

**Comentario** a un artículo reciente<sup>1</sup>

Contribución de las cianobacterias a la biomasa fitoplanctónica en Bahía San Quintín

En la nota de investigación de Millán-Núñez *et al.* (2004b), a fin de contribuir a la caracterización de la comunidad fitoplanctónica de Bahía San Quintín (BSQ), estos autores presentaron los resultados de un análisis quimiotaxonómico utilizando la concentración pigmentaria de muestras de fitoplancton colectadas durante abril de 2001. Los autores reportan la presencia de *Prochlorococcus* sp. en la bahía y concluyen que éstas y otras cianobacterias son importantes en BSQ. Sin embargo, el reporte de la presencia del pigmento divinil clorofila *a* (DVChl *a*), como pigmento huella de *Prochlorococcus*, y la conclusión de que este organismo contribuye sustancialmente a la biomasa fitoplanctónica en BSQ no se sustentan en la descripción metodológica ni en los resultados que presentan dichos autores.

El método de separación y cuantificación de pigmentos utilizado por Millán-Núñez *et al.* (2004b) no separa la DVChl *a* de la clorofila *a* (Chl *a*) ya que utiliza una columna cromatográfica con recubrimiento de cadenas de 18 carbonos (C<sub>18</sub>) y solamente utilizando columnas con características más polares (C<sub>8</sub>) se ha logrado la resolución de este par pigmentario (Goericke y Repeta, 1993). Sin embargo, cuando existe la coelución de los dos pigmentos se puede estimar su concentración individualmente utilizando las ecuaciones dicromáticas propuestas por Latasa *et al.* (1996), al presentar la DVChl *a* el máximo de absorción desplazado hacia al rojo aproximadamente 9 nm respecto al de la Chl *a*. Por lo tanto, para aplicar esta metodología se requiere de la medición del espectro de absorción del pico donde coeluyen las clorofilas durante el análisis cromatográfico, o la medición de la absorbancia en dos longitudes de onda simultáneamente. Esta técnica, recomendada por Bidigare y Trees (2000), no es muy utilizada en trabajos recientes sobre estudios de la estructura de la comunidad fitoplanctónica, ya que desde la aparición del método C<sub>8</sub> de Goericke y Repeta (1993) se han desarrollado varios métodos que separan físicamente la DVChl *a* de la Chl *a* que tienen una buena resolución de la mayoría de los pigmentos fitoplanctónicos (Van Heukelem y Thomas, 2001).

Sólo existe una intercomparación usando muestras naturales del método de Latasa *et al.* (1996) y métodos que separan físicamente la DVChl *a* de la Chl *a* (Hooker *et al.*, 2003). Claustre *et al.* (2004) reportan que la sobreestimación de la clorofila total (TChl *a*) se reduce cuando se utilizan las ecuaciones simultáneas de Latasa *et al.* (1996); sin embargo, demuestran que existe una tendencia a subestimar la TChl *a* y

<sup>1</sup>“Variabilidad de la comunidad de fitoplancton en Bahía San Quintín estimada mediante el análisis de pigmentos”, R. Millán-Núñez, E. Millán-Núñez, S. Álvarez-Borrego, C.C. Trees y E. Santamaría-del-Ángel. *Ciencias Marinas* (2004), 30(1A): 145–153.

**Comment** on a previously published paper<sup>1</sup>

Contribution of cyanobacteria to phytoplankton biomass in San Quintín Bay

In the research note by Millán-Núñez *et al.* (2004b), contributing to the characterization of the phytoplankton community at San Quintín Bay (SQB; Baja California, Mexico), the authors present the results of a chemotaxonomic analysis using pigment concentrations in phytoplankton samples collected in April 2001. The authors report the occurrence of *Prochlorococcus* sp. and conclude that it and other cyanobacteria are important in the bay. Nevertheless, the presence of the pigment divinyl chlorophyll *a* (DVChl *a*), as a signature pigment of *Prochlorococcus*, and the conclusion that these organisms contribute significantly to phytoplankton biomass in SQB are not supported by either the methodological description or the results presented.

The method for the separation and quantification of pigments used by Millán-Núñez *et al.* (2004b) does not separate DVChl *a* from chlorophyll *a* (Chl *a*), since it employs a C<sub>18</sub> chromatographic column and the determination of this pigment has only been achieved using columns with more polar characteristics (C<sub>8</sub>) (Goericke and Repeta, 1993). When there is coelution of two pigments their individual concentration cannot be estimated using the dichromic equations proposed by Latasa *et al.* (1996), DVChl *a* presenting maximum absorption displaced approximately 14 nm to the red side relative to that of Chl *a*. To apply this methodology, therefore, it is necessary to determine the peak in the absorption spectrum where the chlorophylls coelute during the chromatographic analysis or to simultaneously measure the absorbance at two wavelengths. This technique, recommended by Bidigare and Trees (2000), has not been widely used in recent studies on phytoplankton community structure, because since the appearance of Goericke and Repeta's (1993) C<sub>8</sub> method, several procedures have been developed to physically separate DVChl *a* from Chl *a* that successfully isolate most phytoplankton pigments (Van Heukelem and Thomas, 2001).

Only one intercomparison using natural samples has been made of Latasa *et al.*'s (1996) method and the techniques to physically separate DVChl *a* from Chl *a* (Hooker *et al.*, 2003). Claustre *et al.* (2004) reported that overestimation of total Chl *a* (TChl *a*) is reduced when the simultaneous equations proposed by Latasa *et al.* (1996) are applied; however, they show that there is a tendency to underestimate TChl *a* and that dispersion of the data increases as the ratio between DVChl *a* and Chl *a* decreases (DVChl *a*/TChl *a*). They also establish that correction using dichromatic equations is only suitable when the Chl *a* allomers and epimers are excluded (Claustre *et al.*, 2004). Millán-Núñez *et al.* (2004b) do not mention the method used to estimate DVChl *a*, so if Latasa *et al.*'s (1996) method was used, the degree of error should be determined for the

aumento de la dispersión de los datos al disminuir la razón entre DVChl *a* y TChl *a* (DVChl *a*/TChl *a*). Asimismo, establecen que la corrección por medio de las ecuaciones dicromáticas sólo sirve cuando se excluyen los alómeros y epímeros de la Chl *a* (Claustre *et al.*, 2004). Millán-Núñez *et al.* (2004b) no hacen mención a la forma de estimación de la DVChl *a*, por lo que si se utilizó la metodología propuesta por Latasa *et al.* (1996) se debe de determinar el grado de error para las muestras obtenidas de BSQ dado que la concentración de DVChl *a* y, por lo tanto, la contribución de *Prochlorococcus* reportada es alta considerando la zona de estudio.

En su artículo, Millán *et al.* (2004b) no reportan las razones pigmentarias utilizadas para la estimación de la abundancia de las diferentes clases algales por medio del CHEMTAX. Aunque se menciona que las razones fueron obtenidas de la literatura, no se mencionan las fuentes ni los valores utilizados. La validez de la estimación de abundancias de los grupos del fitoplancton depende de la elección de las razones pigmentarias adecuadas para las clases algales que se espera encontrar (Mackey *et al.*, 1996). Por ejemplo, el trabajo reporta una contribución baja de las clorofitas (clases prasinophyceae y chlorophyceae) a la biomasa fitoplanctónica, aún cuando los pigmentos, violaxantina, luteína y en especial clorofila *b*, que son indicadores de estas clases, están presentes en concentraciones relativamente altas como para reconsiderar el aporte de este grupo a las muestras.

Hasta este punto se ha hecho referencia a problemas de tipo metodológico; sin embargo, existe un problema de interpretación de los resultados en el ámbito de la importancia ecológica de las diferentes clases algales presentes en BSQ. La probable alta contribución de *Prochlorococcus* a la biomasa fitoplanctónica sólo se demuestra para una estación (Molino Viejo). En las demás estaciones la contribución de la DVChl *a* a la TChl *a* (Chl *a* + DVChl *a* + alómeros y epímeros) es menor a 10% (fig. 3b, c de Millán-Núñez *et al.*, 2004b). Por lo tanto, no se puede concluir que en BSQ este grupo sea importante, y solamente se explicaría la alta concentración de *Prochlorococcus* en la estación de Molino Viejo mediante la presencia de un microambiente en esa localidad. La concentración de Chl *a* reportada en esta estación es menor que en las demás, lo cual puede ser cierto pero no concuerda con los datos de abundancia celular reportados en la tabla 1. Si se multiplica el número de diatomeas reportado por la concentración media de Chl *a* por célula para este grupo (1 pg célula<sup>-1</sup>; Goericke y Montoya, 1998) la concentración de Chl *a* para la primera hora de muestreo equivaldría a 26 µg L<sup>-1</sup>, lo que no concuerda con los valores de TChl *a* reportados. La tabla 1 puede tener errores de edición ya que la concentración celular debería de estar reportada probablemente en cél L<sup>-1</sup> y no en cél mL<sup>-1</sup>, y los valores de las horas de muestreo 20 y 21 son exactamente iguales a los valores obtenidos 24 horas después, lo cual es poco probable.

Por último, la gran abundancia de *Prochlorococcus* en BSQ no se puede comparar con regímenes oceánicos oligotróficos

samples obtained at SQB since the concentration of DVChl *a* and, therefore, the contribution of *Prochlorococcus* could be high considering the study area.

Millán-Núñez *et al.* (2004b) do not report the pigment ratios used to estimate the abundance of different algal classes using the CHEMTAX program. Though they mention that the ratios were obtained from the literature, they do not indicate the sources or values used. Validity of the estimates of phytoplankton class abundance depends on the choice of suitable pigment ratios for the algal classes that are expected to be found (Mackey *et al.*, 1996). For example, the work reports a low contribution of chlorophytes (classes Prasinophyceae and Chlorophyceae) to the phytoplankton biomass, even though the pigments violaxanthin, lutein and especially chlorophyll *b*, which are indicators of these classes, occur in high enough concentrations to reconsider this group's contribution to the samples.

In addition to methodological problems, there also seems to be a problem with the interpretation of the results relative to the ecological importance of the different algal classes in SQB. The probable high contribution of *Prochlorococcus* to the phytoplankton biomass is only shown for one station (Molino Viejo). At the other stations the contribution of DVChl *a* to TChl *a* (Chl *a* + DVChl *a* + allomers and epimers) is less than 10% (fig. 3b–c in Millán-Núñez *et al.*, 2004b). Therefore, it cannot be concluded that this group is important in SQB and the high concentration of *Prochlorococcus* at Molino Viejo can only be explained by the presence of a microenvironment at this site. The Chl *a* concentration reported for this station is lower than that obtained at the other stations; this could be true but does not concur with the cell abundance data given in table 1. If the number of diatoms reported for mean Chl *a* concentration per cell for this group is multiplied (1 pg cell<sup>-1</sup>; Goericke and Montoya, 1998), the concentration of Chl *a* for the first sampling hour would be 26 µg L<sup>-1</sup>, which does not concur with the TChl *a* values reported. Table 1 seems to have a few errors, since cell concentration should have been given in cells per litre and not in cells per millilitre, and the values for sampling hours 20 and 21 are exactly the same as those obtained 24 hours afterwards, which is unlikely.

Finally, the great abundance of *Prochlorococcus* at SQB cannot be compared with oligotrophic oceanic regimes like the Arabian and Mediterranean Seas, where this genus plays a significant ecological role (Bustillos-Guzmán *et al.*, 1995; Goericke, 2002). The relative importance of *Prochlorococcus* is considerable in ecosystems where there is a predominance of organic nutrients, such as amino acids and nucleic acids, and regenerated nutrients, such as NH<sub>4</sub> (Zubkov *et al.*, 2003). At SQB, where diatoms predominate, the system responds to inorganic nitrogen fluxes (NO<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub>), and this zone is considered a net sink for nitrogen (Álvarez-Borrego, 2004). It therefore seems unlikely that such a high biomass of *Prochlorococcus* would occur at SQB. The contribution of *Prochlorococcus* to phytoplankton biomass has only been observed at more oceanic (oligotrophic) stations, where

como los mares Arábigo y Mediterráneo donde este género tiene un rol ecológico significativo (Bustillos-Guzmán *et al.*, 1995; Goericke, 2002). La importancia relativa de *Prochlorococcus* es alta en ecosistemas donde predominan nutrientes orgánicos como aminoácidos y ácidos nucleicos, y nutrientes regenerados como  $\text{NH}_4$  (Zubkov *et al.*, 2003). En BSQ, donde predominan las diatomeas, el sistema responde a flujos de nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_2$ ), y se considera a esta zona como un sumidero neto de nitrógeno (Álvarez-Borrego, 2004). Por lo tanto, es poco probable que se encuentre tan alta biomasa de *Prochlorococcus* en BSQ. La contribución de *Prochlorococcus* a la biomasa fitoplanctónica sólo ha sido observada en estaciones más oceánicas (oligotróficas) donde la DVChl *a* llega a representar hasta 30% de la TChl *a* (García-Mendoza, datos no publicados). Asimismo, en muestras tomadas en la Bahía de Todos Santos la DVChl *a* es prácticamente indetectable (García-Mendoza, datos no publicados).

DVChl *a* can account for 30% of TChl *a* (García-Mendoza, unpublished data). Moreover, in samples taken at Todos Santos Bay (Baja California), DVChl *a* is almost undetectable (García-Mendoza, unpublished data). The high concentration of DVChl *a* reported by Millán-Núñez *et al.* (2004b) should therefore be validated by analyzing the error in the estimate of this pigment and, if possible, a chromatographic technique should be applied that physically separates Chl *a* for its quantification.

English translation by Christine Harris.

Por lo tanto, la alta concentración de DVChl *a* reportada por Millán-Núñez *et al.* (2004b) debe ser validada mediante el análisis del error en la estimación de este pigmento y, de ser posible, se debe aplicar una técnica cromatográfica que la separe físicamente de la Chl *a* para su cuantificación.

Ernesto García-Mendoza\* y Antonio Almazán-Becerril

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)

\* E-mail: ergarcia@cicese.mx

## Respuesta

En nuestra nota de investigación presentamos un ejemplo de variabilidad de la comunidad fitoplanctónica de BSQ con base en el análisis de pigmentos por HPLC que antes no se había realizado para muestras de la bahía. Los análisis de pigmentos por HPLC proporcionan más información que los tradicionales por espectrofotometría o fluorimetría. En los resultados de HPLC que mostramos, además de los pigmentos del fitoplancton, se reportó la DVChl *a*, que es un pigmento específico que sin duda indica la presencia de proclorofitas (Partensky *et al.*, 1999). Por lo tanto, en nuestra nota de investigación mencionamos que es la primera vez que se reporta la presencia de proclorofitas en BSQ. En nuestro escrito sólo mencionamos que la DVChl *a* sugiere fuertemente la presencia de *Prochlorococcus*; en él también se menciona que el grupo de los *Prochlorococcus* contribuyó hasta en un 40% al TChl *a*, lo cual fue un valor máximo y que de ninguna manera pretende ser representativo. Para todo BSQ, lo que se podría discutir es si *Prochlorococcus* ha sido introducida a la bahía por advección por las corrientes de marea, y si su presencia más bien podría representar eventos episódicos dado que el agua de la bahía es renovada por intercambio con aguas oligotróficas del océano adyacente. Esto, de nuevo, es materia de investigación para trabajos futuros. Los datos no publicados del autor del comentario apoyan nuestra conclusión sobre la presencia de *Prochlorococcus* en la bahía, ya que él menciona la presencia de estos organismos en una estación relativamente cercana a la boca de la bahía y sería lógico esperar que con el intercambio

## Reply

In our research note we present an example of the variability of the phytoplankton community at SQB based on HPLC pigment analysis, not previously done for samples from the bay. Pigment analyses by HPLC provide more information than the traditional spectrophotometric and fluorometric methods. The HPLC results obtained show, in addition to phytoplankton pigments, the presence of DVChl *a*, a specific biomarker for prochlorophytes (Partensky *et al.*, 1999). In the research note we therefore mention that this is the first report of the presence of prochlorophytes in SQB. We also mention that DVChl *a* strongly suggests the presence of *Prochlorococcus* sp. and that this group accounted for 40% of TChl *a*, a maximum value that was in no way considered to be representative. Considering that the bay water is renewed by mixing with oligotrophic waters from the adjacent ocean, whether *Prochlorococcus* was introduced into SQB by tidal advection and whether its presence represents episodic events are research topics for future works. The unpublished data referred to by the above authors support our conclusion regarding the occurrence of *Prochlorococcus* in SQB, since they mention the presence of these organisms at a station relatively close to the mouth and it would be logical to assume that as a result of the water exchange between the bay and ocean, they would also occur in the bay. The origin, however, of the high abundances of *Prochlorococcus* in the inner eastern part of the bay is still not clear.