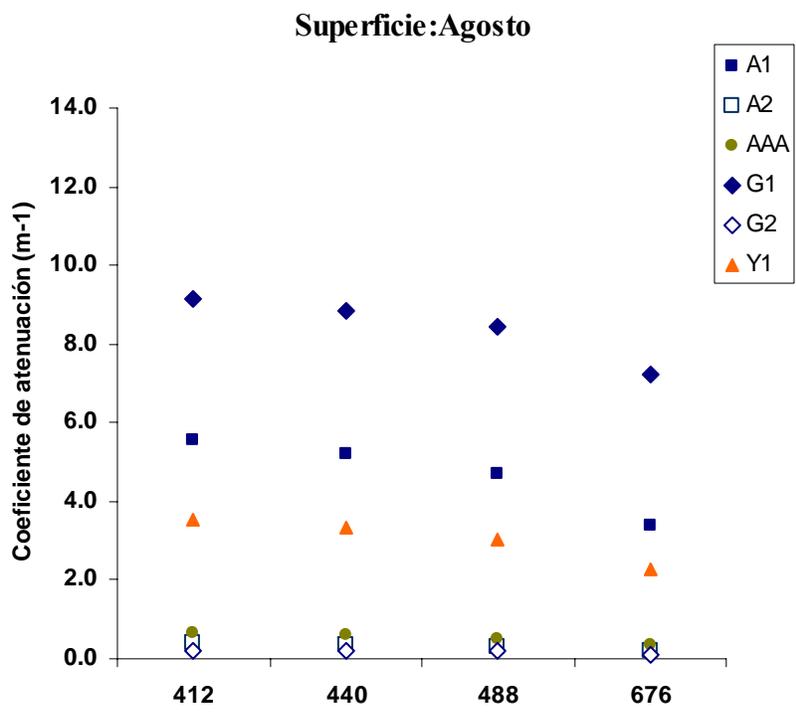


Figura 13. Valores máximos del coeficiente de atenuación para las dos profundidades de muestreo en la Bahía de Mayagüez. La leyenda aplica para las dos gráficas.

La variación de las propiedades bio-ópticas inherentes a nivel de superficie y profundidad, a nivel espacial y temporal se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de variancia de los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación; entre estaciones, y a nivel espacial y temporal ($p < 0.05$)

| Variable | Profundidad | Espacial | Temporal |
|-----------------|-------------|----------|----------|
| Absorción | N.S. | S. | S. |
| Retrodispersión | N.S. | S. | S. |
| Atenuación | S. | S. | S. |

NS=no significativo
S = significativo

Coefficiente de atenuación difusa (K_d)

El coeficiente de atenuación difusa (K_d) fue calculado tomando en cuenta los valores de E_d a dos profundidades. En este caso los valores de K_d se calcularon a 412, 443, 491 y 684nm. El más alto se registró en G1, mostrando mayor variabilidad que las otras estaciones, en todas las longitudes analizadas (Figura 14). Sus promedios mas altos fueron $1.20 \pm 0.92 \text{ m}^{-1}$ a 412 nm y $1.28 \pm 0.84 \text{ m}^{-1}$ a 684 nm; alcanzando valores máximos en agosto (2.72 m^{-1}) y septiembre (2.43 m^{-1}), respectivamente (Figura 15). En general y durante todos los meses de estudio, las estaciones costeras mostraron mayor atenuación a 412 y 443 nm disminuyendo ligeramente a 684 nm. Sin embargo, en las estaciones oceánicas se observó que K_d fue menor a 412 y 443 nm y aumentó a 684 nm (Figura 15).

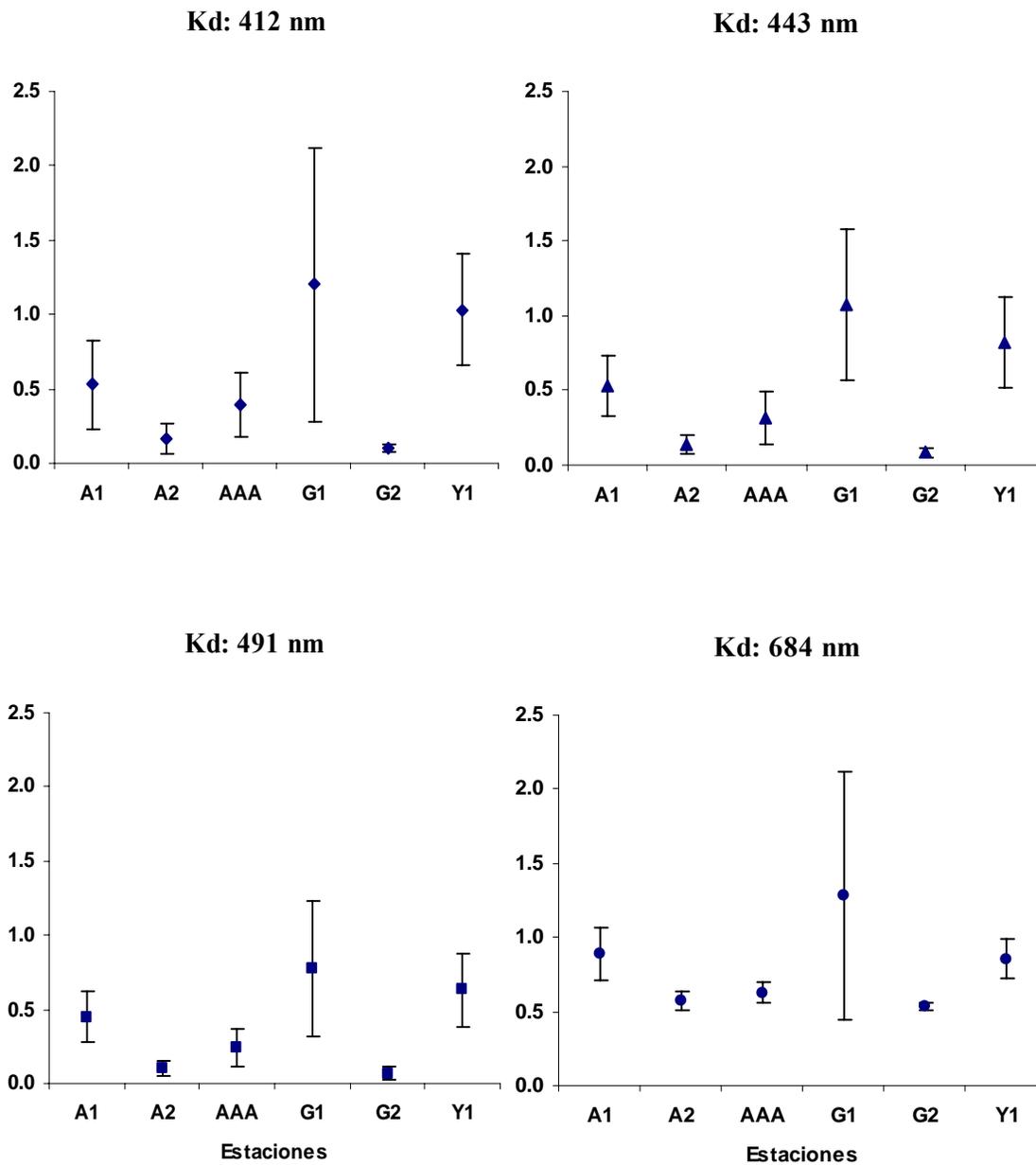


Figura 14. Promedio del coeficiente de atenuación vertical (K_d) en las diferentes estaciones de la Bahía de Mayagüez de julio a diciembre 2005.

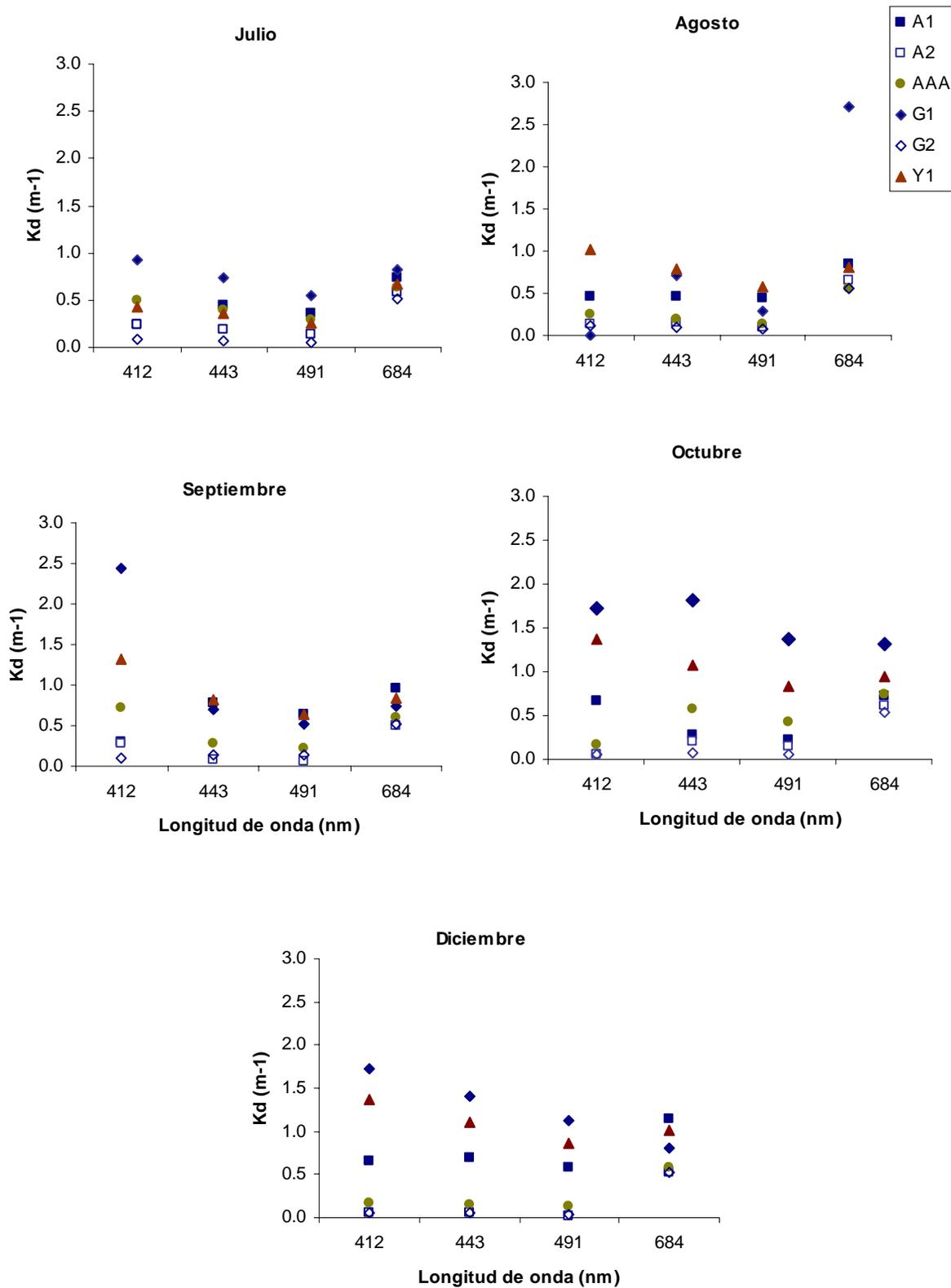


Figura 15. Valores del coeficiente de atenuación difusa (K_d) en las diferentes estaciones de la Bahía de Mayagüez, a nivel temporal. La leyenda aplica para todas las gráficas.

Tomando en cuenta los valores de K_d a 491 nm, se calculó la zona eufótica (1% de la radiación solar incidente) en cada estación considerando la ecuación: $Z_{eu} = 4.6/K_d$ (491 nm), (Tabla 6).

Tabla 6. Profundidad de la zona eufótica (Z_{eu} 490 nm) de las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez.

| Estación | Rango K_d (491 nm) (*) | Promedio K_d (491 nm) | Rango Z_{eu} (m) (*) | Promedio Z_{eu} (m) |
|----------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| A1 | 0.22-0.65 | 0.53 | 7.13-20.92 | 11.88 |
| G1 | 0.29-1.38 | 1.08 | 3.35-15.89 | 8.06 |
| Y1 | 0.26-0.87 | 0.82 | 5.31-18.02 | 8.84 |
| AAA | 0.13-0.43 | 0.32 | 10.69-36.75 | 23.87 |
| A2 | 0.03-0.16 | 0.14 | 29.30-170.69 | 69.11 |
| G2 | 0.03-0.14 | 0.09 | 33.95-134.33 | 82.84 |

(*) Datos obtenidos de julio-diciembre 2005

Temperatura y Salinidad

La temperatura no presentó mucha variabilidad en la Bahía de Mayagüez durante el periodo de estudio. En septiembre se reportó los valores más altos de temperatura con un promedio de 30.5 °C; y los más bajos en diciembre con 27.5 °C en promedio. De acuerdo a los resultados de ANOVA, no hubo diferencias significativas entre profundidades y a nivel espacial; mientras que hubo diferencias significativas a nivel temporal (Apéndice 22, 23 y 24).

Los valores más bajos de salinidad fueron a nivel de superficie y los más altos a profundidad, en todas las estaciones. Las estaciones costeras tuvieron los valores más bajos

en promedio, a diferencia de las oceánicas y la AAA. Los valores de salinidad mostraron diferencias significativas entre profundidades, a nivel temporal y espacial (Apéndice 25, 26 y 27).

Análisis de Correlación

No hubo correlación entre la densidad de cianobacterias y los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación, en todas las longitudes analizadas (Apéndice 28). Sin embargo, hubo una correlación lineal positiva entre la densidad de diatomeas y los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación. Las correlaciones más altas se presentaron con el coeficiente de atenuación ($r = 0.44$, $p < 0.001$; en todas las longitudes de onda) (Apéndice 29). De igual forma, se observó una correlación lineal significativa entre Chl-a y los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación; en todas las longitudes de onda (Tabla 7). La figura 16 muestra como ejemplo la correlación entre la concentración de Chl-a y los coeficientes de absorción y atenuación, a 440 nm.

Tabla 7. Coeficiente de correlación de Pearson entre la concentración de Clorofila-a y los coeficientes de absorción, retrodispersión y atenuación.

| Variables | r | p<0.05 |
|------------------|----------|------------------|
| Chl-a – a 412 nm | 0.75 | <0.001 |
| Chl-a – a 440 nm | 0.76 | <0.001 |
| Chl-a – a 488 nm | 0.75 | <0.001 |
| Chl-a – a 676 nm | 0.76 | <0.001 |
| Chl-a – bb442 nm | 0.66 | <0.001 |
| Chl-a – bb470 nm | 0.66 | <0.001 |
| Chl-a – bb671 nm | 0.65 | <0.001 |
| Chl-a – c 412 nm | 0.76 | <0.001 |
| Chl-a – c 440 nm | 0.76 | <0.001 |
| Chl-a – c 488 nm | 0.76 | <0.001 |
| Chl-a – c 676 nm | 0.77 | <0.001 |

Chl-a= clorofila-a, a= coeficiente de absorción, bb= coeficiente de retrodispersión
c= coeficiente de atenuación, r=coeficiente de correlación

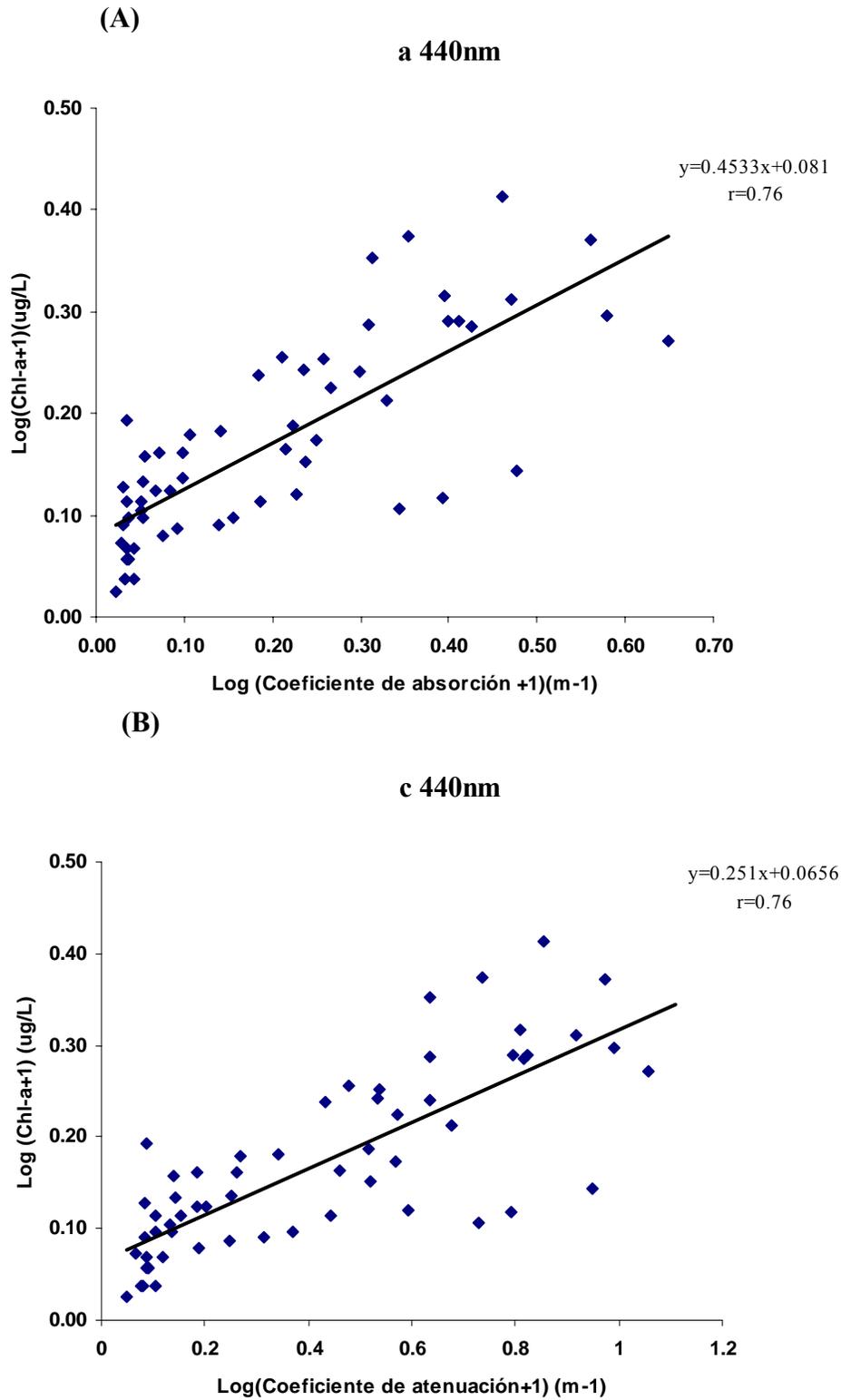


Figura 16. Relación entre la concentración de clorofila-a y el coeficiente de absorción (A), y atenuación (B) a 440 nm.

Estructura de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez

Polimorfismo de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP)

Los cambios en la comunidad de cianobacterias en las estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez a nivel de superficie, se analizó mediante T-RFLP. Se utilizaron las enzimas de restricción *HaeIII*, *RsaI*, y *MspI* y cada una de ellas generó patrones de restricción del fragmento de 16S rDNA terminal (T-RFs) de cianobacterias, los cuales probablemente representen una población de cianobacterias.

Los cambios en la comunidad de cianobacterias fueron analizados tomando en cuenta dos parámetros: (1) número de T-RFs observados en cada estación, y (2) abundancia relativa de cada fragmento reflejada por su intensidad de fluorescencia.

El número de T-RFs observados con las enzimas de restricción, fueron diferentes entre sí. Con *HaeIII* se generó el número más alto de fragmentos terminales. Los T-RFs producidos con *HaeIII*, mostraron cambios a nivel temporal y espacial. El número más alto de T-RFs se observó en las estaciones A1, G1 y G2 (50, 40 y 40 T-RFs, respectivamente) durante octubre, y disminuyó en los otros meses, especialmente en diciembre. Mientras que el número de fragmentos fue bajo en A2, AAA y Y1, en todos los meses (Tabla 8). Las poblaciones de cianobacterias representadas por los T-RFs 574, 377, 247, 230, 223 y 137 pb (pares de bases) fueron comunes en todas las estaciones durante agosto y septiembre pero no se observaron en octubre. Sin embargo, algunos de estos fragmentos (230, 223 y 137 pb) reaparecen en diciembre, pero únicamente en las estaciones G1, G2 y Y1. Por el contrario, en octubre se encontró fragmentos únicos de 567, 546, 543, 494, 484, 469, 465, 453, 442, 163, 150 y 91 pb en las estaciones G1, G2 y A1. Dos fragmentos únicos de 422 y 414 pb se encontraron en A2, AAA y Y1.

Los T-RFs producidos con *RsaI*, también mostraron variaciones a nivel temporal y espacial. El número más alto se observó en diciembre en las estaciones A1, A2 y AAA (23, 31 y 27 T-RFs, respectivamente). Sin embargo, G1, G2 y Y1; mostraron ciertas variaciones en el número de T-RFs en todos los meses (Tabla 8). Los fragmentos comunes estuvieron representados por: 286 pb presente en todas las estaciones durante el periodo de estudio, con excepción de septiembre; 420, 309 y 77 presente de agosto a septiembre en todas las estaciones y 412 pb presente sólo en agosto y diciembre. Mientras 219 y 413 pb, fueron fragmentos únicos en agosto.

Igualmente, *MspI* mostró variaciones a nivel temporal y espacial. El número más alto de T-RFs fue en G1 durante agosto (40 T-RFs) y disminuyó en los otros meses. El número de T-RFs en las estaciones A2, AAA, G2 y Y1 fue ligeramente baja en todos los meses (Tabla 8). Desde agosto a septiembre se encontraron fragmentos comunes de 453 pb, mientras que fragmentos de 310 pb estuvieron de agosto a diciembre en todas las estaciones. En septiembre se encontraron como fragmentos únicos a 682, 623 y 616 pb en las estaciones A1, A2, G2 y AAA, y en octubre los fragmentos 688 y 583 pb fueron únicos en A2, AAA y Y1.

Tabla 8. Número de T-RFs del 16S rDNA de cianobacterias generados con las tres enzimas de restricción en las estaciones de muestreo (superficie) de la Bahía de Mayagüez, de agosto a diciembre

| Enzima | Estaciones | Rango de T-RFs | |
|---------------|------------|------------------|----------------|
| | | agosto-diciembre | Promedio T-RFs |
| <i>HaeIII</i> | A1 | 22-50 | 33 |
| | A2 | 20-31 | 24 |
| | AAA | 13-25 | 21 |
| | G1 | 10-40 | 25 |
| | G2 | 8-40 | 28 |
| | Y1 | 13-23 | 19 |
| <i>RsaI</i> | A1 | 15-23 | 19 |
| | A2 | 14-31 | 22 |
| | AAA | 11-27 | 19 |
| | G1 | 7-23 | 17 |
| | G2 | 9-21 | 18 |
| | Y1 | 14-23 | 18 |
| <i>MspI</i> | A1 | 27-35 | 30 |
| | A2 | 15-29 | 24 |
| | AAA | 15-29 | 18 |
| | G1 | 5-41 | 21 |
| | G2 | 6-23 | 16 |
| | Y1 | 17-29 | 23 |

Análisis estadístico de T-RFLP

Para conocer los cambios de la comunidad de cianobacterias entre estaciones a nivel temporal, se realizó un análisis de correspondencia con la abundancia relativa de los T-RFs presentes en cada estación. Los resultados indicaron que la comunidad de cianobacterias varía a nivel espacial y temporal (Figura 17) y los valores de los ejes describen que la

variación de los datos pueden ser explicados por diversos factores ambientales. Los valores de los ejes fueron 16 y 13%, para el primer y segundo eje de ordenación, respectivamente, indicando que el 29% de la variación en los datos de T-RFLP pueden ser explicados por factores ambientales desconocidos y no por eventos aleatorios.

Se observó que las comunidades de agosto y septiembre parecen ser similares entre estaciones (Figura 17-grupo I). Las comunidades en octubre, sin embargo, formaron dos grupos diferentes. Un grupo estuvo formado por las estaciones A2, AAA y Y1 (Figura 17-grupo II) y otro por G1, G2 y A1, (Figura 17-grupo III). El mismo patrón se observó en diciembre, donde las estaciones A1, A2 y AAA (Figura 17-grupo IV) fueron separadas de G1, G2 y Y1 (Figura 17-grupo I). Además se observó que éste último grupo fue distribuida muy cerca de las estaciones de agosto y septiembre, lo que sugiere que la comunidad de cianobacterias puede ser similar a la comunidad de estos meses.

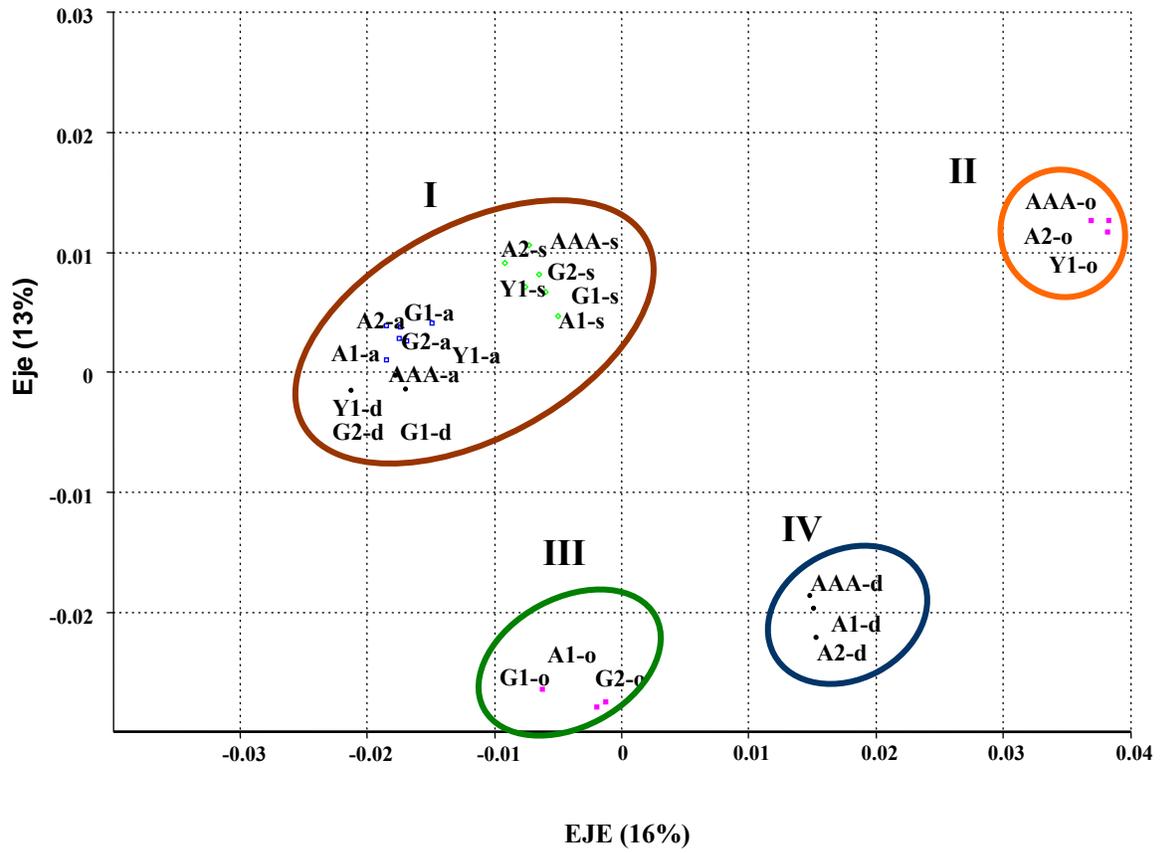


Figura 17. Análisis de correspondencia de los T-RFs de la comunidad de cianobacterias en cada estación durante el periodo de estudio (a=agosto, s=septiembre, o=octubre y d=diciembre). I, II, III y IV, representan los grupos identificados.

Librería de clones del 16 rADN de cianobacterias de dos estaciones de muestreo en la Bahía de Mayagüez.

Se construyeron dos librerías de clones basado en el gen 16S rADN de cianobacterias de las estaciones AAA y G2 correspondiente a septiembre (muestras que fueron seleccionadas al azar). Se secuenció aproximadamente 800 pb de un total de 25 y 28 clones, de AAA y G2, respectivamente. Para obtener una identificación preliminar de cada clon, las secuencias fueron analizadas usando la base de datos depositadas en BLAST (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La mayoría de las secuencias de ambas librerías mostraron al menos 97% de similitud con cianobacterias cultivables y no cultivables. Finalmente, todos los clones secuenciados fueron analizados usando la base de datos de “Greengenes” como se describió anteriormente.

El análisis filogenético de ambas librerías fue realizado en el programa MEGA 3.1. Para esto se tomó en cuenta 7 clones representativos, por la frecuencia en la que se encontró cada clon. Los resultados muestran que la mayoría de clones estuvieron filogenéticamente relacionadas a diversos genotipos de *Synechococcus* (porcentaje de similitud mayor al 97%) pertenecientes al grupo Marino 5.1, anteriormente llamada como grupo Marino A (Ahlgren y Rocap, 2006). Dentro de ellas por ejemplo, las cepas de *Synechococcus* WH8012, WH8016, WH7803, han sido reportadas en diversos ambientes marinos oligotróficos y mesotróficos. Esto indica que los clones de ambas librerías se distribuyeron en un sólo grupo, las picocianobacterias del Orden Chroococales (Figura 18).

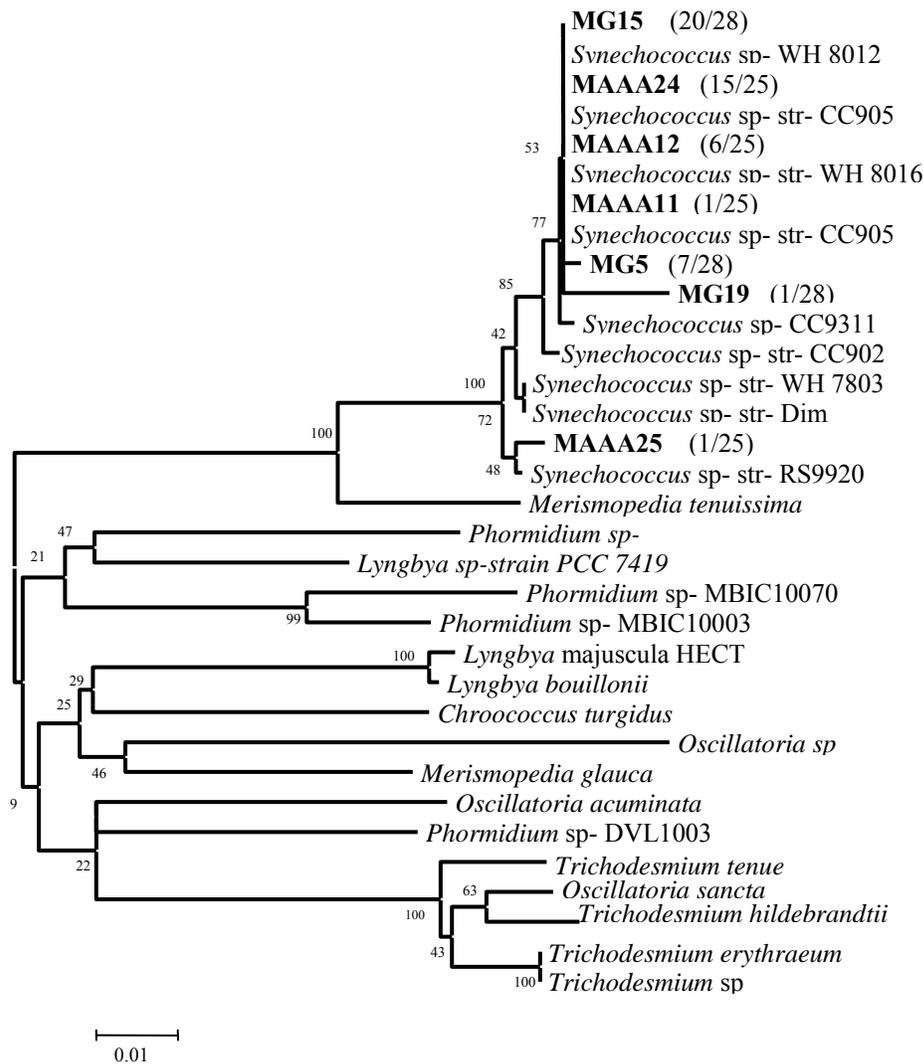


Figura 18. Árbol filogenético de la librería de clones del 16S rDNA de cianobacterias que representa la comunidad de cianobacterias en las estaciones G2 y AAA construido por el método de “Neighbor-joining”, aplicando como estimador la distancia-p. La escala de la barra indica el número de nucleótidos sustituidos por posición de secuencias. MAAA=clones de la estación AAA. MG= clones de la estación G2. Los números entre paréntesis representan la frecuencia en la que se encontró cada clon (Los números en las ramas representan las pseudoréplicas o “bootstraps”).

Análisis estadístico de la librería de clones

Como una medida de la diversidad taxonómica de la comunidad de cianobacterias en las estaciones AAA y G2, en la Bahía de Mayagüez; se calculó el número de OTUs (riqueza) y el índice de diversidad para cada librería genómica. Para definir un OTU (filotipo) entre los clones, se utilizó un porcentaje de similitud de 97%. De acuerdo a esto, el número de diferentes OTUs o filotipos encontrados fue sólo de 3 y 5, en G2 y AAA, respectivamente (según resultados obtenidos en DOTUR 3.1). Por otro lado, el índice de diversidad de Shannon-Weiner (H) y Simpson's mostró que la diversidad de cianobacterias fue baja en ambas estaciones, siendo la estación AAA, ligeramente más diversa. Así mismo el índice de Jackard (estimador de riqueza de filotipos), SChao y SAce, indican que el nivel de riqueza de cianobacterias en la AAA es más alto que la estación G2 (Tabla 9).

El número de clones secuenciados por cada librería fue representativo de la diversidad de cianobacterias en vista que se observó un alto índice de cobertura en ambas estaciones, 92% en AAA y 96% en G2 (Figura 19). A su vez, se realizó una curva de Rarefracción para comparar la riqueza entre diferentes comunidades. La gráfica (Figura 20) muestra que el número de clones secuenciados para la librería de G2 fue suficiente para describir la riqueza de cianobacterias en esta estación. Sin embargo se necesitará secuenciar mayor número de clones para la estación AAA hasta obtener una tendencia continua en la gráfica y poder describir la riqueza de cianobacterias en esta estación.

Tabla 9. Índice de diversidad de la librería de clones del gen 16S rDNA de cianobacterias en las dos estaciones en la Bahía de Mayagüez.

| Librería de clones | OTUs^(a) | Shannon-Weiner (H) | Simpson's (1/D) | Jaccard | SAce | Schao |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|----------------|-------------|--------------|
| MAAA | 5(25) | 1.1 | 0.4 | 7.0 | 7.9 | 5.5 |
| MG2 | 3(28) | 0.7 | 0.5 | 4.0 | 4.1 | 3.0 |

^(a) Riqueza, es el número de OTUs (o filotipos) observados. Cada filotipo consiste de un único clon o un grupo de clones que tienen 97% de similitud en sus secuencias. Número en paréntesis indican el número de clones usado en el análisis.

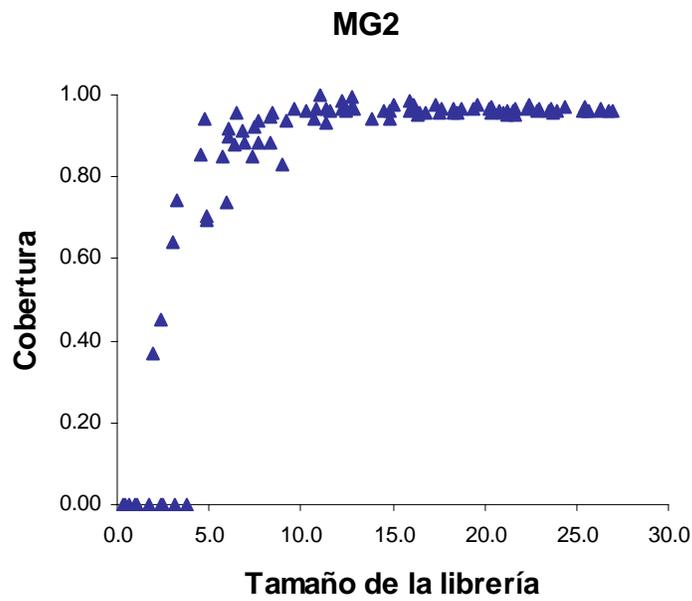
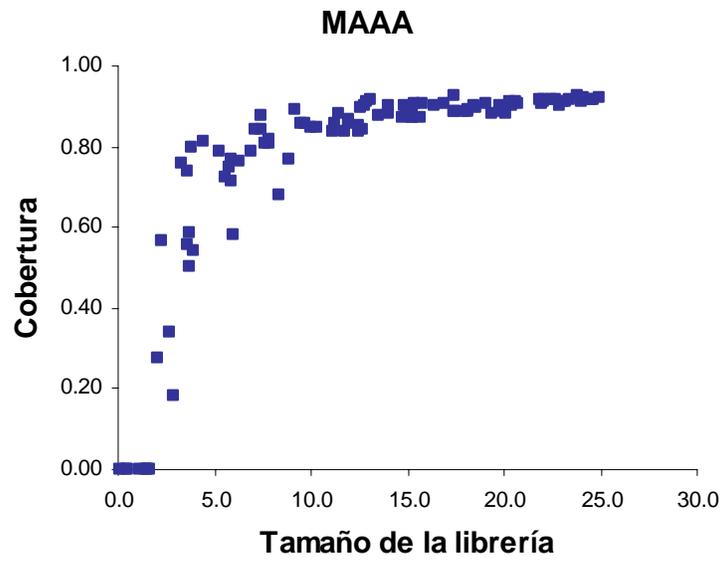


Figura 19. Análisis de cobertura para la librería de clones de las dos estaciones de muestro en la Bahía de Mayagüez. MAAA= librería de clones de la estación AAA, MG2= librería de clones de estación G2

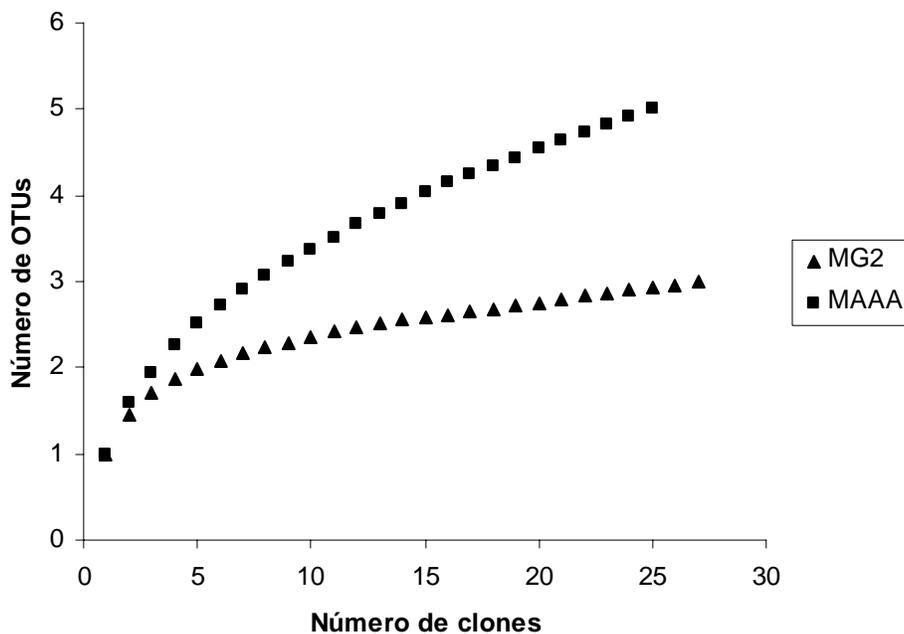


Figura 20. Curva de Rarefacción de la librería de clones de MAAA y MG2.

Análisis *In-silico* de la librería de clones

Se realizó un análisis de restricción *in-silico* (Genscript-Restriction Enzyme Map Analysis/ http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/enzyme_cuttingtool) de la secuencia de los clones para lograr una posible identificación taxonómica de especies representadas en los perfiles de T-RFLP. Ambas librerías permitieron identificar algunos T-RFs de los perfiles observados en las estaciones de los diferentes meses de estudio, donde posiblemente correspondan a *Synechococcus* (Tabla 10). La figura 21 muestra como ejemplo algunos de los

terminales identificados con el análisis *in-silico* de la comunidad de cianobacterias de octubre en las diferentes estaciones.

Tabla 10. Análisis *in-silico* de los T-RFs predichos para las secuencias de los clones de ambas librerías.

| Clon | <i>HaeIII, RsaI,</i> | | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|------------------|--------------------|
| | <i>MspI</i> T-RFs | Agosto T-RFs | Septiembre T-RFs | Octubre T-RFs | Diciembre T-RFs |
| MAAA11 (1/25) | 290 | 289 | 289 | - | 421 |
| | 421 | 420 | 420 | - | - |
| | 491 | - | - | - | - |
| MAAA12 (6/25) | 62 | 61 | 61 | 62 | 62 |
| | 319 | - | - | - | - |
| | 124 | - | 123 | 123 | - |
| MAAA24 (15/25) | 291 | 290 | 290 | 290 | 290 |
| | 422 | 420 | 420 | - | 420 |
| | 492 | - | - | - | - |
| MAAA25 (1/25) | 138 | 137 | 138 | - | 138 |
| | 421 | 420 | 420 | - | 420 |
| | 492 | - | - | - | - |
| MG5 ^(7/28) | 61 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| | 318 | - | - | - | 317 |
| | 121 | - | - | - | 122 |
| MG15 ^(20/28) | 291 | 290 | 290 | - | - |
| | 422 | 421 | 421 | - | 421 |
| | 491 | - | - | - | - |
| MG19 ^(1/28) | 62 | 61 | 61 | 61 | 61 |
| | 328 | - | - | - | 327 |
| | 124 | - | - | - | - |

Los números entre paréntesis representa la frecuencia en la que se encontró cada clon
T-RFs= fragmentos terminales de restricción.

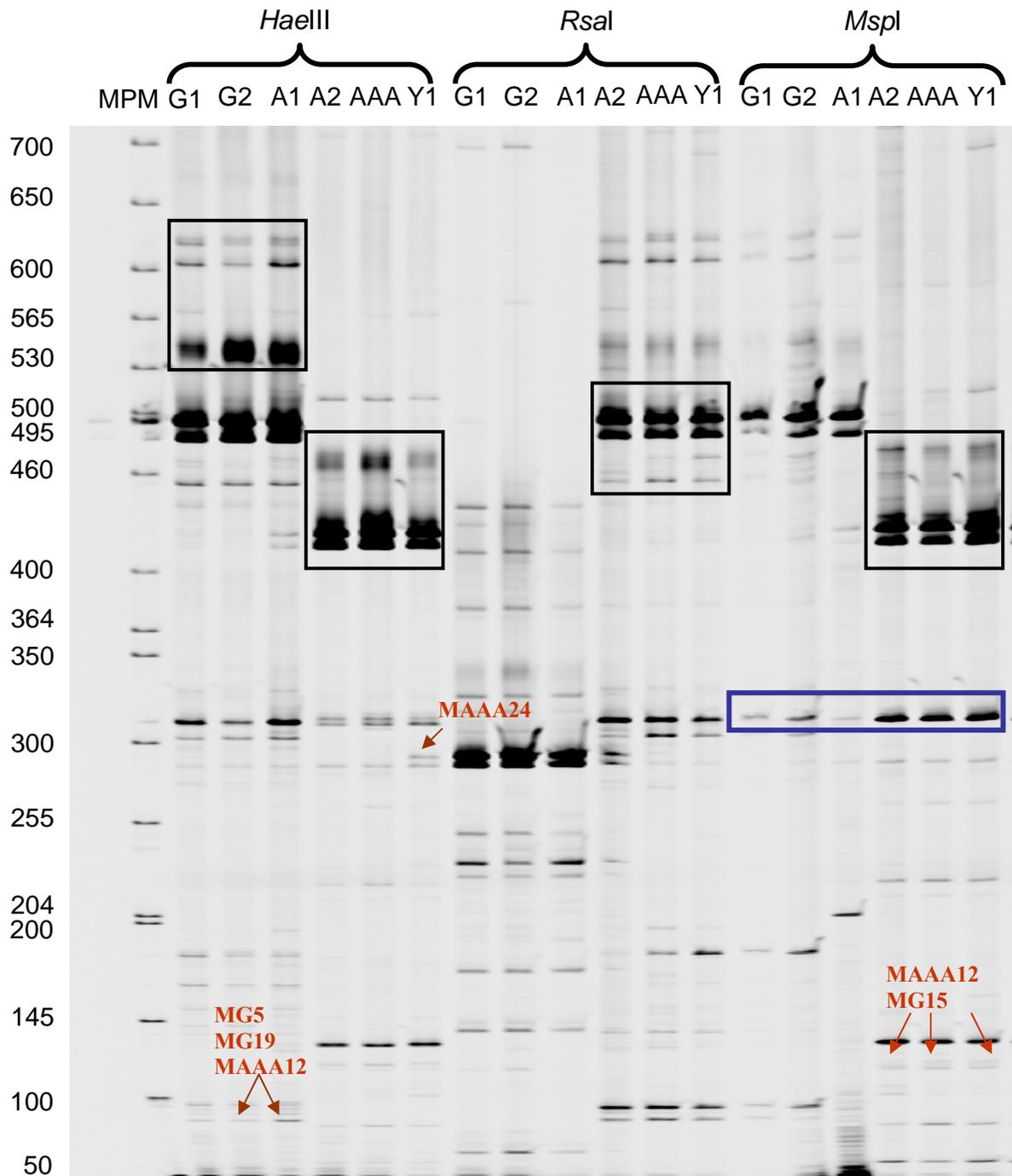


Figura 21. T-RFLP de la comunidad de cianobacterias en octubre. Las flechas indican los T-RFs que posiblemente corresponden a *Synechococcus* identificados mediante el análisis *in-silico*. Como ejemplo se representan T-RFs únicos (cuadrados), T-RFs comunes en todas las estaciones (rectángulos). MSPM=marcador estandar de peso molecular) (*HaeIII*, *RsaI* y *MspI*=enzimas de restricción.

DISCUSIÓN

Abundancia de Fitoplancton

Estudiar la dinámica del fitoplancton (cambios en la abundancia, diversidad y distribución) es esencial para conocer el estado trófico y su influencia en las propiedades bio-ópticas de los ecosistemas acuáticos (Sosik *et al.*, 2001). Diversas variables bióticas y abióticas, entre ellas: la luz, nutrientes y temperatura; controlan a su vez, el desarrollo y composición del fitoplancton en un sistema acuático.

Durante éste estudio, la abundancia de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez fue menor, representando el porcentaje más bajo del total del fitoplancton, alcanzando su densidad máxima en agosto. Mientras que la abundancia de diatomeas fue mayor representando el porcentaje más alto del total de fitoplancton, su densidad máxima fue en octubre. La distribución de cianobacterias y diatomeas a nivel de superficie y profundidad no fue significativa. Esto sugiere que la dominancia de diatomeas es independiente de la profundidad debido a que este grupo está adaptado a vivir en la columna de agua. A nivel espacial, las diatomeas dominaron en todas las estaciones, especialmente en las costeras. Sin embargo, la densidad de Cianobacterias fue relativamente uniforme en todas las estaciones. Para este grupo, las estaciones oceánicas y la estación AAA registraron una densidad ligeramente alta a diferencia de las costeras (A1, G1 y Y1).

La concentración de nutrientes afecta la composición del fitoplancton en zonas costeras, debido a la influencia de la descarga de los ríos, en las cuales ciertos grupos se favorecen por condiciones de estratificación. Según Gilbes *et al.*, (1996) y Rosado (2002), la descarga de los ríos Añasco, Yagüez y Guanajibo son los principales factores que regulan el

crecimiento del fitoplancton en la Bahía de Mayagüez. Estos ríos descargan cantidades considerables de nutrientes disueltos, compuestos orgánicos e inorgánicos y sedimentos suspendidos, que incrementan durante la época de lluvia.

Según datos obtenidos de la USGS en el 2005 la descarga más alta de los ríos se registró en octubre (Apéndice 31). Este factor podría explicar el aumento de la densidad de diatomeas registrado para este mes, especialmente en G1 y Y1. Durante julio, septiembre y diciembre; la precipitación y la descarga de los ríos fueron bajas, meses en los cuales la abundancia de diatomeas disminuyó con excepción de diciembre, donde se observa que la densidad de diatomeas fue relativamente alta (Figura 6). En éste mes (empieza época de sequía), la mezcla ocasionada por el viento puede estar provocando la resuspensión de los nutrientes desde los sedimentos estimulando el crecimiento de diatomeas y los otros grupos del fitoplancton. A su vez, es posible que la mineralización de la materia orgánica por actividad microbiana este incrementando la concentración de nutrientes.

Frente a esta variabilidad en la descarga de los ríos, las cianobacterias pueden estar alterando su respuesta fisiológica en relación a la variación en la concentración de nutrientes, producida por la descarga de los ríos, donde las diatomeas se verían favorecidas alterando el crecimiento de cianobacterias en la bahía. Es conocido que los cambios en las zonas costeras causados por la entrada de los ríos, provocan un cambio en la comunidad del fitoplancton, donde las diatomeas tienden a dominar (Billen y Garnier, 1997). Shapiro (1990) y Posth (2003) sugieren que la abundancia de diatomeas puede estar directamente relacionada al declive de algunas especies de Cianobacterias, y que estas últimas se ven favorecidas cuando la disponibilidad de nutrientes es escasa. Navarro (1998) encontró que la abundancia más baja de *Trichodesmium* en la estación del Caribe (CaTS) se registró para octubre, cuando la

influencia del río Orinoco fue alta, y las concentraciones de nitrato y silicato aumentaron afectando su abundancia. Mientras que aumentó cuando hubo menor descarga del Río Orinoco y la concentración de nitrato y silicato disminuyeron.

A pesar que las cianobacterias pueden fijar nitrógeno (N_2), la abundancia de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez, puede estar limitado por la disponibilidad de otros nutrientes, entre ellas el fósforo, necesario para la síntesis de la nitrogenasa (Kuffner y Valerie, 2001). El fósforo es considerado generalmente como uno de los nutrientes limitantes para la producción primaria, debido a que gran parte se pierde en el sedimento, existiendo mayor cantidad de fósforo en los sedimentos que en la columna de agua. Por lo tanto, el fósforo puede ser un limitante para las cianobacterias debido a su baja competitividad por la disponibilidad de fósforo comparado a otros grupos como las diatomeas. Estudios realizados por Alfaro (2000), demuestran que el fosfato es uno de los nutrientes limitantes en la Bahía de Mayagüez. Ella reporta que la mayor cantidad de fósforo que se descargó en la Bahía (1998) fue por el Río Guanajibo mientras que la menor contribución fue por el Río Yagüez. Esto sugiere que la densidad baja de cianobacterias principalmente en Y1 (estación que recibe la descarga del río Yagüez) se debe a que el fósforo puede ser un factor limitante o un nutriente competitivo entre diatomeas y Cianobacterias.

Otro aspecto importante que regula la densidad del fitoplancton es el efecto de herbivoría o raspado (“grazing”) causado por el zooplancton. El zooplancton ejerce un control en el tamaño y composición del fitoplancton. Estudios previos han reportado que en aguas costeras y de estuarios existe una disminución de la biomasa del fitoplancton por acción del zooplancton (García-Soto *et al.*, 1990, citado en Alfaro, 2002). Esto sugiere que posiblemente la densidad de cianobacterias en la bahía también esté siendo controlada por

acción del zooplancton. Vanni (1987) indica que el zooplancton puede reducir la abundancia de ciertas especies del picoplancton (en las cuales están incluidas las picocianobacterias) favoreciendo la sobrevivencia del fitoplancton.

Por otro lado, la continua deposición y resuspensión de los sedimentos en la bahía, que provocan una disminución en la entrada de la luz (Gilbes *et al.*, 1996); puede estar afectando la abundancia de Cianobacterias. Se ha reportado que *Trichodesmium* es sensible a la calidad de luz a diferencia de las diatomeas. Muchas especies de diatomeas, se encuentran adheridas a los sedimentos y pueden encontrarse en la columna de agua como consecuencia de la resuspensión de sedimentos (Mithavkar y Anill, 2002).

Identificación de cianobacterias

Entre los géneros dominantes de cianobacterias reportadas en todas las estaciones se encuentran *Trichodesmium* y *Oscillatoria*. *Trichodesmium* principal fijadora de N en ambientes marinos, habita principalmente en aguas superficiales de regiones tropicales y subtropicales (Capone *et al.*, 1997). Se ha reportado que su presencia favorece el crecimiento de diatomeas y dinoflagelados por su capacidad de fijar N₂ (Sarangi *et al.*, 2004; Kuffner y Paul, 2001). Estos datos coinciden con los reportados en este estudio, donde se observó que Pyrrophyta (dinoflagelados) aumentó significativamente en septiembre cuando hubo un ligero incremento de cianobacterias.

La diversidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez fue baja según el índice de Shannon–Weiner (0.37) y Simpsons (0.17). Esto indica que la comunidad de cianobacterias esta siendo afectada por variaciones del ambiente generadas por la entrada de los ríos, así como la resuspensión de sedimentos; favoreciendo sólo la presencia de algunas especies

eficientes en respuesta a la incorporación de nutrientes. Es conocido que existen muy pocas especies de cianobacterias en ambientes marinos tropicales, sin embargo existen otros reportes de géneros de cianobacterias, pero ninguno de estos parece tener mayor importancia dentro del ecosistema (Hoffmann, 1999).

El análisis de agrupamiento considerando la abundancia de cianobacterias en las diferentes estaciones (Figura 8), mostró dos grupos. Un grupo formado por las estaciones: A1, G1 y Y1, que están bien diferenciadas de un segundo grupo AAA, A2 y G2. La diferencia entre estos grupos sugiere que el desarrollo de cianobacterias principalmente en las estaciones costeras se ve afectada por su baja competitividad por los nutrientes en relación a otros grupos del fitoplancton. Muchos autores indican que su desarrollo se ve favorecido cuando la disponibilidad de nutrientes es escasa.

Las estaciones A2 y G2 (oceánicas) fueron muy similares entre sí. Dicha similitud se debe a que *Trichodesmium* y *Oscillatoria* fueron relativamente más abundantes en estas estaciones que en las otras. Se ha reportado que *Trichodesmium* está adaptado a desarrollar en ambientes oligotróficos, donde posiblemente las estaciones oceánicas tengan estas condiciones.

Clorofila-a

Los valores más altos de Chl-a se registraron en agosto y octubre en todas las estaciones con un máximo en G1 y Y1. La elevada concentración en estos meses puede ser explicada por el incremento en la densidad de diatomeas (especialmente en octubre) así como en el aumento en la descarga de los ríos (USGS, Apéndice 31). Bidigare *et al.* (1993), encontraron también concentraciones altas de Chl-a y de sedimentos en el mar del Caribe

durante periodos de alta influencia del Río Orinoco, donde las diatomeas dominaron la comunidad del fitoplancton debido a una entrada alta de nitrato y silicato.

A pesar que en la Bahía de Mayagüez existe una limitación de la luz, la síntesis de Chl-a puede ser recompensada por la entrada adicional de nutrientes proveniente de los ríos, dentro de ellos se sabe que el N influye directamente en su síntesis. Una relación significativa entre Chl-a y las partículas en suspensión en la Bahía de Mayagüez fue encontrada por Gilbes *et al.* (1996). Ellos indican que concentraciones altas de partículas en suspensión están relacionadas con concentraciones altas de nutrientes, las cuales pueden afectar la turbidez del agua y disminuir la intensidad de luz. Estos cambios en las propiedades del agua inducen a que el fitoplancton se adapte a bajas intensidades de luz incrementando su contenido de clorofila-a. Raven (1984) ha sugerido que el mayor contenido de Chl-a es controlado a niveles intermedios de luz, cuyos beneficios de la inversión en nueva Chl-a compensan el costo de su síntesis (Loreto *et al.*, 2003).

Los resultados de éste estudio puede compararse con los trabajos de Rosado (2000) y Alfaro (2002) quienes encontraron valores más altos de Chl-a en octubre (1997 y 1998, respectivamente) en las estación de Añasco y la AAA; respectivamente. Así mismo, Gilbes *et al.* (1996), registraron concentraciones altas de Chl-a para la estación de Añasco. Sin embargo, en este estudio la estación A1 (Añasco), registró valores más bajos que G1. Esta diferencia puede atribuirse a diferentes factores, dentro de ellos, Parrilla (1996) sostiene que la concentración de Chl-a y las partículas en suspensión en la estación Añasco no está bajo un control absoluto del Río Añasco y que otros factores como la herbivoría pueden afectar los niveles de Chl-a. El río Añasco, descarga mayor cantidad de sedimentos y a pesar que esto podría indicar condiciones óptimas de nutrientes para el fitoplancton, las concentraciones

altas de sedimentos pueden estar limitando la disponibilidad de luz para la síntesis de Chl-a. Además, se observó que la estación A1 en este estudio se encuentra más alejada de la descarga del río Añasco a diferencia de G1, esto podría explicar la concentración alta de Chl-a en G1. Según estudios de Alfaro (2002), existen poblaciones grandes

Las concentraciones bajas de Chl-a en la AAA y en las estaciones oceánicas corresponden a evidentes bajas de la densidad del fitoplancton. Los valores bajos en la AAA, no coinciden con los valores altos reportados por Rosado y Alfaro. Esto puede estar relacionado a que en años pasados la Bahía recibía el efluente de aguas de tratamiento primario de la AAA, donde el fitoplancton incrementaba su población por concentraciones altas de nutrientes. Además, Alfaro (2000) indicó que posiblemente la baja presión de herbivoría sobre el fitoplancton por la presencia de los zooplanctívoros (ctenóforos, chaetognatos y medusas) resulte en un incremento de la concentración de Chl-a. Actualmente, la bahía recibe el efluente producto de las aguas residuales de tratamiento secundario, donde posiblemente exista una disminución de partículas en suspensión y de nutrientes y la concentración de Chl-a disminuya.

La concentración de Chl-a y la densidad de cianobacterias no mostró una relación positiva, pero sí para el grupo de las diatomeas ($r=0.57$, $p<0.001$). Esto sugiere que las diatomeas son responsables mayormente de la concentración de Chl-a en la Bahía de Mayagüez, mientras que el aporte de las cianobacterias no es significativo.

Aunque las picocianobacterias no fueron enumeradas en éste trabajo, se conoce que éste grupo (*Syenchococcus* y *Prochlorococcus*) se encuentran a menudo en la zona eufótica de los océanos pelágicos como parte del fitoplancton marino y que son uno de los mayores contribuidores a la concentración de Chl-a en estas regiones (Morel *et al.*, 1993; Díaz, 2000;

Marañón *et al.*, 2001), pero su mayor rol en ecosistemas marinos tropicales parece ser como fijadores de nitrógeno. Stuart *et al.* (2004) documentaron que la población de fitoplancton en zonas lejos de la costa puede ser atribuida a la dominancia de especies pequeñas de fitoplancton, tales como cianobacteria, Chlorophyta y Prymnesiophyta que contribuyen a la concentración de Chl-a. Igualmente, Morales *et al* (2001) notó que las células más pequeñas dominaron en muestras con concentraciones relativamente bajas de Chl-a, mientras que elevadas concentraciones estuvieron asociadas con células más grandes ($> 20 \mu\text{m}$).

Según Lee (2002), las concentraciones bajas de Chl-a en la Bahía de Mayagüez están asociados con concentraciones altas de picoplancton ($0.7\text{-}0.2 \mu\text{m}$) (que incluye picocianobacterias) y concentraciones altas están asociadas con el fitoplancton ($>2.0 \mu\text{m}$). A su vez menciona que existe una pérdida del picoplancton entre 9 y 20 % (estaciones oceánicas y costeras, respectivamente) cuando las muestras de agua se filtran a través de los filtros de $0.7 \mu\text{m}$ (Whatman GF/F) y el picoplancton logra atravesar subestimándose el valor real de la Chl-a.

Propiedades bio-ópticas

La Bahía de Mayagüez es un sistema complejo, cuyas propiedades bio-ópticas están reguladas principalmente por la descarga de los ríos Añasco, Guanajibo y Yagüez, y en cierto modo por la presencia del fitoplancton, todos estos crean una alta variabilidad bio-óptica en la bahía (Rosado, 2000). La resuspensión de sedimentos es otro factor físico que afecta las propiedades ópticas, y esta es provocada por la acción de las corrientes marinas, las mareas, los oleajes, que a su vez provocan una mezcla vertical de la columna de agua (Miller *et al.*, 1994).

Durante este estudio, el coeficiente de absorción y retrodispersión, no mostró diferencias entre superficie y profundidad, mientras que si hubo diferencias con el coeficiente de atenuación. A nivel espacial y temporal todos presentaron diferencias significativas. Los valores mas altos fueron en las estaciones costeras, siendo G1 la más alta. Este comportamiento puede estar asociada a la presencia de CDOM y partículas suspendidas que gran parte son introducidos por la descarga del río; a la abundancia de diatomeas que fue ligeramente alta en este mes y a la resuspensión de sedimentos.

En general, el coeficiente de absorción y atenuación fueron más altos a 412 nm y los más bajos a 676 nm, en todas las estaciones costeras, con excepción de AAA. Los valores de absorción a 412 nm sugieren que los principales contribuidores al coeficiente de absorción, particularmente en las estaciones costeras, es el CDOM (cuya absorción máxima se conoce que es en esta parte azul del espectro visible) que gran parte es proveniente de los ríos. Esto es evidente, debido a que en estos meses y en especial en G1, se encontraron valores altos de CDOM (Patrik Reyes, comunicación personal). Rosado (2000) reporta que la absorción en la Bahía de Mayagüez es dominada por el CDOM y detritos en estaciones cercanas a la descarga de los ríos, principalmente en época de lluvia; estimulando a que el fitoplancton altere su composición de pigmentos para capturar la luz en otras longitudes de onda. Por lo tanto, el CDOM serían los principales contribuidores al coeficiente de atenuación de la luz en las estaciones costeras. Por otro lado, es importante mencionar que la resuspensión de sedimentos en la Bahía es muy frecuente, y éste al ser un material pequeño permanece por largos periodos contribuyendo a la atenuación de la luz.

El coeficiente de absorción a 440 y 676nm en las estaciones costeras fueron relativamente menores que a 412 nm, sin embargo, los más bajos se encontraron en

estaciones oceánicas. Esto sugiere que el fitoplancton, está absorbiendo la luz en estas longitudes de onda, debido a que el pico de absorción del fitoplancton (Chl-a) es a 440 y 680 nm, (Kirk, 1994). Los valores mínimos de absorción a 440 y 676 nm en las estaciones oceánicas y en AAA, puede estar relacionado a la disminución de la abundancia de fitoplancton, en especial de las diatomeas. Por lo tanto el fitoplancton sería el principal contribuidor a la absorción de la luz y al coeficiente de atenuación en estas estaciones. Esto es evidente, debido a que tienen poca influencia de la descarga de los ríos y por consiguiente el CDOM estaría en concentraciones bajas. Rosado (2000) también sugiere que la absorción en estaciones oceánicas en la Bahía es dominada por el fitoplancton.

Se ha determinado que las aguas del Caribe pueden ser clasificadas de acuerdo a sus características bio-ópticas en dos tipos: aguas Caso 1 y Caso 2. La Bahía de Mayagüez es considerada como aguas Caso 2. En aguas Caso 1, la concentración de Chl-a del fitoplancton, tienen un rol importante en las propiedades bio-ópticas del agua. En contraste, los principales contribuidores a las propiedades bio-ópticas en agua Caso 2 son el CDOM proveniente de la descarga de los ríos y los sedimento resuspendidos. En este caso la Chl-a del fitoplancton puede estar o no presentes en cantidades significativas (Kirk, 1994; Nelson et al., 1993; IOCCG, 2000).

La correlación entre la densidad de cianobacterias y el coeficiente de absorción y atenuación de la luz fueron negativas, mientras que la correlación fue positiva con la densidad de diatomeas. Esto sugiere que las cianobacterias en contraste a las diatomeas no contribuyen significativamente al coeficiente de absorción y atenuación en la Bahía de Mayagüez. A pesar de las variaciones en la disponibilidad de luz generadas por la entrada o resuspensión de sedimentos, las diatomeas puede estar adaptándose a estos cambios de luz,

como resultado de su cinética de aclimatación (Lewis *et al.*, 1984 citado en Babin *et al.*, 2003), contribuyendo así a la absorción de la luz. Además las diatomeas tienen una unidad fotosintética inherentemente grande que le permite una mejor adaptación en ambientes donde existe una mezcla vertical activa.

Sin embargo, la respuesta de cianobacterias pudo ser diferente frente a la variación en las condiciones de luz, reduciendo su densidad y alterando su contenido Chl-a. Bricaud *et al.* (2000), indica que la absorción del fitoplancton incrementa en forma proporcional a la concentración de pigmentos, los mismos pueden ser afectados por la concentración de N₂ e intensidad de luz. Estudios realizados por Muriel y Lores, 2004 y Navarro (1998) demostraron que el contenido de Chl-a en cianobacterias tuvo una variación en respuesta a su tamaño, fisiología, irradianza espectral y al incremento en nutrientes.

La capacidad de absorción de las cianobacterias encontradas en la bahía de Mayagüez, puede estar relacionada también al efecto de empaque de sus pigmentos. Este efecto depende del tamaño celular (Kirk 1994; Suzuki *et al.*, 1998; Sosik *et al.*, 2001, Bricaud *et al.*, 2004). El efecto de empaque es mayor cuando el tamaño celular incrementa y se reduce la capacidad de absorción de la Chl-a. Muchas cianobacterias como *Trichodesmium* (>2.0 µm) incrementan el efecto de empaque de sus pigmentos y reducen su capacidad de absorción (Agusti y Philips 1992). En contraste, las picocianobacterias (0.7-0.22 µm) tienen menor efecto de empaque y mayor área superficial y su capacidad de absorción de la luz es mayor (Núñez *et al.*, 2004).

En éste estudio no fue posible cuantificar las picocianobacterias. De esta manera, la correlación fue establecida sólo con la abundancia de cianobacterias reportadas con la cámara de Sendgwick Rafter (Microscopio de luz). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad que

ciertas especies de este grupo, probablemente tenga un importante aporte al coeficiente de absorción y atenuación de la luz en la bahía principalmente en las estaciones oceánicas. Según Lee (2002), el picoplancton en la Bahía de Mayagüez contribuye en un 30-58% a la absorción total y 45-90% a la absorción del fitoplancton. Muchos estudios revelan que las propiedades ópticas del fitoplancton son más altas en zonas estratificadas donde el picoplancton domina la capa superficial del agua (Morel *et al.*, 1993; Babin *et al.*, 2003; Belzile *et al.*, 2004). Diversos trabajos han mostrado que las picocianobacterias tienen valores altos de absorción a 440 nm (Moore *et al.*, 1995; Núñez *et al.*, 2004). Algunos autores (Bricaud *et al.*, 1981; Agusti y Phlips, 1992) mencionan que la capacidad de absorción de las cianobacterias también se ve afectada por la falta de cloroplastos y el bajo contenido de Chl-a en relación a los eucariotas.

De acuerdo a esto, la correlación negativa entre la densidad de cianobacterias y la concentración de Chl-a, pueden ser explicadas por lo siguiente:

- Se subestima el aporte de las picocianobacterias a la concentración de Chl-a en la Bahía de Mayagüez.
- Posiblemente *Trichodesmium* y las otras poblaciones de cianobacterias en la Bahía tengan una concentración baja de Chl-a y que su absorción sea mínima a 440 y 676nm (donde la absorción se debe exclusivamente a diatomeas) o quizá exista una competencia de la luz entre cianobacterias y diatomeas en estos largos de onda. Cualquier variación en la concentración de los pigmentos accesorios a la Chl-a en las Cianobacterias alteran su contenido de Chl-a. Se ha reportado que *Trichodesmium* en la CaTS, varía su contenido de Chl-a y PE, el cual se relaciona a variaciones en su tamaño, fisiología, irradianza espectral y al incremento en nutrientes.

- Muchas cianobacterias presentan vesículas de gas que regula su flotabilidad, dentro de ellas *Trichodesmium* habita generalmente en la superficie del agua, pero muchas pueden ser fotoinhibidas a alta irradianza y reducir su contenido de pigmentos (Chl-a) (Lewis *et al.*, 1988; Mur *et al.*, 1999).

Debido a que la absorción y la atenuación de la luz en la Bahía de Mayagüez, puede estar dominada por el CDOM y las diatomeas, las partículas en suspensión que incluye a los sedimentos suspendidos pueden ser los principales contribuidores a la retrodispersión de la luz, sobretodo en las estaciones costeras.

La estación G1 registró los valores más altos de retrodispersión, a pesar que en estudios anteriores determinan que existe una menor concentración de sedimentos que en la estación de Añasco. Por lo tanto, los valores altos en G1, puede estar asociada principalmente a una resuspensión de material sedimentado (material arcilloso del fondo) debido a que esta estación es menos profunda que las otras estaciones costeras.

Según Boss *et al.*, (2004), la retrodispersión es inversamente proporcional al coeficiente de absorción. Los sedimentos suspendidos tiene mayor importancia en la dispersión de la luz que en la absorción (Green *et al.*, 2003). Cuando un fotón se propaga en el agua e interactúa con alguna partícula puede ser absorbido o retrodispersado. La capacidad de retrodispersión del sedimento depende del tamaño de la partícula y las mas pequeñas tienen una alta contribución a la retrodispersión que las partículas más grandes (Doxaran *et al.*, 2003, Green *et al.*, 2003 y Stefan 2006).

Los valores bajos de retrodispersión en las estaciones oceánicas y en la AAA puede estar relacionada a una disminución de sedimentos, debido a que la influencia de la descarga de los ríos es baja.

La correlación entre la densidad de cianobacterias y el coeficiente de retrodispersión fue negativa. Por lo tanto, es evidente que las cianobacterias no contribuyen al proceso de retrodispersión de la luz en la Bahía, a pesar de esto, Subramaniam y Carpenter (1999) mencionan que las vesículas de gas de *Trichodesmium* incrementa la retrodispersión de la luz, en relación a otras especies que tienen una influencia baja, pero esto depende de su densidad en la columna del agua. El coeficiente de retrodispersión de cianobacterias y del fitoplancton también está en función al tamaño de la célula. Las más pequeñas como las picocianobacterias (*Prochlorococcus*) tienen un coeficiente de retrodispersión mayor a las células más grandes como las diatomeas (Morel *et al.*, 1993; Stramski y Morel, 1990 y Herlevi, 2002).

La correlación positiva con las diatomeas, sugiere que este grupo aporta a la retrodispersión de la luz. Es conocido que su pared mineralizada (sílice) dispersa la luz intensamente (Kirk, 1994). Esta relación puede ser explicada también por la relación que hubo entre la retrodispersión y Chl-a, debido a que las diatomeas son los principales responsables de la concentración de Chl-a en la bahía.

Coefficiente de atenuación difusa de la luz (K_d)

Las medidas de K_d se realizaron con el propósito de evaluar, si la abundancia de cianobacterias afectaría el comportamiento de la luz en la Bahía de Mayagüez. Los valores altos de K_d , que se registraron en las estaciones costeras, especialmente en G1 a 412 nm, sugiere que el CDOM y otras partículas en suspensión están atenuando la luz a esta longitud

de onda, esto debido a que los valores altos de absorción y atenuación fueron asociados a CDOM durante el estudio, en contraste a los valores bajos registrados en las estaciones oceánicas a esta longitud de onda

Los valores de K_d en las estaciones costeras mostraron una disminución a medida que aumentó la longitud de onda, donde K_d a 443 y 684 nm fueron relativamente bajos (Figura 15) y esto se caracteriza por un efecto acumulativo de la absorción y atenuación del fitoplancton, principalmente de las diatomeas y a la dispersión de los sedimentos suspendidos o aquellos provenientes del fondo. Sin embargo, en estaciones oceánicas y AAA, K_d incrementó a medida que la longitud de onda aumentó (Figura 15). Así, los valores altos de K_d a 684nm en estas estaciones, sugiere que la luz está siendo atenuada por la absorción del agua, cuya máxima absorción es en el rojo. Esto se debe a que en estas estaciones donde la cantidad de sedimento es mínima, la luz viene a ser más difusa y la absorción incrementa. Mientras que los valores bajos a 443 nm, indican que hay menos atenuación de la luz, por la baja densidad de diatomeas y por ende de Chl-a, por lo tanto podría existir mayor disponibilidad de luz a esta longitud de onda.

Durante este estudio, muchas de las diferencias observadas en las propiedades ópticas inherentes y en el K_d , pueden estar relacionadas a un evento de constante mezcla de las aguas originando resuspensión de sedimentos. Esto, puede afectar la distribución del fitoplancton e influir en su crecimiento, principalmente en el de cianobacterias.

Análisis de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez

El análisis de T-RFLP mostró variaciones en la comunidad de cianobacterias en las estaciones de la Bahía de Mayagüez, cuando se analizaron con las tres enzimas de restricción.

El análisis de correspondencia (Figura 17) mostró cambios en la comunidad de cianobacterias entre meses y explicó un 29% de la variación. Se observó que la comunidad de cianobacterias fue similar en todas las estaciones de agosto y septiembre (Grupo I) y parte de la comunidad de diciembre (Y1, G2 y G1); los cuales pueden ser explicados por la presencia de fragmentos comunes (16 T-RFs) que se observaron en todas las estaciones. Esto a su vez puede estar relacionado a la presencia de todos los fragmentos terminales que fueron identificados como *Synechococcus*, los cuales estuvieron representados en todas las estaciones de estos meses (Tabla 10). De éstos, algunos fragmentos (420 pb) presentaron una abundancia relativa alta (> 50%) en comparación a los fragmentos terminales observados en los otros meses. En G2 y Y1 de diciembre también se observó que la abundancia relativa de 420 pb fue alta, esto podría estar explicando la distribución de esta comunidad cerca a la comunidad de agosto y septiembre. Por lo tanto este comportamiento, sugiere que la comunidad de cianobacterias en estos meses podría estar siendo dominada por *Synechococcus*, siendo efectivamente visualizados por la técnica de T-RFLP.

En octubre, se observó que la comunidad de cianobacterias cambia, debido a la aparición de fragmentos únicos y al incremento de la abundancia relativa de ciertas poblaciones. Sin embargo hay diferencia entre estaciones distribuyéndose la comunidad en dos grupos, siendo A2, AAA y Y1 (Grupo II) los que presentaron mayor número de fragmentos únicos (12 T-RFs) a diferencia de G1, A1 y G2 (Grupo I) que fueron bajos (4 T-

RFs). Se observó que sólo algunos fragmentos terminales identificados como *Synechococcus* estuvieron representados en este mes (Tabla 10) cuya abundancia relativa fue baja. Esto indica, que existen otras poblaciones de cianobacterias que dominan y son únicas en éste mes. En diciembre, igualmente los perfiles de T-RFLP muestran diferencias entre estaciones, siendo diferentes a las de octubre. Esto sugiere que la población de octubre cambia en diciembre posiblemente por la disminución del número de fragmentos, que fue alta en octubre. Se observa que G1, G2 y Y1 se dispersa muy cerca a la comunidad de agosto y septiembre, esto se debe a que ciertas poblaciones o fragmentos terminales identificadas como *Synechococcus* reaparecen (Tabla 10) y algunas (420 pb) nuevamente aumentan su abundancia relativa (>50 %).

Tomando en cuenta éste comportamiento, la técnica de T-RFLP permitió describir de manera general que la comunidad de cianobacterias cambia a nivel temporal y tiene un patrón de distribución característico de cada estación. En las cuales hay dominancia de ciertos fragmentos o poblaciones que posiblemente sean identificados como *Synechococcus* por el aumento de su abundancia relativa, o por la aparición de nuevas poblaciones o fragmentos terminales especialmente en octubre. Esta distribución puede estar asociada a varios factores ambientales como, variación en la disponibilidad de luz, generadas principalmente por la presencia de sedimentos introducidas por los ríos; variación en la concentración de nutrientes (aunque no se evaluaron en este estudio) y entre otros, haciendo que la comunidad de cianobacterias cambien su composición..

Finalmente, para obtener mayor información de la composición de la comunidad de cianobacterias en la Bahía de Mayagüez, el análisis filogenético (Figura 18) basado en las secuencias de ADN de la librería de clones de AAA y G2 (muestras de superficie), mostró

que la diversidad de cianobacterias en estas estaciones está dominada por *Synechococcus*. Algunos de estos géneros están clasificados dentro del grupo marino 5.1 (anteriormente Grupo marino A) y han sido aisladas de diversas zonas costeras y oceánicas, como en el Golfo de Mexico, mar Sargasso, en las que reportan distintos filotipos cuando el número de células de *Synechococcus* es elevado. *Synechococcus*, es una picocianobacteria que contribuye entre el 20-90% a la productividad primaria en ambientes marinos oligotróficos (Morel *et al.*, 1993; Cloern y Cole 2000, Hoffmann, 1999). Su presencia en ambientes marinos tropicales esta asociada con concentraciones bajas de nutrientes, sobretudo en aguas de superficie. Diversos estudios (Ferris *et al.*, 1998, Fuller *et al.*, 2003 y 2005) han reportado que poblaciones de *Synechococcus* forman diversos grupos filogenéticos que representan poblaciones o ecotipos fisiológica y genéticamente distintas. Muchas de ellas pueden adaptarse a diferentes intensidades de luz predominantemente a diferentes profundidades (Nelson *et al.*, 1993, Cloern y Cole 2000; Posth, 2003).

Los resultados de éste trabajo pueden compararse con estudios realizados por Wawrik *et al.* (2003) en zonas oceánicas y costeras del Golfo de México que reciben la descarga del Río Mississippi, donde el análisis filogenético de la librería de clones y el uso de Citometría de flujo, demostró la presencia de *Synechococcus* (cepas WH7803, WH7805, WH8103 y entre otras), sugiriendo que éste grupo es dominante principalmente en las zonas costeras del Golfo de México.

A pesar que *Synechococcus*, no fue cuantificado en este estudio, requiere un dedicado estudio para conocer su posible contribución a la variación en las propiedades bio-ópticas de la Bahía de Mayagüez. Diversos estudios revelan que las picocianobacterias, a pesar de su pequeño tamaño contienen cantidades significantes de pigmentos accesorios a la Chl-a para

absorber la luz. Por lo tanto se le atribuye a que tiene una importante contribución al coeficiente de absorción de la luz, debido a que el efecto de empaque de sus pigmentos es menor comparado a las del fitoplancton (Babin *et al.*, 2003). Estudios realizados por Sosik *et al.* (1997), determinaron que la variabilidad de las propiedades ópticas en el Océano Atlántico estuvo asociada principalmente a la presencia de *Synechococcus*.

Según el número de OTUs encontrados, la diversidad en ambas estaciones fue baja (a nivel de superficie) debido a que se encontraron únicamente 5 y 3 OTUs, en AAA y G2, respectivamente. Los mismos resultados fueron obtenidos en el Golfo de México, donde encontraron solamente 4 OTUs que estuvieron relacionados a *Synechococcus* WH7803.

En éste estudio no se encontró secuencias de los géneros de cianobacterias que se observaron por microscopia de luz, a pesar que el porcentaje de cobertura (Figura 19) indicó que el número de clones fue suficiente para estimar la diversidad de cianobacterias en ambas estaciones. Por lo tanto, se sugiere que el número de clones secuenciados deben ser consideradas como un estimado mínimo de cianobacterias en estas dos estaciones y que se necesitaría secuenciar mayor número de clones para poder estimar la diversidad.

Sin embargo, éste resultado puede ser atribuido a diversos factores: (1) Una eficiencia baja durante la amplificación del PCR. Esto quiere decir que pueden existir muchas cianobacterias que no tienen una secuencia “signature” para los iniciadores que se utilizaron. (2) Sólo se este amplificando secuencias de 16S rDNA de ciertas cianobacterias y que posiblemente, estas representen una proporción mínima de la diversidad de especies. Aunque aseguran que las especies más abundantes son preferentemente amplificadas (Head *et al.*, 1997). (3) Pueden existir ciertas limitaciones en la extracción de DNA. La presencia de mucílago (polímero) pueden afectar los procedimientos de extracción de DNA (Ayala, *et al.*,

2004). Por lo tanto, es posible que durante la extracción de DNA, las cianobacterias filamentosas y algunas cocoides fueron resistentes a la lisis celular. Muchas cianobacterias producen polisacáridos mucilaginosos que las hacen resistentes a la lisis celular, y también interfieren en la purificación de ácidos nucleicos (Tillett y Neilan, 2000)

A pesar de esto, la construcción de librería de clones, reveló la presencia de picocianobacteria (0.7-0.22 μm), en las dos estaciones de la Bahía de Mayagüez, grupo de cianobacterias que no fue observada en Microscopio de luz. Por lo tanto, técnicas moleculares son una herramienta esencial para investigar la diversidad de cianobacterias que no pueden ser observadas, identificadas y cuantificadas por microscopía de luz.

En general, se observó que la entrada de los ríos, así como la resuspensión de sedimentos, afectan las propiedades bio-ópticas en la Bahía de Mayagüez, donde las Cianobacterias también se ven afectadas por cambios que se producen en la disponibilidad de luz generados por estos ríos. Por lo tanto establecer la relación entre Cianobacterias con estas propiedades es complicada debido a su abundancia baja, quizás a la cantidad de sus pigmentos, las cuales dependen del tipo de especie. Mientras que las diatomeas al adaptarse a estos cambios, su contribución a la variabilidad de las propiedades bio-ópticas es de gran importancia por su alta abundancia en la Bahía de Mayagüez.

CONCLUSIONES

- Las cianobacterias constituyen el grupo con menor densidad en la Bahía de Mayagüez durante el periodo de estudio y representa únicamente 3.6% del total de fitoplancton.
- La abundancia de las cianobacterias en la Bahía de Mayagüez es similar a nivel de superficie y profundidad, mientras que la descarga de los ríos Añasco, Guanajibo, Yagüez y la resuspensión de sedimentos afectan su distribución especialmente en las estaciones costeras.
- El grupo más abundante en la Bahía de Mayagüez correspondió a las diatomeas que representan el 83.4% del total del fitoplancton.
- La concentración de clorofila-a presentó variaciones a nivel espacial y temporal. La mayor concentración fue observada en las estaciones costeras cuando la abundancia de diatomeas fue mayor.
- La relación entre la abundancia de cianobacterias y el coeficiente de absorción, atenuación y retrodispersión fueron negativas. Aunque son conocidas que tienen un rol importante en las propiedades ópticas de muchos ambientes marinos, no fueron determinantes de las propiedades bio-ópticas en la Bahía de Mayagüez.
- La relación entre diatomeas y el coeficiente de absorción, atenuación y retrodispersión fueron positivas. Lo que demuestra que es uno de los principales contribuidores a la variabilidad de las propiedades bio-ópticas en la Bahía de Mayagüez debido a su foto-adaptación en respuesta a cambios en la disponibilidad de la luz.
- Se observó evidencia de la variación temporal y espacial de la comunidad de cianobacterias mediante el uso de técnicas independientes de cultivo como T-RFLP.

- Librería de clones reveló que *Synechococcus* es un grupo dominante en las estaciones G2 y AAA de la Bahía de Mayagüez.

RECOMENDACIONES

Aunque en años recientes se ha estudiado la variabilidad de las propiedades Bio-ópticas en la Bahía de Mayagüez, este es el primer reporte de la abundancia y diversidad de Cianobacterias y el rol que cumplen en la variabilidad de las propiedades bio-ópticas. Para trabajos futuros se recomienda:

- Evaluar la densidad de cianobacterias y diatomeas en épocas de menor precipitación.
- A pesar que las picocianobacterias fueron reveladas por librería de clones, es necesario estudiar la variación espacial y temporal de la abundancia de las picocianobacterias para conocer su posible aporte a las propiedades bio-ópticas de la Bahía de Mayagüez. Por su tamaño pequeño, es conocido que este grupo suele ser subestimado para propósitos de validación de sensores remotos.
- La técnica de T-RFLP, a pesar de ser una buena herramienta para conocer los patrones de distribución y variación de las comunidades de cianobacterias entre estaciones a nivel temporal, se recomienda realizar una librería de clones de estaciones cercanas a la descarga de los ríos para llegar a conclusiones mas precisas de la presencia de picocianobacterias.

LITERATURA CITADA

- Agusti, S. y E. Phlips. 1992. Light absorption by cyanobacteria: Implications of the colonial growth form. *Limnol Oceanogr*: 37:434-441.
- Alfaro, M. 2002. Oceanografic features and zooplankton community structure at Mayagüez Bay, Puerto Rico. Ph.D. Tesis Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 147 pp.
- Ahlgren, N. y G. Rocap. 2006. Culture Isolation and Culture-Independent Clone Libraries Reveal New Marine *Synechococcus* Ecotypes with Distinctive Light and N Physiologies. *Appl Environ. Microbiol* Vol 72: 7193-7204.
- Agusti, S. y E. Phlips. 1992. Light absorption by cyanobacteria: Implications of the colonial growth form. *Limnol Oceanogr*: 37:434-441.
- Ahn, Y.H., A. Bricaud y A. Morel. 1992. Light backscattering efficiency and related properties of some phytoplankters. *Deep-Sea Research Part A-Oceanographic Research Papers* 39: 1835-1855.
- Alpine A. y Cloern, J.1988. Phytoplankton growth rates in a light-limited environment, San Francisco Bay. *Mar Ecol* 44: 167-173.
- Ayala del Río, H., S. Callister, C. Criddle y J. Tiedje. 2004. Correspondence between Community Structure and Function during Succession in Phenol-and Phenol-plus-Trichloethene-Fed Sequencing Batch Reactors. *Appl Environ. Microbiol.*70: 4950-4960.
- Babin, M., D. Stramski, G. Ferrari, H. Claustre, A. Bricaud, G. Obolensky y N. Hoepffner. 2003. Variations in the light absorption coefficients of phytoplankton, nonalgal particles, and dissolved organic matter in coastal waters around Europe. *J. of Geophysical Res.*108: 3211.
- Belzile, C., W. Vincent, C. Howard, I. Hawes, M. James, M. Kumagai y C. Roesler. 2004. Relationship between spectral optical properties and optically active substances in a clear oligotrophic lake. *Water Resour.Res.* 40: W12512.
- Bidigare, R.; M.E. Ondrusek y J. Brooks. 1993. Influence of the Orinoco River outflow on distribution of algal pigments in the Caribbean Sea. *J.of Geophysical Res.* 98: 2259-2269.
- Billen, G., y J. Garnier. 1997. The Phison river plume: coastal eutrophication in response to changes in land use and water management in the watershed. *Aquat. Mar. Ecol.* 13: 3-17.

- Blackwood, C., T. Marsh, S. Kim y E. Paul. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Appl Environ. Microbiol.* 60: 926-932.
- Borstad, G. A., J. F. R. Gower, y E. J. Carpenter. 1992. Development of algorithms for remote sensing of *Trichodesmium* blooms, p. 193–210. In E. J. Carpenter, D. G. Capone, and J. G. Rueter, Marine pelagic cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs. Kluwer.
- Boss, E., D. Stramski, T. Bergmann, W. Scott y M. Lewis. 2004. Coastal Ocean Optics and Dynamics Why should we measured optical backscattering. *J. Oceanography Society* Vol 17.
- Bricaud, A., H. Claustre, G. Obolensky y M. Babin. 2000. Light absorption by suspended particles and phytoplankton in Case 2 waters, in Oceans Optics, edited by S.G. Ackleson and J. Marra, Off of Naval Res. Washington, D.C., Monaco
- Bricaud, A. y A. Morel. 1985. Light attenuation and scattering by phytoplanktonic cells: a theoretical modeling. *Optical Society of America*.
- Capone, D. *et al.*, 1997. *Trichodesmium*, a Globally Significant Marine Cyanobacterium *Science* 276 : 1221.
- Carpenter, E. y C. Price. 1977. Nitrogen fixation, distribution and production of *Oscillatoria (Trichodesmium)* spp. in the western Sargasso and Caribbean Seas. *Limnol Oceanogr.* 22: 60-70.
- Carpenter, E.J. 1983. Nitrogen fixation by marine *Oscillatoria (Trichodesmium)* in the world's oceans. In: Nitrogen in the marine environment. Edited by E.J. Carpenter and D. Capone. Academic press. New York. P65-103.
- Castenholz, R. W. 1992. Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). *J Phycol* 28: 737-745.
- Conn, V. y C. Franco. 2004. Effect of Microbial Inoculants on the Indigenous Actinobacterial Endophyte Population in the Roots of Wheat as Determined by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl Environ. Microbiol.* 70: 6407-6413.
- Cloern, J. and Cole, B. 2000. Spatial and temporal variability of picocyanobacteria *Synechococcus* sp. in San Francisco Bay. *Limnol Oceanogr.* 45: 295-702.
- De León, L. y G. Chalar. 2001. Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande (Argentina – Uruguay). Ciclo estacional y distribución espacial. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá, Montevideo.

- Dubelaar, G., J. Visser y M. Donze. 1987. Anomalous behaviour of forward and perpendicular light scattering of a cyanobacterium owing to intracellular gas vacuoles. Delft University of Technology, The Netherlands.
- Engebretson, J. y C. Moyer. 2003. Fidelity of select Restriction Endonucleasas in Determining Microbial Diversity by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl Environ. Microbiol.* 69: 4823-4829.
- European Standar. ICS 13.060.01. 2005. Water quality. Guidance standar for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermohl technique).
- Farely, E., F. Rainey y E. Stackebrandt. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ. Microbiol.* 61: 2798-2801.
- Farmer, C.T., Moore C.A., Zika R.G., and Sikorski R.J. 1993. Effects of low and high Orinoco River flow on the Underwater light field of the Eastern Caribbean basin. *J. of Geophy. Res.* 98: 2279-2288.
- Ferris, M. J., and B. Palenik. 1998. Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature* 396:226–228.
- Fuller, N. J., D. Marie, F. Partensky, D. Vaultot, A. F. Post, and D. J. Scanlan. 2003. Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2430–2443.
- Fuller, N. J., N. J. West, D. Marie, M. Yallop, T. Rivlin, A. F. Post, and D. J. Scanlan. 2005. Dynamics of community structure and phosphate status of picocyanobacterial populations in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Limnol. Oceanogr.* 50:363–375.
- Gallegos Ch. and Th. Jordan 2002. Impact of the Spring 2000 Phytoplankton Bloom in Chesapeake Bay on Optical Properties and Light penetration in the Rhode River, Maryland Estuaries 25: 508–518
- Geitler, L. 1930-2. Cyanophyceae. In Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz (Rabenhorst, L., editor), Vol 14: 1-1196. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Gilbes, F., J. López y P. Yoshioka. 1996. Spatial and temporal variations of phytoplankton *chlorophyll-a* and suspended particulate matter in Mayagüez Bahía. *J. Plank Res.* 18: 29-43.
- Golubic, S. 1999. Diversity of marine cyanobacteria. In Marine cyanobacteria. Charpy, L. y Larkum, A. W.D. (eds). Monaco: Musee oceanographic.

- Graham, L., W. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall Upper Saddle River
- Green, R., H. Sosik y R. Olson. 2003. Contributions of phytoplankton and other particles to inherent optical properties in New England continental shelf waters. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 2377–2391.
- Head, I., J. Saunders, R. Pickup. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol.* 35: 1-21.
- Henricus, S. G., 2006. Blue-Green Catastrophe, remote sensing of mass viral lysis of cyanobacteria. Thesis. Vrije Universiteit Amsterdam. 144 pp.
- Herlevi, A. 2002. Inherent and apparent optical properties in relation to water quality in Nordic waters. University of Helsinki. Finlandia.
- Hoffmann, L. 1999. Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 34: 371-379.
- Humm, H. y Wicks, S. 1980. *Guide to Marine Bluegreen Algae*. A wiley- Interscience publication. United States of America.
- Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D. and Stal, L. 2000. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry* 57/58: 47–98.
- Kirk, J. 1994. *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press.
- Komarek, J., K. Anagnostidis. Gustav Fischer Jena Stuttgart Lübeck Ulm. 1999. *Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*. Printed in Germany.
- Komarek, J., K. Anagnostidis. 2005. *Cyanoprokaryota. 2. Teil/ 2nd part: Oscillatoriales* Elsevier GMBH, Manchen. Italia.
- Kutser, T. 2004. Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 2179–2189.
- Kuffner, I. V. Paul. 2001. Effects of nitrate, phosphate and iron on the growth of macroalgae and benthic cyanobacteria from Cocos Lagoon, Guam. *Mar Ecol Prog Ser.* 222: 63-72.
- Lee, J., 2003. Contribution of picoplankton to phytoplankton dynamics and bio-optics of the Eastern Caribbean sea. Thesis doctoral of Marine Science. University of Puerto Rico-Mayagüez.

- Lewis, R., Ulloa, O. y T.Platt. 1988. Photosynthetic action, absorption and quantum yield spectra for a natural population of *Oscillatoria* in the North Atlantic. *Limnol. and Oceanog.* 33: 92-98.
- Liu, Wen-Tso, T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522
- Loreto, C., N. Rosales, J. Bermúdez, y E. Morales. 2003. Pigment and Protein Production Of The Cyanobacterium *Anabaena Pcc 7120* In Relation To Nitrogen Concentration And Irradiance. *Gayana Bot.* 60: 83-89.
- López, J., G. Bonheyo, Q. Jin y B. Fouke. 2003. Cianobacteria Associated with Coral Black Band Disease in Caribbean and Indo-Pacific Reefs.
- Madigan, T. Martinko, J., Parker, 2003. Brock Biology of Microorganism. Pearson Education, Inc. EEUU. Tenth edition.
- Marañón, E., P. Holligan, M. Varela, B. Mouriño y A. Bale. 2000. Basin-scale variability of phytoplankton biomass, production and growth in the Atlantic Ocean. *Deep Sea Res* 47:825-857.
- Mitbavkar, S. y A. Anill. 2002. Diatoms of the microphytobenthic community: population structure in a tropical intertidal sand flat. *J. Mar Biol.* 140: 41-57.
- Miller, R., J.Cruise, E. Otero y J. López. 1994. Monitoring Suspended particulate matter in Puerto Rico: Field Measurements and Remote Sensing. *Water Resources Bulletin.* 30 Nº 2.
- Miyazono, A. T. Odate, y Y. Maita. 1992. Seasonal Fluctuations of Cell Density of Cyanobacteria and Other Picophytoplankton in Iwanai Bay, Hokkaido, Japan. *J. Oceanography.* 48: 257 - 266.
- Moore, L., R. Goericke y S. Crisholm. 1997. Comparative physiology of *Synechococcus* and *prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar ecol. prog. Series.* 116: 259-275.
- Morales, C. J. Blanco, M. Braun y N. Silva. 2001. Chlorophyll-a distribution and mesoscale physical processes in upwelling and adjacent oceanic zones off northern Chile (summer autumn, 1994). *J. Mar Biol.* 81: 193-206.
- Mórel, A., Y. Ahn, F. Partensky, D. Vaultot y H. Claustre. 1993. *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: A comparative study of their optical properties in relation to their size and pigmentation. *J. of Mar.Res.* 51: 617-149.

- Mur L., Skulberg, O. y Utkilen, H. 1999. Cyanobacteria in the environment-Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.
- Nagarkar, S. y G. Williams. 1999. Spatial and temporal variation of cyanobacteria-dominated epilimnetic communities on a tropical shore in Hong Kong. *Phycology* 38: 385-393.
- Navarro, A. 1998. Optical properties of photosynthetic pigments and abundance of the cyanobacterium *Trichodesmium* in the eastern Caribbean Basin. Tesis sometida para grado de MS. en la Universidad de Puerto Rico. Mayagüez..
- Nelson, N., B. Prkzelin y R. Bidigare. 1993. Phytoplankton light absorption and the package effect in California coastal waters. *Marine Ecologic progress series*. Vol. 94: 217-227.
- Nübel, U., F. Garcia y G. Muyzer. 1997. PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Nuñez-Millan, E., M.E. Sieracki, R. M. Nuñez, J. Lara-Lara, G. Gaxiola-Castroa and Ch. C. Trees. 2004. Specific absorption coefficient and phytoplankton biomass in the southern region of the California Current.. *Deep sea Res* 51 : 817-826
- Oliver, R. L. y A. E. Walsby. 1984. Direct Evidence for the Role of Light-Mediated Gas Vesicle Collapse in the Buoyancy Regulation of *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria). *Limnol Oceanogr* 29: pp. 879-886.
- Olson, R. J., S. W. Chisholm, E. R. Zettler, M. A. Altabet, y J. A. Dusenberry. 1990. Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 37:1033–1051.
- Osborn, C., G. Rees., Y. Bernstein y P. Janssen. 2006. New Threshold and Confidence Estimates for Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Complex Bacteria Communities. *Appl Environ. Microbiol.* 72: 1270-1278.
- Ouellette, A. y S. Wilhelm. 2003. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular Toolbox. *Front Ecol Environ.* 1: 359-366.
- Palenik, B. y A. Russ, 1999. Cyanobacterial Population in San Francisco Bay. Regional Monitoring Program for Trace Substances, San Francisco Estuary Institute. California
- Parrilla, D. 1996. Distribution of chlorophyll-a, suspended particulate matter and nutrients in the vicinity of the Añasco River Outlet. Master Thesis of Marine Science. University of Puerto Rico, Mayagüez.
- PUTPR. 2006. Plan de uso de terreno de Puerto Rico-Perfil regional, Región oeste.

- Quiñones. Bio-Optical Variability in Mayaguez Bay during the Rainy Season. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayaguez. <http://cacique.uprm.edu/gers/>.
- Rascher, U., M. Lakatos, B. Büdel, and U. Lüttge. 2003. Photosynthetic field capacity of cyanobacteria of a tropical inselberg of the Guiana highlands. *Eur. J. Phycol.* 38: 247-256.
- Remote Sensing of Ocean Color in Coastal and Other Optically-Complex Waters, report of the International Ocean-Color Coordination Group (IOCCG), report number 3, 2000.
- Rosado, M. 2000. Variability in the bio-optical properties Mayagüez Bay. Thesis Master of Marine Science. University of Puerto Rico.
- Sakamoto, M., Y. Takeuchi, M. Umeda, I. Ishikawa y Y. Benno. 2003. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. Medical Microb* 52: 79-89.
- Sánchez, M., M. Vásquez y B. González. 2004. A previously Unexposed Forest Soil Microbial Community Degrades High Levels of the Pollutant 2, 4, 6-Trichlorohenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7567-7570.
- Sambrook y Russell 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Sping Harbor. N.Y.
- Sarangi, R., P. Chauhan y S. Nayak. 2002 Vertical diffuse attenuation coefficient (K_d) based optical classification of IRS-P3 MOS-B satellite ocean colour data. *Proc. Indian Acad. Sci. (Earth Planet. Sci.)* 111: 237-245.
- Sarangi, R., P. Chauhan y S. Nayak. 2004. Detection and monitoring of *Trichodesmium* blooms in the coastal waters off Saurashtra coast, India using IRS-P4 OCM data. *Current Science* 86 : 1636-1641.
- Sathyendranath, S. y T. Platt. 1997. Analytic model of ocean color. *App. Optics*. Vol. 36: 2620-2629.
- Shapiro, J. 1990. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. Intern. Verein. Limnol.* 24:38-54.
- Six, Ch., J. Thomas, L. Thion, Y. Lemoine, F. Zal, y F. Partensky. 2004. Two Novel Phycoerythrin-Associated Linker Proteins in the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain WH8102. *J Bacteriol.* 187: 1685-1694.
- Sosik, H., R. Green y R. Olson. 1998. Optical Variability in Coastal Waters of the Northwest Atlantic. Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole.

- Sosik, H. y Mitchell. 1995. Light absorption by phytoplankton, photosynthetic pigments and detritus in the California Current System. *Deep Sea Res.* 42: 1717-1748.
- Sosik, H., R. Green, W. Scott y C. Roesler. 2001. Temporal and vertical variability in optical properties of New England shelf waters during late summer and spring. *J. Geophys. Res.* 106: 9455-9472.
- Staal, M. y L. Stal. 2003. Light Action Spectra Of N₂ Fixation By Heterocystous Cyanobacteria From The Baltic Sea. *J. Phycol.* 39: 668-677.
- Stramski, D. y Morel, A. 1990. Optical properties of photosynthetic picoplankton in different physiological states affected by growth irradiance. *Deep Sea Res.* 37: 245-266.
- Stramski, D., A. Bricaud y A. Morel. 2001. Modeling the inherent optical properties of the ocean based on the detailed composition of the planktonic community. *Appl. Optics.* 40: 2929-2945.
- Stuart, V., O. Ullloa, G. Alarcón, S. Sathyendranath, H. Major, E. Head y T. Platt. 2004. Bio-optical characteristics of phytoplankton populations in the upwelling system off the coast of Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 1.
- Subramaniam, A. y E. Carpenter. 1999. Bio-optical properties of the marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. II. A reflectance model for remote sensing. *Limnol. Oceanogr.* 44: 618-627.
- Suzuki, K., M. Kishino, K. Sasaoka, S. Saitoh and T. Saino. 1998. Chlorophyll-Specific Absorption Coefficients and Pigments of Phytoplankton off Sanriku, Northwestern North Pacific *J. of Oceanography*, 54: 517 to 526.
- Tillet, D. y Neilan, B. 2000. Xanthogene nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *J. Phycol.* 36: 251-258
- Valentin, K., K. Romari y F. Not. 2001. Uncovering picoplankton biodiversity by sequencing of environmental rRNA genes. *Quiagen News*.
- Vanni, M., 1987. Effects of Nutrients and Zooplankton Size on the Structure of a Phytoplankton Community. *Ecology*:68:624-635
- Welschmeyer, N. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39:1985-1992.
- Wacklin P., 2006. Biodiversity and Phylogeny of Planktic Cyanobacteria in Temperate Freshwater lakes. Thesis. University of Helsinki, Finland.
- Wawrik, B., J. H. Paul, L. Campbell, D. Griffin, L. Houchin, A. Fuentes-Ortega, F. Muller-Karger. 2003. Vertical structure of the phytoplankton community associated with a coastal plume in the Gulf of Mexico. *Mar Ecol Prog Ser.* Vol251: 87-101

West, N., y D. Scanlan Niche-Partitioning of *Prochlorococcus* Populations in a Stratified Water Column in the Eastern North Atlantic Ocean. *Appl Environ. Microbiol* 65: 2585-2591.

APÉNDICE

Apéndice 1. Promedio de la abundancia de Cianobacterias (\pm s.d.) en las diferentes estaciones de la Bahía de Mayagüez, considerando el número de células de cada filamento y/o colonia como un organismo.

| Meses | Estaciones | | | | | |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | A1 | A2 | AAA | G1 | G2 | Y1 |
| | X \pm s.d. | X \pm s.d. | X \pm s.d. | X \pm s.d. | X \pm s.d. | X \pm s.d. |
| Julio | 0.0 \pm 0.00 | 1.35 \pm 0.00 | 2.43 \pm 0.00 | 0.54 \pm 0.00 | 1.44 \pm 0.00 | 0.00 \pm 0.00 |
| Agosto | 0.0 \pm 0.00 | 0.0 \pm 0.00 | 1.62 \pm 1.67 | 16.52 \pm 23.3 | 1.27 \pm 0.22 | 0.00 \pm 0.00 |
| Septiembre | 0.88 \pm 0.00 | 1.95 \pm 0.10 | 6.92 \pm 8.84 | 1.01 \pm 0.10 | 6.58 \pm 6.13 | 0.00 \pm 0.00 |
| Octubre | 2.02 \pm 0.20 | 4.25 \pm 3.72 | 0.40 \pm 0.19 | 0.40 \pm 0.00 | 4.99 \pm 5.91 | 0.88 \pm 0.10 |
| Diciembre | 0.14 \pm 0.19 | 0.88 \pm 0.67 | 0.67 \pm 0.38 | 0.00 \pm 0.00 | 0.88 \pm 0.10 | 00.0 \pm 0.00 |

X=Promedio de la abundancia de cianobacterias de superficie y profundidad, n= 2
s.d.=Desviación estandar
A1, AAA, G1, Y1= Estaciones costeras
A2, G2=Estaciones oceánicas

Apéndice 2. Análisis de varianza de la abundancia de cianobacterias entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-------|----|-------|-------|---------|
| Modelo | 0.004 | 1 | 0.004 | 0.036 | 0.851 |
| Profundidad | 0.004 | 1 | 0.004 | 0.036 | 0.851 |
| Error | 5.96 | 58 | 0.103 | | |
| Total | 5.96 | 59 | | | |

Apéndice 3. Análisis de varianza de la abundancia de cianobacterias a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|--------|------|----|------|------|---------|
| Modelo | 0.66 | 4 | 0.16 | 1.71 | 0.161 |
| Meses | 0.66 | 4 | 0.16 | 1.71 | 0.161 |
| Error | 5.30 | 55 | 0.10 | | |
| Total | 5.96 | 59 | | | |

Apéndice 4. Análisis de varianza de la abundancia de cianobacterias a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1.26 | 5 | 0.25 | 2.88 | 0.022 |
| Meses | 1.26 | 5 | 0.25 | 2.88 | 0.022 |
| Error | 4.71 | 54 | 0.09 | | |
| Total | 5.96 | 59 | | | |

Apéndice 5 . Promedio de la abundancia de Diatomeas (\pm s.d.) en la Bahía de Mayagüez

| Meses | Estaciones | | | | | |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | A1 | A2 | AAA | G1 | G2 | Y1 |
| | X\pms.d. | X\pms.d. | X\pms.d. | X\pms.d. | X\pms.d. | X\pms.d. |
| Julio | 17.6 \pm 0.0 | 30.3 \pm 0.0 | 7.8 \pm 0.0 | 30.1 \pm 0.0 | 15.7 \pm 0.0 | 35.6 \pm 0.0 |
| Agosto | 22.9 \pm 1.7 | 25.5 \pm 16.1 | 17.4 \pm 10.9 | 70.2 \pm 47.6 | 14.4 \pm 1.8 | 49.1 \pm 7.7 |
| Septiembre | 9.7 \pm 5.9 | 21.1 \pm 2.9 | 12.5 \pm 0.8 | 12.1 \pm 6.0 | 11.8 \pm 5.2 | 9.3 \pm 0.9 |
| Octubre | 82.1 \pm 0.2 | 72.3 \pm 3.9 | 113.0 \pm 22.1 | 129.3 \pm 32.3 | 62.7 \pm 49.9 | 140.0 \pm 13.8 |
| Diciembre | 67.5 \pm 11.2 | 54.3 \pm 11.5 | 35.8 \pm 12.5 | 53.7 \pm 0.0 | 16.0 \pm 0.2 | 95.7 \pm 17.4 |

X=Promedio de la densidad de Diatomeas a nivel de superficie y profundidad. n= 2

s.d.=Desviación estandar

A1,AAA,G1,Y1= Estaciones costeras

A2,G2=Estaciones oceánicas

Apéndice 6. Análisis de varianza de la abundancia de Diatomeas entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V.. | SC | Gl | CM | F | Pr>F |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.71 | 1 | 0.71 | 0.10 | 0.7515 |
| Error | 406.16 | 58 | 7.00 | | |
| Total | 406.87 | 59 | | | |

Apéndice 7. Análisis de varianza de la abundancia de Diatomeas a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | gl | CM | F | Pr>F |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 278.76 | 4 | 69.69 | 29.92 | <0.0001 |
| Error | 128.11 | 55 | 2.33 | | |
| Total | 406.87 | 59 | | | |

Apéndice 8. Análisis de varianza de la abundancia de Diatomeas a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | gl | CM | F | Pr>F |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 56.18 | 5 | 11.24 | 1.73 | 0.144 |
| Error | 56.18 | 54 | 6.50 | | |
| Total | 406.94 | 59 | | | |

Apéndice 9. Promedio de la concentración de clorofila-a (\pm s.d.) en la bahía de Mayagüez.

| Meses | Estaciones | | | | | |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | A1 | A2 | AAA | G1 | G2 | Y1 |
| | X \pm s.d. |
| Julio | 0.4 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.1 |
| Agosto | 0.3 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.0 |
| Septiembre | 0.3 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 0.2 \pm 0.0 | 0.8 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.0 | 1.1 \pm 0.2 |
| Octubre | 0.5 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.0 | 1.5 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.2 |
| Diciembre | 0.4 \pm 0.2 | 0.3 \pm 0.1 | 0.4 \pm 0.1 | 0.6 \pm 0.4 | 0.3 \pm 0.0 | 1.0 \pm 0.1 |

X=Promedio de la abundancia de diatomeas de superficie y profundidad. n= 2

s.d.=Desviación estandar

A1,AAA,G1,Y1= Estaciones costeras

A2,G2=Estaciones oceánicas

Apéndice 10. Análisis de varianza de la concentración de clorofila-a entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.12 | 1 | 0.12 | 0.98 | 0.3245 |
| Profundidad | 0.12 | 1 | 0.12 | 0.98 | 0.3245 |
| Error | 21.28 | 178 | 0.12 | | |
| Total | 21.40 | 179 | | | |

Apéndice 11. Análisis de varianza de la concentración de clorofila-a a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 3.00 | 4 | 0.75 | 7.14 | <0.0001 |
| Meses | 3.00 | 4 | 0.75 | 7.14 | <0.0001 |
| Error | 18.39 | 175 | 0.11 | | |
| Total | 21.40 | 179 | | | |

Apéndice 12. Análisis de varianza de la concentración de clorofila-a a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 11.84 | 5 | 2.37 | 43.14 | <0.0001 |
| Estaciones | 11.84 | 5 | 2.37 | 43.14 | <0.0001 |
| Error | 9.55 | 174 | 0.05 | | |
| Total | 21.40 | 179 | | | |

Apéndice 13. Análisis de varianza de las medidas de absorción entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.03 | 1 | 0.03 | 1.14 | 0.2852 |
| Profundidad | 0.03 | 1 | 0.03 | 1.14 | 0.2852 |
| Error | 12.97 | 538 | 0.02 | | |
| Total | 13.00 | 539 | | | |

Apéndice 14. Análisis de varianza de las medidas de absorción a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.56 | 4 | 0.14 | 6.04 | 0.0001 |
| Meses | 0.56 | 4 | 0.14 | 6.04 | 0.0001 |
| Error | 12.44 | 535 | 0.02 | | |
| Total | 13.00 | 539 | | | |

Apéndice 15. Análisis de varianza de las medidas de absorción a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 8.20 | 5 | 1.64 | 182.32 | <0.0001 |
| Estación | 8.20 | 5 | 1.64 | 182.32 | <0.0001 |
| Error | 4.80 | 534 | 0.01 | | |
| Total | 13.00 | 539 | | | |

Apéndice 16. Análisis de varianza de las medidas de retrodispersión entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.0165 | 0.8979 |
| Profundidad | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.0165 | 0.8979 |
| Error | 0.22986 | 358 | 0.0064 | | |
| Total | 0.22987 | 359 | | | |

Apéndice 17. Análisis de varianza de las medidas de retrodispersión a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.014 | 4 | 0.003 | 5.568 | 0.0002 |
| Meses | 0.014 | 4 | 0.003 | 5.568 | 0.0002 |
| Error | 0.216 | 355 | 0.001 | | |
| Total | 0.216 | 359 | | | |

Apéndice 18. Análisis de varianza de las medidas de retrodispersión a nivel espacial en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.13 | 5 | 0.03 | 86.1698 | <0.0001 |
| Estaciones | 0.13 | 5 | 0.03 | 86.1698 | <0.0001 |
| Error | 0.10 | 354 | 0.003 | | |
| Total | 0.23 | 359 | | | |

Apéndice 19. Análisis de varianza de las medidas de atenuación entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.39 | 1 | 0.39 | 4.17 | 0.00415 |
| Profundidad | 0.39 | 1 | 0.39 | 4.17 | 0.00415 |
| Error | 49.78 | 538 | 0.09 | | |
| Total | 50.17 | 539 | | | |

Apéndice 20. Análisis de varianza de las medidas de atenuación a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 2.14 | 4 | 0.54 | 5.97 | 0.0001 |
| Meses | 2.14 | 4 | 0.54 | 5.97 | 0.0001 |
| Error | 48.02 | 538 | 0.09 | | |
| Total | 50.17 | 539 | | | |

Apéndice 21. Análisis de varianza de las medidas de atenuación a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 35.56 | 5 | 7.11 | 260.07 | <0.0001 |
| Estaciones | 35.56 | 5 | 7.11 | 260.07 | <0.0001 |
| Error | 14.60 | 534 | 0.03 | | |
| Total | 50.17 | 539 | | | |

Apéndice 22. Análisis de varianza de las medidas de temperatura entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.13 | 1 | 0.13 | 0.11 | 0.7409 |
| Profundidad | 0.13 | 1 | 0.13 | 0.11 | 0.7409 |
| Error | 65.79 | 58 | 1.13 | | |
| Total | 65.91 | 59 | | | |

Apéndice 23. Análisis de varianza de las medidas de temperatura a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 59.72 | 4 | 14.93 | 132.65 | <0.0001 |
| Meses | 59.72 | 4 | 14.93 | 132.65 | <0.0001 |
| Error | 6.19 | 55 | 0.11 | | |
| Total | 65.91 | 59 | | | |

Apéndice 24. Análisis de varianza de las medidas de temperatura a nivel estacional en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1.78 | 5 | 0.36 | 0.30 | 0.9111 |
| Estaciones | 1.78 | 5 | 0.36 | 0.30 | 0.9111 |
| Error | 64.14 | 54 | 1.19 | | |
| Total | 64.14 | 59 | | | |

Apéndice 25. Análisis de varianza de las medidas de salinidad entre profundidades en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | GI | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0.76 | 1 | 0.76 | 5.39 | 0.0238 |
| Profundidad | 0.76 | 1 | 0.76 | 5.39 | 0.0238 |
| Error | 8.22 | 58 | 0.14 | | |
| Total | 8.98 | 59 | | | |

Apéndice 26. Análisis de varianza de las medidas de salinidad a nivel temporal en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | Gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1.63 | 4 | 0.41 | 3.05 | 0.0243 |
| Meses | 1.63 | 4 | 0.41 | 3.05 | 0.0243 |
| Error | 7.35 | 55 | 0.13 | | |
| Total | 8.98 | 59 | | | |

Apéndice 27. Análisis de varianza de las medidas de salinidad a nivel espacial en la Bahía de Mayagüez.

| F.V. | SC | Gl | CM | F | p-valor |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 4.45 | 5 | 0.89 | 10.62 | <0.0001 |
| Estaciones | 4.45 | 5 | 0.89 | 10.62 | <0.0001 |
| Error | 4.53 | 54 | 0.08 | | |
| Total | 8.98 | 59 | | | |

Apéndice 28. Coeficiente de correlación de Pearson entre la densidad de cianobacterias y las propiedades bio-ópticas.

| Variables | r | p<0.05 |
|--------------------------|----------|------------------|
| Cianobacteria – a 412 nm | -0.24 | <0.001 |
| Cianobacteria – a 440 nm | -0.24 | <0.001 |
| Cianobacteria – a 488 nm | -0.23 | <0.001 |
| Cianobacteria – a 676 nm | -0.22 | <0.001 |
| Cianobacteria – bb442 nm | -0.19 | 0.15 |
| Cianobacteria – bb470 nm | -0.18 | 0.17 |
| Cianobacteria – bb681 nm | -0.13 | 0.31 |
| Cianobacteria – c 412 nm | -0.38 | <0.001 |
| Cianobacteria – c 440 nm | -0.38 | <0.001 |
| Cianobacteria – c 488 nm | -0.38 | <0.001 |
| Cianobacteria – c 676 nm | -0.38 | <0.001 |

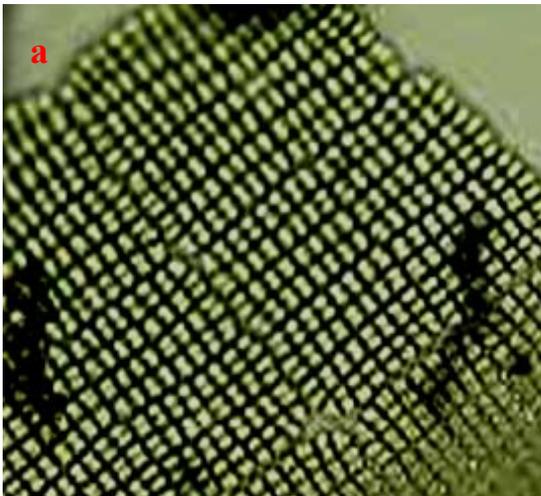
a= coeficiente de absorción, bb= coeficiente de retrodispersión,
c= coeficiente de atenuación, r=Coeficiente de correlación

Apéndice 29. Coeficiente de correlación de Pearson entre la densidad de Diatomeas y los valores de absorción.

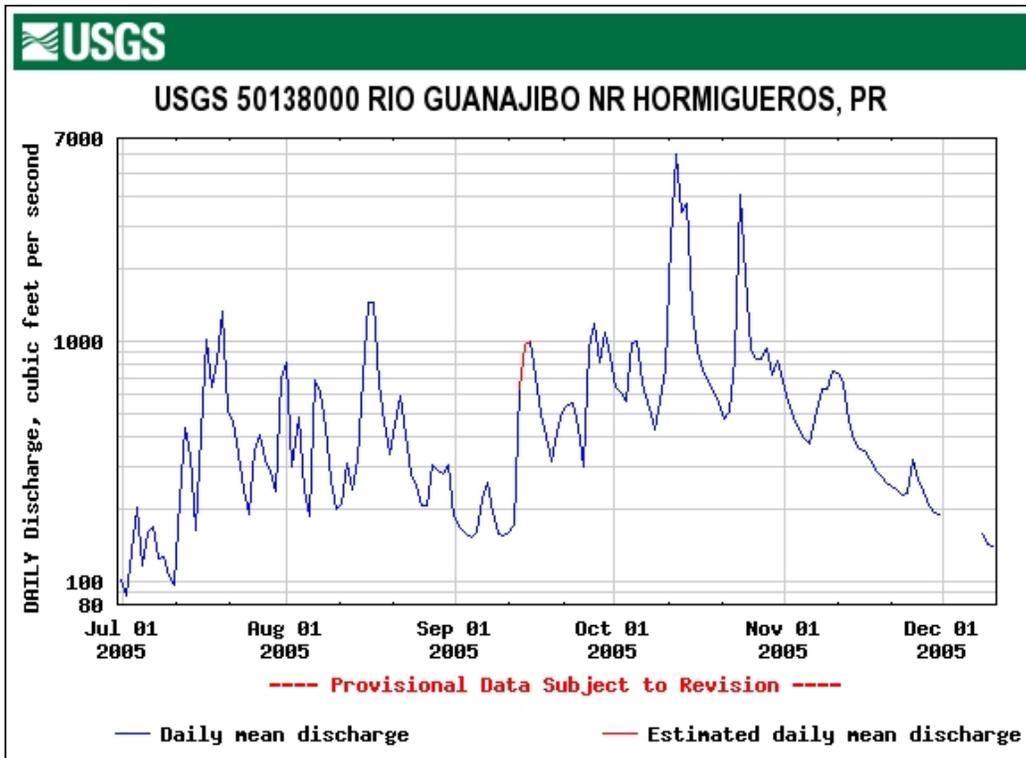
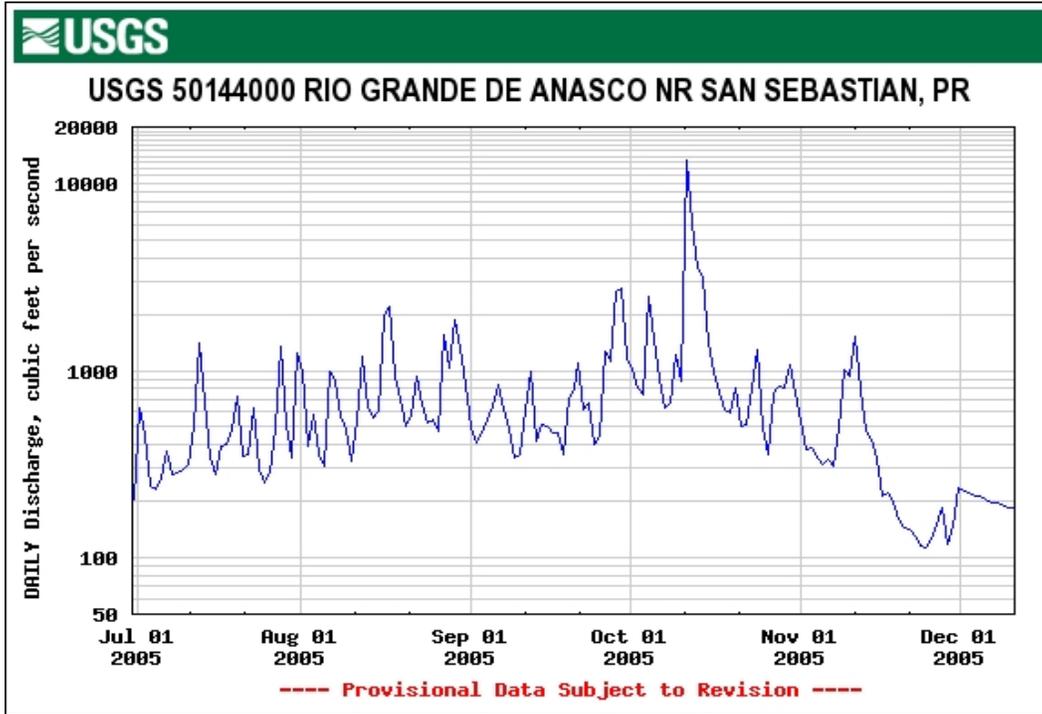
| Variables | r | p<0.05 |
|----------------------|----------|------------------|
| Diatomeas – a 412 nm | 0.43 | <0.001 |
| Diatomeas – a 440 nm | 0.43 | <0.001 |
| Diatomeas – a 488 nm | 0.42 | <0.001 |
| Diatomeas – a 676 nm | 0.43 | <0.001 |
| Diatomeas – bb442 nm | 0.28 | 0.03 |
| Diatomeas – bb470 nm | 0.28 | 0.03 |
| Diatomeas – bb671 nm | 0.28 | 0.03 |
| Diatomeas – c 412 nm | 0.44 | <0.001 |
| Diatomeas – c 440 nm | 0.44 | <0.001 |
| Diatomeas – c 488 nm | 0.44 | <0.001 |
| Diatomeas – c 676 nm | 0.44 | <0.001 |

a= coeficiente de absorción, bb = coeficiente de retrodispersión,
c= coeficiente de atenuación, r = Coeficiente de correlación

Apéndice 30. Algunos géneros de cianobacterias reportadas en la Bahía de Mayagüez. *Merismopedia* (a), *Lyngbya* (b).



Apéndice 31. Descarga diaria del Río Añasco y Guanajibo, de julio a diciembre del 2005.



Apéndice 32. Curva de calibración para las lecturas de la concentración de Chl-a en el fluorómetro TD-700 de Turner Desings.

Las lecturas de absorbancia de las soluciones estándar de Chl-a preparadas, se realizaron en un espectrofotómetro a 665 y 750nm. Con base a esto se calcularon las concentraciones de las soluciones estándar (dato teórico) en ug/L y se realizó la calibración del fluorómetro.

