

HIDROBIOLÓGICA

VOLUMEN 29

Número 3, 2019



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Septiembre-Diciembre de 2019



HIDROBIOLÓGICA

Revista del Departamento de Hidrobiología

VOLUMEN 29

Número 3

2019

Hidrobiológica es una publicación científica cuatrimestral del Departamento de Hidrobiología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa creada desde 1991. **Hidrobiológica** está dirigida a publicar investigaciones originales e inéditas sobre la hidrología, biología, pesquerías, acuicultura, contaminación y ecología de los recursos y sistemas acuáticos, realizados en México y en todo el mundo.

Hidrobiológica (ISSN 0188-8897) pertenece al Catálogo de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACyT desde 1994. Indizada en:

PERIÓDICA. Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.

Latindex. Catálogo-Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.

Redalyc. Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.

SciELO - Scientific Electronic Library Online.

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (ASFA).

ISI-Thomson: Biological Abstracts y Biosis Previews.

E&M Biology (Elsevier)

Journal Citation Reports - Thomson Reuters (JCR)

Página electrónica: <http://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/login>

HIDROBIOLÓGICA. Vol. 29 Año 2019, Número 3, septiembre-diciembre de 2019, es una publicación cuatrimestral editada por la Universidad Autónoma Metropolitana, a través de la Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Hidrobiología. Prolongación Canal de Miramontes 3855, Colonia Ex Hacienda San Juan de Dios, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14387, México, Ciudad de México y Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Colonia Vicentina, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09340, México, Ciudad de México, teléfono: 5804-6475.

Página electrónica de la revista: <http://hidrobiologica.izt.uam.mx> y dirección electrónica: rehb@xanum.uam.mx. Editora Responsable: Dra. Ma. del Rocío Torres Alvarado. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de Título No. 04-2010-072711181500-203.

ISSN para revista electrónica: 2448-7333, otorgado por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización del número: Dra. Ma. del Rocío Torres Alvarado, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Colonia Vicentina, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09340, México, Ciudad de México.

Fecha de última modificación: 30 de diciembre de 2019. Tamaño de archivo: 2.4 MB.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad Autónoma Metropolitana.

COMITÉ EDITORIAL

Responsable de la edición del número

Editor en Jefe: Dra. María del Rocío Torres Alvarado

Área de Ecosistemas Costeros. Depto. de Hidrobiología.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

EDITORES ASOCIADOS

ÁREA SISTEMÁTICA, FILOGENIA Y MORFOLOGÍA

Dr. Francisco F. Pedroche

Área de Ciencias Ambientales

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma (UAML)

Estado de México, México

Dr. Luis Manuel Guevara Chumacero

Área de Zoología. Depto. de Biología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dr. José Antolin Aké Castillo

Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías

Universidad Veracruzana (UV)

Xalapa, Veracruz, México

ÁREA DE MANEJO DE RECURSOS ACUÁTICOS

Dra. Ana Laura Ibañez Aguirre

Área de Producción Acuática. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa

Área de Producción Acuática. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dra. Ana Laura Lara Domínguez

Red de Ecología Funcional

Instituto de Ecología A.C. (INECOL)

Veracruz, México

ÁREA AMBIENTAL

Dra. Laura Georgina Calva Benítez

Área de Ecosistemas Costeros. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dra. Flor de María Cuervo López

Área de Microbiología. Depto. de Biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dr. Francisco José Gutiérrez Mendieta

Área de Ecosistemas Costeros. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

ÁREA DE ECOLOGÍA

M. en B. E. Sergio Humberto Álvarez Hernández

Área de Producción Acuática. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dr. Ramón Andrés López Pérez

Área de Ecosistemas Costeros. Depto. de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI)

CDMX, México

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

Área de Biología, Ecología y Manejo de Organismos
y Sistemas Acuáticos

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT)

Villahermosa, Tabasco, México

CONSEJO EDITORIAL

Dr. Saúl Álvarez Borrego
Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada (CICESE)
Ensenada, México.

Dr. Luis S. Álvarez-Lajonchère
Grupo Picimar,
La Habana, Cuba.

Dra. Guadalupe Judith De la Lanza Espino
Instituto de Biología, UNAM
CDMX, México.

Dr. Alfonso Vázquez Botello
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM
CDMX, México.

Dr. Gerald J. Bakus
Allan Hancock Foundation
University of Southern California
California, USA.

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada (CICESE)
Ensenada, México.

Dr. Carlos Cáceres Martínez
Universidad Autónoma de Baja California Sur
La Paz, México.

Dr. Roberto Civera Cerecedo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, México.

Dra. Laura Dávalos Lind
Baylor University, Texas
Texas, USA.

Dr. Enrique Reyes
East Carolina University
North Carolina, USA.

Dr. Fernando Díaz Herrera
Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada (CICESE)
Ensenada, México.

Dra. Martha E. Ferrario
Facultad de Ciencias Naturales y Museo La Plata
La Plata, Argentina.

Dr. Francisco J. García de León
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
La Paz, México.

Dr. Efraín Abraham Gutiérrez Galindo
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, México.

Dr. Jordi Leonart Aliberas
Institut de Ciències del Mar
Barcelona, España.

Dr. Fabio Massa
Experto FAO
Roma, Italia.

Dr. Alejandro Toledo Ocampo
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
CDMX, México.

Dr. José Vinicio Macías Zamora
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, México.

Dra. Marisa Mazari Hiriart
Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
CDMX, México.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
CDMX, México.

Dr. Federico Páez Osuna
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
Mazatlán, México.

Dra. Gabriela Parra Olea
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
CDMX, México.

Dra. Dolores Planas
Département des Sciences Biologiques
Université du Québec à Montréal
Québec, Canadá.

Dr. Víctor H. Rivera Monroy
Department of Oceanography and Coastal Sciences
Louisiana State University
Louisiana, USA.

Dr. Gilbert T. Rowe
Texas A&M University
Texas, USA.

Dr. Michael J. Smith
Simon Fraser University
Vancouver, Canadá.

Dra. Mutue Toyota Fujii
Instituto de Botânica São Paulo
São Paulo, Brasil.

Dr. Martin F. Wojciechowski
Arizona State University
Arizona, USA.

Dr. Giuseppe C. Zuccarello
Victoria University of Wellington
Wellington, Nueva Zelanda.

HIDROBIOLÓGICA

Revista del Departamento de Hidrobiología de la
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

ÍNDICE AL VOLUMEN 29, NÚMERO 3 • 2019

- De la Cruz-Leyva Ma. C., J. U. González-de la Cruz, T. Durán-Mendoza, S. López-Martínez,
A. I. Corona-Cruz, M. Zamudio-Maya y R. A. Rojas-Herrera**
Bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, Mexico. 101-108
- Hernández-Almeida O. U., K. M. Estrada-Gutiérrez, D. A. Siqueiros-Beltrones y E. A. Inda-Díaz**
Composición de especies de diatomeas en la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*
en un sistema estuarino..... 109-127
- Góngora-Gómez A. M., P. A. Sandoval-Rivera, L. C. Villanueva-Fonseca, M. López-Meyer,
J. C. Sainz-Hernández, L. G. Espinosa-Alonso, D. C. Escobedo-Urías, J. A. Hernández-Sepúlveda,
H. Rodríguez- González y M. García-Ulloa**
Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* de la costa central
de Sinaloa, México 129-136
- Ardila-Poveda L. S.**
Taxocenosis macroalgales indicadoras de calidad del agua en sistemas costeros 137-153
- Cuervo-González R., P. San Martín del Angel y L. Covarrubias**
Crecimiento alométrico y disminución de la capacidad de regeneración de la aleta pectoral
en *Polypterus senegalus* terrestizados 155-161
- Cruz-Ramírez A. K., M. Á. Salcedo, A. J. Sánchez, J. de D. Mendoza, E. Barba, N. Álvarez-Pliego
y R. Florido**
Variación intra-anual de la clorofila-*a* y nutrientes en un sistema río-llanura de inundación hidráulicamente
perturbado en la cuenca del río Grijalva 163-170
- De la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria, R. Martínez-García,
J. M. Piña-Gutierrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana y E. Peña**
Caracterización y mejoramiento de la harina de *Cannavalia ensiformis* como alimento balanceado
para *Oreochromis niloticus* 171-179

Rumahlatu D., A. Duran-Corebima, M. Amin y F. Rohman

Efecto del cadmio sobre la concentración y expresión de la proteína TNF- α en el erizo marino

Diadema setosum (Leske, 1778).....181-188

Paz-Rodríguez Y. A., M. T. Villalejo-Fuerte, E. A. Chávez, J. A. Tamayo-Fonseca, A. Campo-Castro y N. Vélez-Arellano

Biología reproductiva de *Pterois volitans* in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba189-196

NOTA CIENTÍFICA

Santamaría-Damián S., E. I. Romero-Berny, C. Tovilla-Hernández y M. E. Gallegos-Martínez

Registros recientes de *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) en la costa del Pacífico mexicano con notas sobre su distribución y estado de conservación.....197-202

Índice del volumen203-204

Índice de autores205-206

HIDROBIOLÓGICA

A Journal from Departamento de Hidrobiología de la
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

VOLUME INDEX 29, NUMBER 3 • 2019

**De la Cruz-Leyva Ma. C., J. U. González-de la Cruz, T. Durán-Mendoza, S. López-Martínez,
A. I. Corona-Cruz, M. Zamudio-Maya and R. A. Rojas-Herrera**

Flora bacteriana asociada al *Octopus maya* comercial capturado en la Península de Yucatán, México 101-108

**Hernández-Almeida O. U., K. M. Estrada-Gutiérrez, D. A. Siqueiros-Beltrones
and E. A. Inda-Díaz**

Diatom species composition in the *in situ* diet of the placer oyster *Crassostrea corteziensis*
in an estuarine system..... 109-127

**Góngora-Gómez A. M., P. A. Sandoval-Rivera, L. C. Villanueva-Fonseca, M. López-Meyer,
J. C. Sainz-Hernández, L. G. Espinosa-Alonso, D. C. Escobedo-Urías, J. A. Hernández-Sepúlveda,
H. Rodríguez- González and M. García-Ulloa**

Prevalence of *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) in the callista clam *Megapitaria squalida* from the central coast
of Sinaloa, Mexico 129-136

Ardila-Poveda L. S.

Macroalgal taxocoenosis as indicators of water quality in coastal systems..... 137-153

Cuervo-González R., P. San Martín del Angel and L. Covarrubias

Allometric growth and reduced pectoral fin regeneration rate in terrestrialized *Polypterus senegalus*..... 155-161

**Cruz-Ramírez A. K., M. Á. Salcedo, A. J. Sánchez, J. de D. Mendoza, E. Barba, N. Álvarez-Pliego
and R. Florido**

Intra-annual variation of chlorophyll-*a* and nutrients in a hydraulically perturbed river-floodplain system
in the Grijalva River basin 163-170

**De la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria, R. Martínez-García,
J. M. Piña-Gutierrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana and E. Peña**

Characterization and improvement of *Cannavalia ensiformis* meal as balanced feed
for *Oreochromis niloticus*..... 171-179

Rumahlatu D., A. Duran-Corebima, M. Amin and F. Rohman

Effect of cadmium on the concentration and expression of TNF- α protein in sea urchin
Diadema setosum (Leske, 1778).....181-188

**Paz-Rodríguez Y. A., M. T. Villalejo-Fuerte, E. A. Chávez, J. A. Tamayo-Fonseca,
A. Campo-Castro and N. Vélez-Arellano**

Reproductive biology of *Pterois volitans* in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba189-196

SCIENTIFIC NOTES

Santamaría-Damián S., E. I. Romero-Berny, C. Tovilla-Hernández and M. E. Gallegos-Martínez

Recent records of *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) on the Mexican Pacific coast with notes on its distribution
and conservation status.....197-202

Volume 29 index203-204

Author index205-206

Bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, Mexico

Flora bacteriana asociada al *Octopus maya* comercial capturado en la Península de Yucatán, México

Ma. Concepción de la Cruz-Leyva¹, José Ulises González-de la Cruz¹, Temani Durán-Mendoza¹, Sugey López-Martínez², Alma I. Corona-Cruz³, Marcela Zamudio-Maya³ and Rafael A. Rojas-Herrera³

Recibido: 11 de agosto de 2017.

Aceptado: 23 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

Background: Octopus is a fishery product of economic importance worldwide, the main species caught on the coast of the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea are *Octopus maya* and *O. vulgaris*, the first represents up to 95 % of national production. **Goals:** Identify the bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, using PCR-DGGE. **Methods:** From the metagenomic DNAs (mDNAs) extracted from samples representative of the octopus muscle, PCR products were synthesized with universal primers for bacteria (gc338F and 518R) and specific primers for Phylum Firmicutes (FirF: 369 and gcFirR: 1244). They were separated by electrophoresis in denaturing gradient gels (DGGE). The fragmented DNAs were recovered by elution, amplified (338F / 518R and FirF: 369 / FirR: 1244), sequenced and analyzed phylogenetically. **Results:** The sequences amplified with universal primers, after the DNA fragmentation by DGGE were associated with *Psychrobacter urativorans*, *Psychrobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudoalteromonas* sp, *Shewanella* sp, *Shewanella baltica*, *Klebsiella oxytoca*, *Vibrio aestuarianus*, *Photobacterium* sp, *Flavobacterium* sp, *F. antarcticum*, *Bizonia* sp, *Flavobacteriaceae bacterium*, *Bacillus* sp, *C. divergens*, *Cetobacterium somerae*, *Psychrilyobacter atlanticus*, *Salinimicrobium* sp as well as, *Flavobacteriaceae* not yet classified. In the sequences amplified with specific primers (Phylum Firmicutes) were identified: *Carnobacterium* sp, *Lactococcus piscium* *Lactococcus* sp, and *Vagococcus* sp **Conclusion:** The bacterial genus detected have been reported in samples from marine environments; therefore, can be part of the native microbial diversity associated with commercial *O. maya* captured in the Yucatan Peninsula, Mexico.

Keywords: Bacterial flora, Octopus, PCR-DGGE, phylotypes

RESUMEN

Antecedentes: El pulpo es un producto pesquero de importancia económica a nivel mundial, las principales especies capturadas en el litoral del Golfo de México y el mar Caribe son *Octopus maya* y *O. vulgaris*, el primero representa hasta el 95 % de la producción nacional. **Objetivo:** Identificar la flora bacteriana asociada al *Octopus maya* comercial capturado en la Península de Yucatán, utilizando PCR-DGGE. **Métodos:** A partir de los ADN metagenómicos (ADNmg) extraídos de muestras representativas del músculo del pulpo, se sintetizaron productos de PCR con iniciadores universales para bacterias (gc338F y 518R) e iniciadores específicos para el filo Firmicutes (FirF:369 y gcFirR: 1244). Mismos que fueron separados por electroforesis en geles de gradiente desnaturante (DGGE). Los ADN fragmentados se recuperaron por elución, se amplificaron (338F / 518R y FirF: 369 / FirR: 1244), se secuenciaron y analizaron filogenéticamente. **Resultados:** Las secuencias amplificadas con iniciadores universales, después de la fragmentación del ADN por DGGE se asociaron con *Psychrobacter urativorans*, *Psychrobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudoalteromonas* sp, *Shewanella* sp, *Shewanella baltica*, *Klebsiella oxytoca*, *Vibrio aestuarianus*, *Photobacterium* sp, *Flavobacterium* sp, *F. antarcticum*, *Bizonia* sp, *Flavobacteriaceae bacterium*, *Bacillus* sp, *Carnobacterium divergens*, *Cetobacterium somerae*, *Psychrilyobacter atlanticus*, *Salinimicrobium* sp, así como, *Flavobacteriaceae* aún no clasificada. En las secuencias amplificadas con iniciadores específicos (filo Firmicutes) se identificaron: *Carnobacterium* sp, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus* sp y *Vagococcus* sp. **Conclusión:** Los géneros bacterianos detectados han sido reportados en muestras de ambientes marinos, por lo cual, pueden ser parte de la diversidad microbiana nativa asociada al *O. maya* comercial capturado en la Península de Yucatán, México.

Palabras clave: Flora bacteriana, pulpo, PCR-DGGE, filotipos

¹ Laboratorio de Alimentos, División Académica Multidisciplinaria de los Ríos, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km 1, carretera Tenosique-Estapilla, Tenosique, Tabasco, 86901. México.

² División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km. 0.5 S/N, carretera Villahermosa-Cárdenas, Ranchería Emiliano Zapata, Villahermosa, Tabasco, 86150. México.

³ Laboratorio de Biotecnología, Campus de Ciencias Exactas e Ingenierías, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte, Km 33.5, Tablaje Catastral No.13615, Col. Chuburna de Hidalgo Inn, Mérida, Yucatán, 97203. México.

*Corresponding author:

Ma. Concepción de la Cruz-Leyva: e-mail: concepcion.delacruz@ujat.mx

To quote as:

De la Cruz-Leyva Ma. C., J. U. González-de la Cruz, T. Durán-Mendoza, S. López-Martínez, A. I. Corona-Cruz, M. Zamudio-Maya & R. A. Rojas-Herrera. 2019. Bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hidrobiológica* 29 (3): 101-108.

INTRODUCTION

In 2014, Mexico ranked 16th among the main countries producing fish resources worldwide. A wide range of fisheries are exploited in the country, ranging from octopus, tuna, shrimp, lobster, squid, and sardine; Spain, Italy, and Japan are the largest consumers, and importers of these fishes' species. Morocco and Mauritania are the principal Octopus exporters (FAO, 2014). In Mexico, the states of Campeche and Yucatan represent 94 % of the national catch, which in 2016 was more than 38 thousand tons. Currently, Mexico is positioned in the third octopus producer in the world (CONAPESCA, 2017). Fishery products are highly susceptible to microbial growth due to the chemical composition (proteins, moisture, and lipids), aquatic habitat and post-harvest handling (Adedeji *et al.*, 2012). Microorganisms can have both positive and negative effects on food industry systems. Many are used as probiotic agents, quality indicators and flavor enhancers (de la Cruz-Leyva *et al.*, 2015) or as elements in a variety of biotechnological processes (Hernández *et al.*, 2016). Others negatively affect product quality by acting as deteriorating agents. A large proportion of gastroenteritis and food poisoning cases worldwide are caused by ingestion of uncooked fishery products contaminated with pathogenic agents (Silveira, 2016).

Plate culture and biochemical tests are the most common methods for microbial analysis and identification in different food matrices, even though results document only a minority of the microbial community (Kirkup, 2013). In recent years, a number of culture independent methods have come into use in which DNA samples are used to amplify the rRNA 16S gene by PCR (Nübel *et al.*, 1999), and then analyzed using genetic fingerprint methods such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (de la Cruz-Leyva *et al.*, 2011), Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) and Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and third generation sequencing methods. These methods have allowed the characterization of culturable and unculturable bacterial populations in different complex samples (Fakruddin & Mannan, 2013). The DGGE method is a simple genetic fingerprint method able to separate small DNA fragments of the same size but with different sequences (Muyzer & Smalla, 1998). It has been widely used for identifying bacterial flora in environmental samples and applied to study microbial communities in fishery resources attention (Wu *et al.*, 2012), although cephalopods have received little attention.

The octopus fishery is significant economic activity on the coasts of the Yucatan Peninsula, Mexico. Octopus has recently served as a model for research addressing population density and dynamic (Gamboa-Álvarez *et al.*, 2015), physiology (Martínez *et al.*, 2014; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2013), development (Noyola *et al.*, 2013), feeding (Linares *et al.*, 2015), nutrition (Tercero *et al.*, 2015), and captive breeding and production (Baeza-Rojano *et al.*, 2013). No research has been done to date on the bacterial community associated with this resource, this information is essential to establishing adequate quality controls for the detection of undesirable microflora during product storage, processing, and marketing. The goal of this study was to characterize the bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, using PCR-DGGE.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. In this work, 36 commercial samples of *O. maya* were collected in the reception area of a fish products packing company located in Merida Yucatan, Mexico; following the Mexican regulations for the capture, handling, and transportation of this samples (NOM-109-SSA1-1994). Criteria in the selection of the samples: that the specimens did not have more than six hours of capture and that the cold chain had been maintained, from its capture to the packing company of fishery products. All specimens were captured on the coast of the Gulf of Mexico (August to December 2008), located in the Yucatan Peninsula. It occupies a territory of approximately 125,000 km², is located in southeastern Mexico and divides the Gulf of Mexico from the Caribbean Sea in the extreme southeast of North America and northern Central America.

The octopus samples collected in the processing plant of fishery products, were transferred to the laboratory at -10 °C in a time not exceeding 60 min, in the laboratory were stored at -20 °C until use.

Sample preparation. 20 G of the surface tissue of each sample was mixed with 1X TEN buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0) at a 1:1 ratio and homogenized for 1 min a vortex with the highest setting. A 1500 µl aliquot was taken and centrifuged at 16270 x g for 8 min at 28 °C, the supernatant discarded and the pellet suspended in 1 ml 1X TEN buffer. This mixture was centrifuged at 16270 x g for 5 min at 28 °C, and the pellet was stored at -20 °C until use.

DNA extraction. Extraction of mgDNA was done following a silica-based method described by Rojas-Herrera *et al.* (2008). Initially, 1 ml of 1X TEN buffer was added to the pellet and vigorously shaken for 15 sec. Then, 10 µl of 10 % lysozyme (10 mg lysozyme/ml TE, 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0) was added and the solution incubated for 30 min at 37 °C with gentle mixing every 10 min. The solution was then cooled by placing in an ice-alcohol bath for 10 min and then incubated for 5 min at 65 °C, a process which was repeated three times. After the third repetition, 100 µl of 20 % (w/v) SDS were added, the solution was agitated for 15 sec by manual inversion, incubated for 20 min at 30 °C and centrifuged for 10 min under the above conditions. A total of 400 µl of 5 M potassium acetate were added to the supernatant, the solution was incubated for 5 min at 65 °C and then placed in an ice-alcohol bath for 20 min. The solution was centrifuged at 16270 x g for 15 min at 10 °C. The aqueous phase was transferred to a sterile tube, 200 µl of 4 % (w/v) silicium dioxide (SiO₂) was added, the tube was agitated for 3 min by inversion and centrifuged at 16270 x g for 2 min at 28 °C. The resulting pellet was washed twice with 1 ml of 70 % ethanol, centrifuged each time under the above conditions and the alcohol residues evaporated. The pellet was then suspended in 50 µl sterile distilled water and incubated for 5 min at 55 °C with agitation every 1 min. This suspension was centrifuged for 2 min under the above conditions, the aqueous phase recovered without disturbing SiO₂, and the extracted DNA stored at -20 °C until use. The DNA presence was verified by 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis dyed with ethidium bromide (0.3 µg/ml) together with a carrier solution (1:1 ratio). Lambda DNA/Hind III ladder molecular marker was used as a reference. Electrophoresis was run with 1X TAE buffer (50X stock solution: 24.2 % Tris base, 5.71 % glacial acetic acid, 3.72 % Na₂EDTA2H₂O) for 2 h at 60 V. Gels were viewed under a UV transilluminator and the image stored in an imager (Gel Doc XR system, BioRad) using the Quantity One program (BioRad Imaging

Systems). To estimate DNA purity and concentration, it was diluted in sterile, ion-free water (ddH₂O) at a 1:250 ratio and absorbance read at 260 and 280 nm in a spectrophotometer.

DNA amplification. The V3 region of the 16S rRNA gene was amplified using the primers gc338F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG-GGGCACGGGGGCTCTAC GGGAGGCAGCAG-3') and 518R (5'-ATTACGCGGCTGCTGG-3') (Muyzer *et al.*, 1993). The underlined sequence in the gc338F primer corresponds to the GC clamp. The reaction mixture contained 100 ng DNA sample, 2.5 µl 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs mixture (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.2 mM of each primer, 4.5 mM MgCl₂ (Promega), 0.1 % bovine serum albumin (BSA) and 1 U Taq polymerase DNA (Invitrogen™). The PCR run was as follows: denaturation, 94 °C for 5 min (1 cycle); touchdown at 10 °C above alignment temperature (65 °C), temperature lowered by 1 °C/min until 55 °C and increased to 72 °C for 1 min (10 cycles); denaturation, 94 °C for 1 min; alignment, 55 °C for 1 min; extension, 72 °C for 1 min (20 cycles); final extension, 72 °C for 10 min. The Phylum Firmicutes 16S rRNA fragments were amplified using the primers FirF: 369 (5'-GGAGGCAGCAGTAGGNAATCTTC-3') and gcFirR: 1244 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGG CGGGCGGGCGGGGGCACGG-GGGGTAGCCARGTCATAAGGGGCATG-3') (850 bp) (Rojas-Herrera *et al.*, 2008). The reaction mixture contained 100 ng DNA sample, 4.5 mM MgCl₂, 0.1 % BSA, 2.5 µl 5X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 mM of each primer, 1 U Taq polymerase (Promega®) and sterile double-distilled water to complete final reaction volume to 25 µl. The run was as follows: denaturation, 94 °C for 5 min (1 cycle); amplification, 94 °C for 40 sec, alignment at 63 °C for 60 sec, extension at 72 °C for 30 sec (35 cycles); final extension at 72 °C for 7 min (1 cycle). Amplicon verification was done with 1.8 % agarose gel for the V3 region and with 1.5 % agarose gel for the Phylum Firmicutes fragments, using the conditions described in the previous section, except for the use of 0.5X Tris borate-EDTA (TBE) as the electrophoresis run buffer.

DGGE. Amplicon separation was done by DGGE with a Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad), following manufacturer instructions and the protocol described by Muyzer *et al.* (1993). The 200 bp amplicons were fragmented in 8 % polyacrylamide gel (w/v) with a 30 to 60 % urea formamide denaturing gradient (100 % corresponds to 7 M urea and 40 % deionized formamide (w/v)). For each well 75 µl (500 ng) were mixed with 30 µl 5X load buffer. Electrophoresis was run in 1X TAE buffer at 60 V for 22 h at 60 °C. Firmicutes (900 bp) fragments separation were done in 6 % polyacrylamide gel (w/v) with a 35 to 60 % urea-formamide denaturing gradient. Amplicon load volume and electrophoresis conditions were as described above.

Gels were dyed with a 0.5X SYBR GOLD solution (Invitrogen™, Eugene, Oregon, USA) (5 µl/100 ml 1X TAE buffer) for 45 min and viewed in a UV transilluminator. Images were stored as described previously. Unique bands in the banding patterns were cut and eluted for 16 h in 50 µl sterile double-distilled water at 4 °C. The eluted DNA was amplified by PCR using the previously described conditions, with the exception of the addition of BSA and MgCl₂ (3 mM for universal fragments, 4 mM for Phylum Firmicutes fragments). The amplicons derived from the cut and DGGE eluted bands were sequenced at an outside laboratory (Macro-gen, South Korea).

Sequence analysis. Management and refinement of the universal (±150 bp) and Phylum Firmicutes (±650 bp) fragments were done with the BioEdit program, while taxonomic classification was done with the

BLAST program with the Ribosomal Database Project (RDP) and GenBank databases. Nearest neighbors were calculated in the RDP database (Classifier and Sequence Match tools, ver. 10.0) (Cole *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 2005). A phylogenetic association was observed using a maximum parsimony tree with a 100 bootstrap test run applied with the WinClada program (Nixon, 1999), and including *Micrococcus luteus* as an outgroup.

RESULTS

The DNA isolated from the 36 *O. maya* samples exhibited high molecular weight (average 23,130 kb) with an average purity and concentration of 1.1294 ± 39 and 99 ± 16 µg/ml respectively. The phylogenetic study of the bacterial flora associated with *O. maya* samples was developed from 25 of the 37 sequences obtained because 12 of them exhibited noisy sequencing and low-quality chromatograms.

Taxonomic classification showed 60 % belongs to Phylum Proteobacteria, 24 % to Bacteroidetes (consisting of *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* [CFB] group) and 8 % each with Phylum Fusobacteria and Firmicutes (Table 1). For the 25 partial DNA sequences (±150 bp) describing overall bacterial flora, the phylogenetic association was determined by applying maximum parsimony with the 16S rRNA gene sequences for the 31 nearest neighbors as calculated with the RDP; 16S rRNA gene sequences for *M. luteus* (*Actinobacteria*) were used as the outgroup.

Only 19.84 % (775) of the 3907 -character alignment was phylogenetically informative and these characters generated a total of 16 equally parsimonious trees (L=3039) (figure not shown).

This phylogenetic grouping showed the bacterial flora associated with the Octopus samples to be composed mainly of Gammaproteobacteria: *Psychrobacter urativorans* (YucOct24), *Psychrobacter* sp (YucOct25 and YucOct27), *Pseudomonas* sp (YucOct19), *Pseudoalteromonas* sp (YucOct21 and YucOct20), *Shewanella* sp (YucOct4 and YucOct26), *S. baltica* (YucOct3 and YucOct5), *K. oxytoca* (YucOct28), *Vibrio aestuarianus* (YucOct11) and *Photobacterium* sp (YucOct8, YucOct9 and YucOct10). Of secondary importance were phylotypes related to the CFB group: *F. antarcticum* (YucOct23), *Flavobacterium* sp (YucOct17), *Bizionia* sp (YucOct13 and YucOct14), *Salinimicrobium* sp (YucOct1), and uncultured *Flavobacteriaceae* (YucOct18). In a minor proportion, sequences were also identified affiliated as *Cetobacterium somerae* (YucOct6) and *Psychrilyobacter atlanticus* (YucOct16) (Phylum Fusobacteria). The species *Bacillus* sp (YucOct12) and *C. divergens* (YucOct7) were affiliated with Phylum Firmicutes.

Of the 30 bands eluted from the banding profiles describing the Phylum Firmicutes only 17 could be amplified. The exact cause is still unclear, although it may be related to fragment size (900 bp) since one of DGGE's limitations is its separation of relatively small (200 to 700 bp) fragments (Muyzer *et al.*, 1998). As a result, the phylogenetic study was done using the recovered and sequenced fragments. The Bayesian analysis implemented with the RDP database classifier tools showed most of these sequences belong to the *Carnobacteriaceae* family (53 %), followed by the *Streptococcaceae* (35.2 %) and *Enterococcaceae* (11.8 %) families (Table 2). An affiliation of the 17 partial Phylum Firmicutes group sequences (±650 bp) recovered from the DGGE fragments was done by phylogenetic analysis with the maximum parsimony method using the 16S rRNA gene sequences for the 20 nearest neighbors as calculated in the RDP; 16S rRNA gene sequences for *M. luteus* were

used as the outgroup. Of the 1312 characters in the alignment, only 26.2 % (428) were phylogenetically informative. The maximum parsimony tree (L=998) showed that 59 % of the bacterial flora associated with the *Octopus* samples matched Phylum Firmicutes (figure not shown): 47 % *Carnobacterium* sp (MaCCL1, MaCCL2, MaCCL6, MaCCL7, MaCCL12, MaCCL13, MaCCL14, and MaCCL15) and 6 % uncultured *bacterium* (MaCCL3). A further 35.2 % of the analyzed sequences matched *Lactococcus piscium* (MaCCL8 and MaCCL9), *Lactococcus* sp (MaCCL4, MaCCL5, MaCCL10, and MaCCL11), and two phylotypes were identified as *Vagococcus* sp (MaCCL16 and MaCCL17). This phylogenetic association analysis of the recovered and analyzed bacterial mgDNA sequences extracted from commercial Octopus samples produced the description of the bacterial flora associated with this fishery product.

DISCUSSION

Genetic fingerprint molecular techniques have been proposed for the study of the structure of bacterial communities associated with complex samples; including microorganisms that have not yet been cultured in the laboratory (Piterina & Pembroke, 2013). Use of universal PCR products in DGGE analysis allows for detection of 90 to 99 % of numerous species in a community, which is why specific primers are needed to study specific microorganisms (Mühling *et al.*, 2008).

From the phylogenetic analysis of the sequences recovered during this investigation, part of the bacterial flora associated with the *O. maya* was observed, which were grouped to Phylum Proteobacteria (60 %), Bacteroidetes (24 %), Fusobacteria and Firmicutes (the last two 8 % each). This it coincides with the detected previously, during the stan-

Table 1. Taxonomic classification of 25 sequences amplified with universal primers (338F / 518R) recovered from elution of fragment DNA by PCR-DGGE^a.

Phylotype	GenBank Accession Number	Phylum	Genus or species	Similarity (%) ^b
YucOct1	HM007325	Bacteroidetes	<i>Salinimicrobium</i> sp	94
YucOct3	HM007326	Proteobacteria	<i>Shewanella baltica</i>	100
YucOct4	HM007327	Proteobacteria	<i>Shewanella</i> sp	98
YucOct5	HM007328	Proteobacteria	<i>S. baltica</i>	100
YucOct6	HM007329	Fusobacteria	<i>Cetobacterium somerae</i>	97
YucOct7	HM007330	Firmicutes	<i>Carnobacterium</i> sp	100
YucOct8	HM007331	Proteobacteria	<i>Photobacterium</i> sp	98
YucOct9	HM007332	Proteobacteria	<i>Photobacterium</i> sp	99
YucOct10	HM007333	Proteobacteria	<i>Photobacterium</i> sp	97
YucOct11	HM007334	Proteobacteria	<i>Vibrio aestuarianus</i>	97
YucOct12	HM007335	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp	93
YucOct13	HM007336	Bacteroidetes	<i>Bizionia</i> sp	97
YucOct14	HM007337	Bacteroidetes	<i>Bizionia</i> sp	99
YucOct16	HM007338	Fusobacteria	<i>Psychrilyobacter atlanticus</i>	97
YucOct17	HM007339	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium</i> sp	99
YucOct18	HM007340	Bacteroidetes	Uncultured <i>bacterium</i>	95
YucOct19	HM007341	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp	100
YucOct20	HM007342	Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	100
YucOct21	HM007343	Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	100
YucOct23	HM007344	Bacteroidetes	<i>Flavobacterium antarcticum</i>	100
YucOct24	HM007345	Proteobacteria	<i>Psychrobacter urativorans</i>	99
YucOct25	HM007346	Proteobacteria	<i>Psychrobacter</i> sp	98
YucOct26	HM007347	Proteobacteria	<i>Shewanella</i> sp	96
YucOct27	HM007348	Proteobacteria	<i>Psychrobacter</i> sp	96
YucOct28	HM007349	Proteobacteria	<i>Klebsiella oxitoca</i>	98

^a The DNA was extracted from samples of commercial *O. maya* captured on the coast of the Gulf of Mexico (Yucatan Peninsula).

^b Last taxonomic range with which the sequence has a similarity equal to or greater than 80 %, based on the RDP Bayesian classifier.

^c Without classification in this range. Sequences with less than 80 % similarity with the following range.

standardization of an RNA isolation and purification method for the study of the bacterial flora of *O. maya* samples; where the Phylum Proteobacteria (75 %), including the families *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae*, were those that were identified mainly (de la Cruz-Leyva *et al.*, 2011). In a study conducted in *O. variabilis*, they also reported the presence of Phylum Proteobacteria (63.5 %), Bacteroidetes (18.6 %) and Firmicutes (3.5 %), among others, using Illumina Miseq sequencing and quantified by real-time PCR (Lee *et al.*, 2017).

The octopus has largely benthic habits, which keep it in constant contact with marine sediments; which may, in turn, explain the link between marine and sedimentary ecosystems in its bacterial community diversity. In marine sediments have been detected Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, and Bacteroidetes, and dominated mainly by the genus *Pseudoalteromonas* (40.5 %), *Bacillus* (36.3 %) and *Photobacterium* (5.8 %) (Li *et al.*, 2017). It has also been reported that the diversity of microbiota and bacterial loads in octopuses is influenced by environmental factors such as water temperature and geographic location (Lee *et al.*, 2017). The sex of the animal could also influence the bacterial diversity contained in Octopus samples. It has been mentioned that the predominant species in the female octopus are *Vibrionaceae* and *Streptococcaceae*, whereas only *Vibrionaceae* were identified more frequently in male octopuses (Lehata *et al.*, 2015). In this research, the presence of *V. aestuarianus* was also detected in 56 % of the octopus samples analyzed, this bacteria has been isolated from mussels, plankton, sediments, and seawater. It is one of the main pathogens in the

culture of Pacific oysters *Crassostrea gigas* in France, Spain, and Italy, causing considerable economic losses (Travers *et al.*, 2017). Therefore, it is corroborated that the bacterial diversity detected in this study is consistent with the microflora described in environments, resources and marine products.

It has been mentioned that lactic acid bacteria (LAB) make up only a small proportion of any bacterial community, which makes it difficult to detect when PCR is used with universal primers, for example in human feces (Walter *et al.*, 2001).

In the present work, two LAB (*Bacillus* sp and *C. divergens*) were detected from universal primers. However, with specific primers (Phylum Firmicutes) 17 sequences related to LAB (*Carnobacterium* sp, *L. piscium*, *Lactococcus* sp, and *Vagococcus* sp) were identified in *O. maya*.

Genetic fingerprint methods allow the identification of all the microorganisms in fishery resources, both those acquired in the environment and during handling, storage and export. For this reason, the PCR-DGGE method is recommended as a traceability tool. Traceability studies allow the detection of functional microorganisms with biotechnological potential; as well as the timely detection of spoilage bacteria in fishery products and identification of pathogenic microorganisms that can affect the health of consumers.

Table 2. Taxonomic classification of 17 sequences amplified with primers for Phylum Firmicutes (FirF: 369 / FirR: 1244) recovered from elution of fragment DNA by PCR-DGGE^a.

Phylotype	GenBank Accession Number	Family	Genus or species	Similarity (%) ^b
MaCCL1	HM007308	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	99
MaCCL2	HM007309	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	100
MaCCL3	HM007310	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	100
MaCCL4	HM007311	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> sp	96
MaCCL5	HM007312	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> sp	100
MaCCL6	HM007313	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	99
MaCCL7	HM007314	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	99
MaCCL8	HM007315	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	100
MaCCL9	HM007316	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	99
MaCCL10	HM007317	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> sp	99
MaCCL11	HM007318	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> sp	98
MaCCL12	HM007319	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	99
MaCCL13	HM007320	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	98
MaCCL14	HM007321	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	96
MaCCL15	HM007322	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i> sp	93
MaCCL16	HM007323	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Vagococcus</i> sp	97
MaCCL17	HM007324	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Vagococcus</i> sp	87

^a The DNA was extracted from samples of commercial *O. maya* captured on the coast of the Gulf of Mexico (Yucatan Peninsula).

^b Last taxonomic range with which the sequence has a similarity equal to or greater than 80 %, based on the RDP Bayesian classifier.

This capacity is important for identifying particularly troublesome strains such as LAB. These have become problematic in aquaculture systems during the recent decades because they contain pathogenic strains which have caused infection and death in fish worldwide. Other LAB species identified from fish and *O. vulgaris* include *L. garvieae* (Fichi *et al.*, 2015; Meyburgh *et al.*, 2017), *L. raffinolactis*, *Streptococcus iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, *S. agalactiae*, *Carnobacterium* sp, *Enterococcus* “faecium” group, *Vagococcus fluvialis*, *V. carniphilus*, *V. salmoninarum*, and *Aerococcus* sp. Most of them are an opportunistic species that cause infections in fish and crustaceans (Michel *et al.*, 2007). The genus *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Vagococcus* were detected in this work.

On the other hand, it is important to mention that species of this genus have been suggested as probiotics in aquaculture (Lebreton *et al.*, 2013; Sequeiros *et al.*, 2015). Of particular interest is the identification of the LAB genus *Carnobacterium*, especially the species *C. divergens*, since it can tolerate high pressure (piezophile), freezing and thawing, also has properties anaerobic. *Carnobacterium* strains are commonly isolated from a variety of environments, vacuum-packed and modified-atmosphere packed (MAP) meats, and seafood products (e.g. cod, salmon and shrimp) (Macé *et al.*, 2013). For example, in a study of aerobic and anaerobic microbial communities of MAP salmon and coalfish by using multivariate analysis of the 16S rRNA gene with RT-PCR and T-RFLP, a strong association was observed between *Brochothrix thermosphacta* and *C. divergens* with salmon (Rudi *et al.*, 2004). However, this genus can also metabolize arginine and various carbohydrates, including chitin. It has been studied widely as a growth inhibitor for *Listeria monocytogenes* in fish and meat products and for its production of bacteriocins and tyramine, which inhibit deteriorating microflora (Leisner *et al.*, 2007). Study of the total microbial diversity in fishery products generate vital data for the control of food production; as well as the hazard analysis critical control point (Rudi *et al.*, 2004).

In general, the microorganisms of marine ecosystems are considered extremophiles, because they can withstand high or low temperatures, halotolerant, withstand high hydrostatic pressures, alkaline pH and even anoxic conditions; they have been studied extensively for having the capacity to produce enzymes, antimicrobial metabolites such as bacteriocins, exopolysaccharides (EPS), among others (Poli *et al.*, 2017). The properties of extremophile microorganisms are desirable since they can be used in biotechnological processes. In this sense, it is important to mention that of the genus or species detected in this work from the amplification with universal primers (*P. urativorans*, *Psychrobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudoalteromonas* sp, *Shewanella* sp, *S. baltica*, *K. oxytoca*, *V. aestuarianus*, *Photobacterium* sp, *Flavobacterium* sp, *F. antarcticum*, *B. paragorgiae*, *Salinimicrobium* sp, *Bacillus* sp, *C. divergens*, *Cetobacterium somerae*, *Psychrilyobacter atlanticus*, and uncultured *Flavobacteriaceae*), there are some genus that has been reported with some biotechnological characteristic. For example, species of the genus *Photobacterium* are psychrophiles, piezophile (*P. profundum*) and bioluminescent for example *P. phosphoreum*, some species live in symbiosis with marine organisms (*P. leiognath*) (Urbanczyk *et al.*, 2011). The genus *Pseudomonas* possesses a diversity of bacterial species of medical (pathogenic strains: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, among others) and biotechnology importance, has been isolated from different habitats (such as soils, fresh or marine water, plants, animals, biofilms, plankton, among others), thanks to its metabolic versatility (Özen & Ussery, 2012). Exopolysaccharides (EPS) is produced by bacteria of the genus

Pseudomonas, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Klebsiella* to adapt and remain in diverse environmental niches. These biopolymers are of interest due to their involvement in the formation of biofilms, the formation of capsules, virulence or their possible medical and industrial uses (Hay *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2016). Recently it was observed that EPS have the capacity to absorb heavy metals (mercury and cadmium) (Caruso *et al.*, 2018); *K. oxytoca* and *Shewanella* sp, synthesizes biogenic polysaccharide-iron hydrogel nanoparticles, known as Fe (III)-exopolysaccharide (Fe-EPS) (Kianpour *et al.*, 2016). These can provide important roles in redox capability in biogeochemical cycling, environmental bioremediation and wastewater treatment (Shan-Wei *et al.*, 2016).

Finally, it is important to mention that in the phylum of the Bacteroidetes (CFB) is a group that, like other genus mentioned here; is present in different types of habitats such as fresh water, oceans, coral, macroalgae, soils, compost, leaves gymnosperms and angiosperms, dairy products, activated sludge and gastrointestinal tract of animals (*Bacteroides thetaiotaomicron*) where they degrade complex polysaccharides. In marine environments, they have the ability to degrade proteins and complex carbohydrates and recalcitrant sequestered in particulate organic detritus and colonize surfaces. However, in the genus *Flavobacteria*, opportunistic pathogens have been reported that can cause polymicrobial infections (*Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, among others) in humans. On the other hand, species of the genus *Flavobacterium* (*F. psychrophilum*, *F. columnare*, *F. branchiophilum*, among others) have caused considerable economic losses in aquaculture farms and wild fish (Thomas *et al.*, 2011). In the present work, it was not possible to identify if any of the bacterial species detected in this research have adhered for the manipulation of the fishermen; since the bacterial genera detected in this investigation have been reported in different samples of marine environments. A previous study cited that the indigenous microbiota in the small octopus (*O. variabilis*) could inhibit the colonization of successional species (e.g. *V. vulnificus*) during storage (Lee *et al.*, 2017); it will be necessary to carry out more research to verify this theory. However, there is a strong possibility that the identified bacterial flora are part of the native microbial diversity of *O. maya* captured in the Yucatan Peninsula, which can be more analyzed for their biotechnological applications or in other cases, due to their adverse effects on the health of aquatic organisms.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to an anonymous fishery product packing plant for facilitating the sampling process. This research was partially supported by “Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Campeche”.

REFERENCES

- ADEDEJI, O. B., P. O OKERENTUGBA, H. C. INNOCENT-ADIELE & I. O. OKONKO. 2012. Benefits, Public Health Hazards and Risks Associated with Fish Consumption. *New York Science Journal* 5 (9): 33-61. DOI prefix: 10.7537.
- BAEZA-ROJANO, E., P. DOMÍNGUEZ, J. M. GUERRA-GARCÍA, S. CAPELLA, E. NOREÑA-BARROSO, C. CAAMAL-MONSREAL & C. ROSAS. 2013. Marine gammarids (Crustacea: Amphipoda): a new live prey to culture *Octopus*

- maya* hatchlings. *Aquaculture research* 44 (10): 1602-1612. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03169.x.
- CARUSO, C., C. RIZZO, S. MANGANO, A. POLI, P. D. DONATO, B. NICOLAUS, G. D. MARCO, L. MICHAUD & A. L. GIUDICE. 2018. Extracellular polymeric substances with metal adsorption capacity produced by *Pseudoalteromonas* sp. MER144 from Antarctic seawater. *Environmental Science and Pollution Research* 25 (5): 4667-4677. DOI: 10.1007/s11356-017-0851-z.
- CONAPESCA (COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA). 2017. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Edición SAGARPA. México. 300 p.
- COLE, J. R., B. CHAI, R. J. FARRIS, Q. WANG, S. A. KULAM, D. M. MCGARRELL, G. M. GARRITY & J. M. TIEDJE. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33 (1): D294-D296. DOI: 10.1093/nar/gki038.
- COLE, J. R., B. CHAI, T. L. MARSH, R. J. FARRIS, Q. WANG, S. A. KULAM, S. CHANDRA, D. M. MCGARRELL, T. M. SCHMIDT & G. M. GARRITY. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* 31 (1): 442-443.
- DE LA CRUZ-LEYVA, M. C., M. ZAMUDIO-MAYA, A. I. CORONA-CRUZ, J. U. GONZÁLEZ-DE LA CRUZ & R. ROJAS-HERRERA. 2011. A method for isolating RNA from metabolically active bacterial flora associated with octopus. *Letters in Applied Microbiology* 53 (1): 8-13. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03057.x.
- DE LA CRUZ-LEYVA, M. C., M. ZAMUDIO-MAYA, A. I. CORONA-CRUZ, J. U. GONZÁLEZ-DE LA CRUZ & R. ROJAS-HERRERA. 2015. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2 (4): 99-115.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges*. Rome. 243 p.
- FICHI, G., G. CARDETI, S. PERRUCCI, A. VANNI, A. CERSINI, C. LENZI, T. DE WOLF, B. FRONTE, M. GUARDUCCI & F. SUSINI. 2015. Skin lesion-associated pathogens from *Octopus vulgaris*: first detection of *Photobacterium swingsii*, *Lactococcus garvieae* and betanoda virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 115: 147-156. DOI: 10.3354/dao02877.
- GAMBOA-ÁLVAREZ, M. Á., J. A. LÓPEZ-ROCHA & G. R. POOT-LÓPEZ. 2015. Spatial analysis of the abundance and catchability of the red *Octopus maya* (Voss and Solis-Ramírez, 1966) on the continental shelf of the Yucatán Peninsula, México. *Journal of Shellfish Research* 34 (2): 481-492. DOI: 10.2983/035.034.0232.
- HAY, I. D., Y. WANG, M. F. MORADALI, Z. U. REHMAN & B. H. REHM. 2014. Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology* 16: 2997-3011. DOI: 10.1111/1462-2920.12389.
- HERNÁNDEZ, D. J. M., J. C. JIMÉNEZ, L. HIDALGO, L. DENDOOVEN, M. R. MARSCH & V. R. O. CAÑIZARES. 2016. Identificación morfológica y filogenética de un consorcio microbiano fotosintético de posible interés biotecnológico. *Hidrobiológica* 26 (2): 311-321.
- IEHATA, S., F. VALENZUELA & C. RIQUELME. 2015. Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean octopus (*Octopus mimus* Gould, 1852). *Aquaculture Research* 46 (4): 861-873. DOI: 10.1111/are.12240.
- KIRKUP, B. C. 2013. Culture-independence for surveillance and epidemiology. *Pathogens* 2 (3): 556-570. DOI: 10.3390/pathogens2030556.
- KIANPOUR S., A. EBRAHIMNEZHAD, M. MOHKAM, A. M. TAMADDON, A. DEHSHAHRI, R. HEIDARI & Y. GHASEMI. 2016. Physicochemical and biological characteristics of the nanostructured polysaccharide-iron hydrogel produced by microorganism *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Basic Microbiology* 57 (2): 132-140. DOI: 10.1007/s12033-017-0053-4.
- LEBRETON, F., M. D. VALENTINO, L. B. DUNCAN, Q. ZENG, M. A. MANSON, A. M. EARL & M. S. GILMORE. 2013. High-quality draft genome sequence of *Vagococcus lutrae* strain LBD1, isolated from the largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Genome Announcements* 1 (6): e01087-13. DOI: 10.1128/genomeA.01087-13.
- LEE, J., T. KIM, S. H. CHOI & B. KIM. 2017. Analysis of the bacterial microbiome in the small octopus, *Octopus variabilis*, from South Korea to detect the potential risk of foodborne illness and to improve product management. *Food research international* 102: 51-60. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.084.
- LEISNER, J. J., B. G. LAURSEN, H. PRÉVOST, D. DRIDER & P. DALGAARD. 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 592-613. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x.
- LI, Y., C. WU, M. ZHOU, E. T. WANG, Z. ZHANG, W. LIU, J. NING & Z. XIE. 2017. Diversity of Cultivable Protease-Producing Bacteria in Laizhou Bay Sediments, Bohai Sea, China. *Frontiers in Microbiology* 8: 405. DOI:10.3389/fmicb.2017.00405.
- LINARES, M., C. CAAMAL-MONSREAL, A. OLIVARES, A. SÁNCHEZ, S. RODRÍGUEZ, O. ZÚÑIGA, C. PASCUAL, P. GALLARDO & C. ROSAS. 2015. Timing of digestion, absorption and assimilation in octopus species from tropical (*Octopus maya*) and subtropical-temperate (*O. mimus*) ecosystems. *Aquatic Biology* 24 (2): 127-140.
- MACÉ, S., M. CARDINAL, E. JAFFRÉS, J. CORNET, V. LALANNE, F. CHEVALIER, T. SÉROT, M. F. PILET, X. DOUSSET & J.-J. JOFFRAUD. 2014. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled cooked whole tropical shrimp stored under modified atmosphere packaging. *Food Microbiology* 40: 9-17. DOI: 10.1016/j.fm.2013.11.018.
- MARTÍNEZ, R., C. P. GALLARDO, J. NAVARRO, A. SÁNCHEZ & C. CAAMAL-MONSREAL. 2014. Growth, survival and physiological condition of *Octopus maya* when fed a successful formulated diet. *Aquaculture* 426-427: 310-317. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.005.
- MEYBURGH, C. M., R. R. BRAGG & C. E. BOUCHER. 2017. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 123: 67-79. DOI: 10.3354/dao03083.
- MICHEL, C., C. PELLETIER, M. BOUSSAHA, D. G. DOUET, A. LAUTRAITE & P. TAILLIEZ. 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9): 2947-2955. DOI: 10.1128/AEM.01852-06.
- MÜHLING, M., J. WOOLVEN-ALLEN, M. J. COLIN & I. JOINT. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *International Society for Microbial Ecology* 2 (4): 379-392. DOI: 10.1038/ismej.2007.97.

- MUYZER, G. & K. SMALLA. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141. DOI: 10.1023/A:1000669317571.
- MUYZER, G., E. C. DE WAAL & A. G. UITTERLINDEN. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3): 695-700.
- NIXON, K. C. 1999. The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis. *Cladistics* 15 (4): 407-414. DOI: 10.1111/j.1096-0031.1999.tb00277.x.
- NOM-109-SSA1. 1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para análisis microbiológicos. Norma Oficial Mexicana, Secretaría de Salud Pública. DGN. 1-9 p.
- NOYOLA, J., C. CAAMAL-MONSREAL, F. DÍAZ, D. RE, A. SÁNCHEZ & C. ROSAS. 2013. Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of thermal biology* 38 (1): 14-19. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2012.09.001.
- NÜBEL, U., F. GARCÍA-PICHEL, M. KÜHL & G. MUYZER. 1999. Quantifying Microbial Diversity: Morphotypes, 16S rRNA Genes, and Carotenoids of Oxygenic Phototrophs in Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (2): 422-430.
- ÖZEN, A. I. & D.W. USSERY. 2012. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*?. *Microbial Ecology* 63 (2): 239-248. DOI: 10.1007/s00248-011-9914-8.
- PITERINA, A. V. & J. T. PEMBROKE. 2013. Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring. *ISRN Biotechnology*: 1-13. DOI:10.5402/2013/162645.
- POLI, A., I. FINORE, I. ROMANO, A. GIOIELLO, L. LAMA & B. NICOLAUS. 2017. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms* 5 (2): 25. DOI: 10.3390/microorganisms5020025.
- ROCA C., M. LEHMANN, C. A. V. TORRES, S. BAPTISTA, S. P. GAUDÊNCIO, F. FREITAS & M. REIS. 2016. Exopolysaccharide production by a marine *Pseudomonas* sp. strain isolated from Madeira Archipelago ocean sediments. *New biotechnology* 33 (4): 460-6. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.02.005.
- ROJAS-HERRERA, R., J. NARVÁEZ-ZAPATA, M. ZAMUDIO-MAYA & M. E. MENA-MARTÍNEZ. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology* 40(1):13-17. DOI: 10.1007/s12033-008-9061-8.
- RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, A., C. ROSAS, I. MÉNDEZ-LOEZA & U. MARKAIDA. 2013. Validation of growth increments in stylets, beaks, and lenses as ageing tools in *Octopus maya*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 449: 194-199. DOI: 10.1016/j.jembe.2013.10.001.
- RUDI, K., T. MAUGESTEN, S. E. HANNEVIK & H. NISSEN. 2004. Explorative multivariate analyses of 16s rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (8): 5010-5018. DOI: 10.1128/AEM.70.8.5010-5018.2004.
- SHAN-WEI L., S. GUO-PING, C. YUAN-YUAN & Y. HAN-QING. 2016. Redox properties of extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria. *Scientific Reports* 6 (39098): 1-7. DOI: 10.1038/srep39098.
- SILVEIRA, C. S. D., O. V. DE SOUSA & N. S. EVANGELISTA-BARRETO. 2016. Propagation of Antimicrobial Resistant *Salmonella* spp. in Bivalve Mollusks from Estuary areas of Bahia, Brazil. *Revista Caatinga* 29 (2): 450-457. DOI: 10.1590/1983-21252016v29n222rc.
- SEQUEIROS, C., M. E. GARCÉS, M. VALLEJO, E. R. MARGUET & N. L. OLIVERA. 2015. Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Archives of Microbiology* 197 (3): 449-458. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.02.002.
- TERCERO, J. F., C. ROSAS, M. MASCARO, G. POOT, P. DOMÍNGUEZ, E. NOREÑA, C. CAAMAL-MONSREAL, C. PASCUAL, J. ESTEFANELL & P. GALLARDO. 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture* 448: 234-242. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.023.
- THOMAS, F., J. H. HEHEMANN, E. REBUFFET, M. CZIZEK & G. MICHEL. 2011. Environmental and Gut *Bacteroidetes*: The Food Connection. *Frontiers in Microbiology* 2 (93): 1-16. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00093.
- TRAVERS, M. A., D. TOURBIEZ, L. PARIZADEH, P. HAFFNER, A. KOZIC-DJELLOULI, M. ABOUBAKER, M. KOKEN, L. DÉGREMONT & C. LUPO. 2017. Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* 48 (32): 1-8. DOI: 10.1186/s13567-017-0438-1.
- URBANCZYK, H., J. C. AST & P.V. DUNLAP. 2011. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiology Reviews* 35 (2): 324-342. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x.
- WALTER, J., C. HERTEL, G. W. TANNOCK, C. M. LIS, K. MUNRO & W. P. HAMMES. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6): 2578-2585. DOI: 10.1128/AEM.67.6.2578-2585.2001.
- WU, S., G. WANG, E. R. ANGERT, W. WANG, W. LI & H. ZOU. 2012. Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLoS One* 7 (2): e30440. DOI: 10.1371/journal.pone.0030440.

Composición de especies de diatomeas en la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en un sistema estuarino

Diatom species composition in the *in situ* diet of the placer oyster *Crassostrea corteziensis* in an estuarine system

Oscar Ubisha Hernández-Almeida¹, Kathie Monserrat Estrada-Gutiérrez², David Alfaro Siqueiros-Beltrones³
y Emilio Adolfo Inda-Díaz¹

Recibido: 16 de febrero de 2019.

Aceptado: 10 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

RESUMEN

Antecedentes: La alimentación de moluscos bivalvos en cultivo *in vitro* ha tenido como base unas cuantas cepas de diatomeas y algas verdes; empero, se ha observado que dichas cepas tienen bajo valor nutricional. Por ello, se han buscado otras especies de microalgas como alternativa; como en este caso recurriendo al estudio de la alimentación *in situ* de estos moluscos. **Objetivos:** Determinar la composición de especies de diatomeas que forman parte de la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, tanto silvestres, como de cultivos extensivos que se desarrollan en humedales estuarinos de Nayarit, México. **Métodos:** Se recolectaron 130 especímenes de *C. corteziensis* en tres sitios y tres sustratos, *i.e.*, sargas, sedimentos y raíces de mangle, durante (noviembre 2013) y (marzo y junio 2014). Se disecaron sus tractos digestivos y se revisaron sus contenidos intestinales estos se oxidaron y se montaron en resina sintética para identificar las diatomeas consumidas. **Resultados:** La dieta *in situ* de *C. corteziensis* incluyó 212 especies y variedades de diatomeas. El 72.6% fueron formas bentónicas, 50% fueron de afinidad marina, 16% dulceacuícola y 14% de agua salobre. El tamaño de las diatomeas pennadas varió entre 7.4-230 µm de largo y 2.82-50.61 µm de ancho; el diámetro de las céntricas varió entre 4.89-123 µm. **Conclusiones.** De acuerdo con los resultados, *C. corteziensis* se alimenta de un alto número de especies de diatomeas cuyo hábitat es predominantemente bentónico. La composición específica y riqueza de las diatomeas en el contenido intestinal de *C. corteziensis* es propia de sedimentos de zonas estuarinas y representan una primera descripción de la taxocenosis de diatomeas bentónicas del estero Camichín, Nayarit y de ambientes similares de la región. La frecuencia espacial y temporal de taxones como *Cyclotella striata*, *Cymatothea weissflogii*, *Neodelphineis silenda*, *Shionodiscus oestrupii* y *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulatum* en contenidos intestinales, representan alternativas para la dieta de *C. corteziensis* en cultivos de laboratorio.

Palabras claves: contenidos intestinales, cultivo, diatomeas bentónicas, Nayarit, ostión de placer

¹ Laboratorio de Oceanografía Biológica, Centro Multidisciplinario de Investigación Científica 01, Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado. Edificio CEMIC 01, Ciudad de la Cultura s/n, Tepic, Nayarit, C.P. 63000. México.

² Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura. Km. 9 Carretera Tepic-Compostela, Xalisco, Nayarit, 63789. México.

³ Departamento Plancton y Ecología Marina, CICIMAR-Instituto Politécnico Nacional, Av. I.P.N. S/N, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, BCS, C.P. 23096. México.

***Corresponding author:**

Oscar Ubisha Hernández-Almeida: e-mail: ubisha@uan.edu.mx

To quote as:

Hernández-Almeida O. U., K. M. Estrada-Gutiérrez, D. A. Siqueiros-Beltrones & E. A. Inda-Díaz. 2019. Composición de especies de diatomeas en la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en un sistema estuarino. *Hidrobiológica* 29 (3): 109-127.

ABSTRACT

Background: The feeding of cultured mollusks has been based on a few strains of diatoms and green algae; however, it has been shown that these have low nutritional value. Therefore, alternatives have been searched as in this case by resorting to the study of *in situ* feeding of these mollusks. **Goals:** To elaborate a floristic list of diatoms that are part of the *in-situ* diet of *Crassostrea corteziensis*, both wild and in extensive culture at the estuarine wetlands of Nayarit, Mexico. **Methods:** A total of 130 oysters were sampled from three sites and three distinct substrates, *i.e.*, string, sediment, and mangrove roots of the estuarine system, during November 2013, and March and June 2014. Their digestive systems were dissected and their gut contents examined, oxydized and mounted in synthetic resin for the identification of the diatoms ingested *in-situ*. **Results:** We identified 212 species and varieties of diatoms. Benthic forms composed 72.6% of the species richness, out of which 50% are of marine affinity, 16% are freshwater forms, and 14% were brackish water forms. The size of pennate diatoms varied between 7.4-230 µm long and 2.82-50.61 µm wide; while the diameter of centric diatoms varied between 4.89-123 µm. **Conclusions:** The *in-situ* diet of *C. corteziensis* showed a high

species richness and a benthic origin. The species richness and composition of diatoms in the gut contents of *C. corteziensis* is characteristic of estuarine sediments and represents an approximate description of the benthic diatom taxocenosis of estero Camichín, Nayarit and similar environments in the region. According to their frequency, taxa such as *Cyclotella striata*, *Cymatothera weissflogii*, *Neodelphineis silenda*, *Shionodiscus oestrupii* and *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulum* represent alternatives for the *in vitro* culture of placer oyster.

Keywords: benthic diatoms, culture, gut contents, Nayarit, placer oyster

INTRODUCCIÓN

Las diatomeas (Bacillariophyceae) generalmente constituyen el principal componente en la dieta *in situ* de diversos moluscos bivalvos (García-Domínguez *et al.*, 1994; Boltovskoy *et al.*, 1995; Muñetón-Gómez *et al.*, 2001; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2005; Muñetón-Gómez *et al.*, 2010), debido principalmente a que el contenido de las diatomeas es digerido fácilmente, promoviendo un mejor crecimiento y condición fisiológica en los ostréidos (Beukema & Cadee, 1991; Rouillon & Navarro, 2003).

La información sobre la alimentación de ostréidos que aborda aspectos florísticos de diatomeas es escasa y aquellos disponibles adolecen de precisión taxonómica, lo que limita los alcances comparativos. En estudios de laboratorio se ha observado que *Magallana gigas* Thunberg, 1793 ingiere preferentemente diatomeas bentónicas de los géneros *Navicula* y *Nitzschia* (Cognie *et al.*, 2001); asimismo, se ha observado que discrimina por tamaño las diatomeas que ingiere y entre aquellas vivas y muertas (Beninger *et al.*, 2008). Los estudios de alimentación *in situ* son todavía más escasos, no obstante, son informativos; por ejemplo, Kasim & Mukai (2009) examinaron los contenidos del tracto digestivo de ostiones *M. gigas* y de almejas *Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850, registrando que no había diferencias significativas entre lo consumido por ambas especies. Aunado a esto, observaron que las diatomeas bentónicas representaron entre el 70% y 87% del alimento ingerido, además de diatomeas planctónicas y dinoflagelados.

Sobre el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951 solo existe una referencia acerca de su alimentación *in situ* (Hurtao-Oliva, 2008); esta menciona que el 88% de las especies encontradas en sus contenidos intestinales fueron diatomeas; sin embargo, no se proporcionó una referencia florística.

Para la región costera de Nayarit, el cultivo de *C. corteziensis* representa una actividad económica importante. Esta se ha realizado de manera artesanal durante los últimos 40 años, *i.e.*, engorda de la semilla capturada del medio natural (Padilla-Lardizabal & Aguilar-Medina, 2014). En los cultivos experimentales, en la mayoría de los casos, las dietas suministradas están constituidas por solo una especie de diatomea y una o más de flagelados (Coutteau & Sorgeloos, 1992). Por otra parte, las microalgas tradicionalmente utilizadas como *Dunaliella* spp., *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin y *Tetraselmis* spp. ya han dejado de ser utilizadas debido a su bajo valor nutricional (Ponis *et al.*, 2006). En el caso de diatomeas, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal, *Chaetoceros gracilis* Pantocsek, *C. calcitrans* (Paulsen) H. Takano y *C. tenuissimus* Meunier, aún se utilizan rutinariamente en dietas para el cultivo de moluscos bivalvos (Ponis *et al.*, 2006); no obstante, se ha demostrado la importancia de

otros elementos del microfítobentos (Cognie *et al.*, 2001), los cuales podrían enriquecer significativamente la dieta de moluscos bivalvos en cultivo. De acuerdo con esto, se ha iniciado la búsqueda de alternativas (Barillé *et al.*, 2003); en el caso particular de este estudio, se parte de la premisa de que se requieren estudios orientados a conocer primeramente la dieta *in situ* de las especies a ser cultivadas, *i.e.*, qué taxones forman parte de su alimentación. Al respecto, Kasim y Mukai (2009) observaron que los moluscos bivalvos consumen una mayor proporción de diatomeas en relación con otros grupos algales. La identificación de taxones de diatomeas que conforman parte de la dieta de dichos moluscos promete detectar especies con potencial acuícola que redunden en la mejora del cultivo de ostión. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición de especies de diatomeas que forman parte de la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, tanto silvestres, como en cultivos extensivos en humedales estuarinos de Nayarit, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El estero Camichín y la laguna La Palicenta se localizan en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit y forman parte de la Reserva de la Biosfera Marismas Nacionales, en la región noroccidental de México. Estos sistemas pertenecen a la cuenca mareal Mexcaltitán-Camichín; son humedales de flujo estuarino que reciben flujos mareales, fluviales y freáticos, drenan hacia la boca sus llanuras palustres intermareales (Fig. 1). El clima es cálido subhúmedo; el periodo de lluvias abarca de mayo a octubre y las mayores precipitaciones ocurren entre agosto y octubre (960 – 1,396 mm); mientras que secas comprende de noviembre a abril (De la Lanza-Espino *et al.*, 1996). El intervalo de temperatura ambiente es de 22 - 28 °C (INEGI, 2009), mientras que en el agua alcanza en promedio 28.3 ± 2.7 °C con máximo de 32.3 °C y mínimo de 23 °C; la salinidad tiene variaciones entre 4.3 ups (primavera) y 35.1 ups (invierno) con un promedio de 25.8 ± 9.7 ups (Zambrano-Soria, 2015).

Sustratos. Se seleccionaron tres sustratos sobre los que se fija y crece *C. corteziensis*. El primer sustrato lo conformaron las sartas suspendidas, utilizadas para el cultivo extensivo; estas se componen por 25 a 30 conchas madre de ostión o de almeja, unidas con hilo de polietileno que se colocan en zonas cuya profundidad impide que los ostiones toquen el fondo durante la bajamar. Los otros dos sustratos son donde *C. corteziensis* se fija de manera natural, a saber, raíces de *Rhizophora mangle* Linnaeus y sedimentos.

Recolección de muestras

Sitios de muestreo. Se seleccionaron tres sitios con base en la presencia de *C. corteziensis* silvestres y en cultivo extensivo (Fig. 1). El primer sitio fue denominado Estero y se ubicó en el estero Camichín que forma parte de la desembocadura del río Santiago (21.7475 N, -105.4950 O). El segundo sitio fue denominado Canal y se ubicó en un canal artificial que conecta el norte del estero Camichín con el Océano Pacífico (21.8100 N, -105.5246 O); ambos reciben aportes de agua dulce provenientes del río San Pedro y del medio marino. El tercer sitio se denominó Laguna y se localizó en la laguna La Palicenta (21.8015 N, -105.5211 O); se encuentra rodeada por bosques de *R. mangle* y hay poco movimiento del agua.

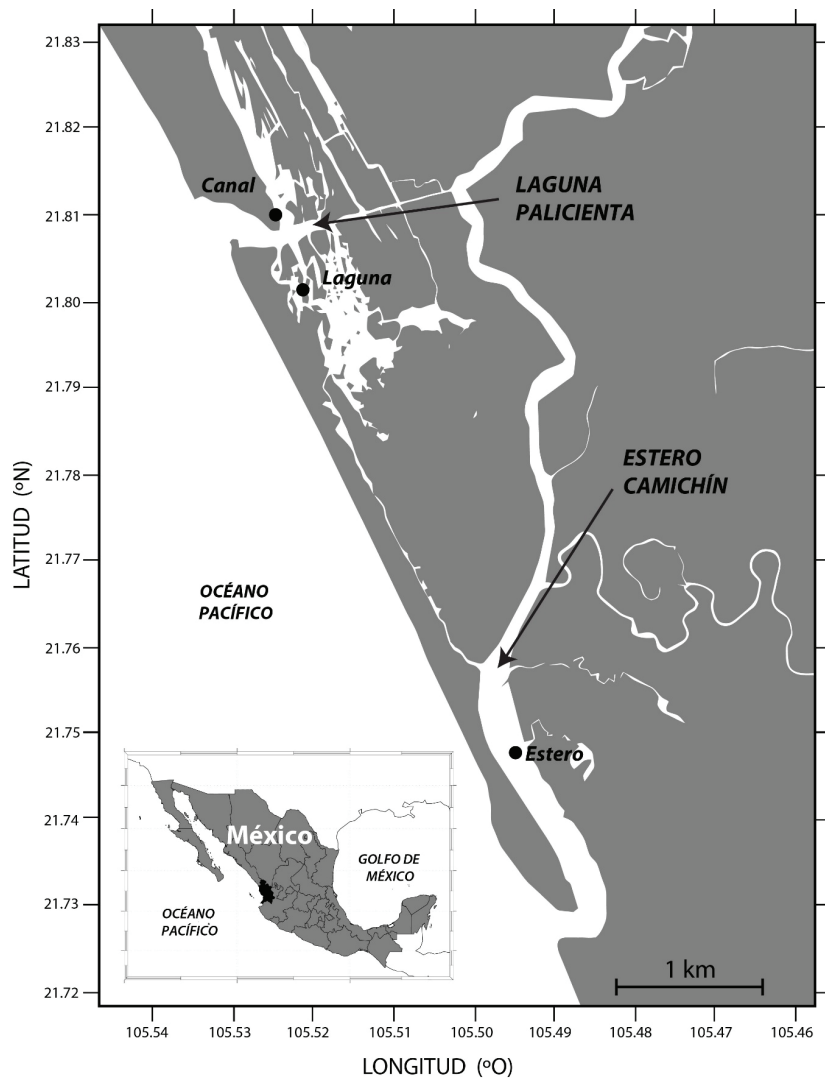


Figura 1. Localización del área de estudio y sitios de recolecta de muestras.

Las muestras de *C. corteziensis* se recolectaron en noviembre 2013 y marzo y junio de 2014, que corresponden a las temporadas de transición, secas y lluvias, respectivamente. En cada sitio se extrajeron, al azar, cinco especímenes de *C. corteziensis* por sustrato, sumando 15 por sitio, 45 por fecha de muestreo y 130 en total. En junio, por ser temporada de cosecha, no se obtuvieron especímenes de sartas suspendidas en ningún sitio. Los ostiones fueron puestos en una hielera sobre una cama de hielo y transportados para su procesamiento en el laboratorio.

Trabajo de laboratorio. Cada espécimen de *C. corteziensis* fue disecado desde la boca hasta el ano para extraer el aparato digestivo; este se preservó en alcohol a 96° GL hasta su procesamiento final. Para la obtención y limpieza de diatomeas, el aparato digestivo de cada ostión fue procesado de acuerdo con la técnica de Siqueiros-Beltrones & Voltolina (2000), la cual tuvo por objeto eliminar la materia orgánica, dentro y fuera de la frústula, tanto de las diatomeas, como la propia del

ostión. Debido a la alta cantidad de materia orgánica que presentó el aparato digestivo de *C. corteziensis*, la técnica fue modificada utilizando una mezcla de ácido sulfúrico, ácido nítrico y alcohol comercial en una proporción 3:2:1, ajustando según la cantidad de materia orgánica presente en cada aparato digestivo. La muestra oxidada se dejó reposar durante 24 horas y se lavó sucesivamente con agua destilada hasta alcanzar un pH mínimo de 6; del material resultante se tomó una submuestra con la cual se realizaron montajes permanentes utilizando resina de alto índice de refracción (Pleurax, IR= 1.7). Para cada muestra se realizaron dos montajes; estos fueron observados en un microscopio Carl Zeiss AxioLab A1 con contraste de fases, fototubo y cámara digital integrada (Cannon EOS 6D). En cada montaje se realizaron recorridos paralelos de un lado a otro del cubreobjetos; durante dichos recorridos se identificaron las diatomeas observadas. Los mejores especímenes de diatomeas fueron fotografiados para elaborar un catálogo iconográfico de referencia.

Las diatomeas se identificaron con base en la morfología de la frústula, principalmente en vista valvar, hasta la mínima categoría taxonómica posible. Como parte del proceso de identificación se obtuvieron datos morfométricos de cada taxón. Para la identificación se utilizaron los trabajos de Al-Kandari *et al.* (2009), Desikachary *et al.* (1987), Desikachary & Prema (1987), Desikachary (1988, 1989), Foged (1975, 1978, 1984), Hernández-Almeida (2005), Hustedt (1930, 1955, 1959, 1961-1966), Krammer & Lange-Bertalot (1991a, b), Krammer & Lange-Bertalot (1997a, b), López-Fuerte *et al.* (2010), Moreno *et al.* (1996), Ohtsuka (2005), Park *et al.* (2012), Peragallo & Peragallo (1908), Ricard (1987), Schmidt *et al.* (1874-1959), Siqueiros-Beltrones (2002), Stidolph *et al.* (2012) y Witkowski *et al.* (2000). La lista taxonómica fue construida con base en la clasificación de Round *et al.* (1990) y las actualizaciones nomenclaturales se realizaron con base en Guiry & Guiry (2017).

Procesamiento de datos.

La frecuencia de los taxones de diatomeas se calculó en función de su aparición en cada una de las muestras revisadas. La comparación de porcentajes de especies bentónicas y planctónicas entre meses, sitios y sustratos se realizó mediante pruebas de independencia; en aquellos casos en donde se observaron diferencias significativas se utilizaron pruebas *a posteriori* con la corrección de Yates (Glantz, 2006). En el caso de la riqueza, se calcularon la mediana y el intervalo de confianza para cada uno de los factores que se eligieron. En aquellos casos en donde hubo indicios de diferencia entre los factores se utilizó la prueba de Kruskal Wallis; las comparaciones *a posteriori* se realizaron mediante la prueba ajustada de Bonferroni (Glantz, 2006). Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS v.24 (IBM).

RESULTADOS

Los contenidos intestinales de *Crassostrea corteziensis* redituaron 212 taxones de diatomeas pertenecientes a 88 géneros, 50 familias y 29 órdenes (Tabla 1). Imágenes de especímenes representativos se muestran en las figuras 3-88. Los géneros con mayor riqueza de especies fueron *Nitzschia* (27), *Navicula* (19), *Coscinodiscus* (11), *Amphora* (8) y *Tryblionella* (7); estos en conjunto representaron 34% de la riqueza total.

Las diatomeas pennadas consumidas por *C. corteziensis* exhibieron variaciones de tamaños entre 7.4-230 µm de largo y 2.82-50.61 µm de ancho; mientras que el tamaño de las formas céntricas varió entre 4.89-123 µm de diámetro.

Del componente bentónico solo *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulatum* (H.J. Schrader) J.L. Moreno-Ruiz & Licea (Fig. 47) y *Neodelphineis silenda* (M.H. Hohn & J. Hellerman) N. Desianti & M. Potapova (Fig. 48) se observaron en el 100 % de las muestras; mientras que, del planctónico, *Cymatotheca weissflogii* (Grunow) Hendey (Fig. 69), *Cyclotella striata* (Kützing) Grunow (Fig. 79) y *Shionodiscus oestrupii* (Ostenfeld) A.J. Alverson, S.H. Kang & E.C. Theriot (Fig. 84) mostraron la misma ubicuidad. Por otra parte, 14 taxones se observaron solo durante una temporada (Tabla 2); seis en la época de lluvias, cuando se observaron la mayor parte de ellas.

En general, la alimentación *in situ* de *C. corteziensis* conformada por diatomeas comprendió 72.6% de formas bentónicas; empero, se detectaron variaciones significativas entre las muestras comparadas por mes ($\chi^2 = 15.41$, g.l. = 2, $p < 0.01$) y sitio ($\chi^2 = 12.47$, g.l. = 2, $p < 0.01$),

evidenciadas por las pruebas de comparaciones múltiples, las cuales mostraron que en junio la proporción de diatomeas bentónicas y planctónicas fue significativamente menor ($\chi^2 = 13.64$, g.l. = 1, $p < 0.01$) que en noviembre y marzo. Por otra parte, entre sitios, dicha proporción fue significativamente menor ($\chi^2 = 9.88$, g.l. = 1, $p < 0.01$) en las muestras del estero (Fig. 2) que en las del canal y la laguna. Entre sustratos no se detectaron diferencias.

La riqueza (S) de diatomeas en contenidos intestinales de *C. corteziensis* entre meses y sitios variaron entre 133 - 143 y 147 - 152 taxones (Tabla 3), respectivamente. Entre sustratos ("S") las menores riquezas correspondieron a las muestras de raíces (S=87-103). Asimismo, según el origen de las muestras, la riqueza específica varió entre 41 (estero, raíces, noviembre) y 91 (laguna, sedimentos, junio) con una mediana de 60 ± 15 especies.

Entre meses, la mediana de la riqueza específica no mostró variaciones importantes; en noviembre fue de 61 ± 13 (IC [52-65]), en junio de 61 ± 18 (IC [49-81]) y marzo de 55 ± 24 (IC [43-82]); los intervalos de confianza construidos se traslaparon completamente, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre dichos valores. Esto mismo ocurrió entre sitios, en donde la mediana en el canal fue de 64 ± 16 (IC [58-70] especies), en la laguna de 56 ± 30 (IC [49-87]) y en el estero de 57 ± 19 (IC [50-65]). Finalmente, entre sustratos la mediana de la riqueza en sargas fue de 65 ± 22 (IC [64-70] especies), en sedimentos de 64 ± 21 (IC [52-70]) y en raíces de mangle de 50 ± 10 (IC [48-57]); en este caso, el intervalo de confianza de la mediana para la riqueza de raíces de mangle se traslapó parcialmente con la de sedimento y fue diferente a la de sargas. La prueba de Kruskal-Wallis ($\chi^2(2) = 9.669$, $p < 0.05$) corroboró las diferencias estadísticas entre sustratos. Las comparaciones *a posteriori* mostraron que la riqueza de diatomeas en ostiones de raíces de mangle fue significativamente menor ($p < 0.05$) que aquellos en sargas y sedimento.

DISCUSIÓN

Este estudio representa una base de conocimiento científico acerca de la alimentación *in situ* de *C. corteziensis* y complementa el estudio de Estrada-Gutiérrez *et al.* (2017) al mostrar una base florística de referencia para los nuevos registros que aportaron dichos autores.

La composición de diatomeas observada en contenidos intestinales de *C. corteziensis* mostró una elevada riqueza y fue similar a la observada por Hirose *et al.* (2004), Ohtsuka (2005) y Park *et al.* (2012) en sedimentos de zonas estuarinas de Japón. Por ejemplo, dichos autores registraron a *Neodelphineis silenda*, *Cyclotella litoralis*, *Cymatotheca weissflogii*, *Diploneis smithii* y *Paralia sulcata*; al menos las tres primeras especies se observaron en el 100% de las muestras de contenidos intestinales de *C. corteziensis*, ello sugiere que la composición de diatomeas observada en el tracto digestivo del ostión en Boca de Camichín, Nayarit es la propia de sedimentos de zonas estuarinas. Así, los resultados de este estudio no solo proporcionan información directa de la alimentación *in situ* de *C. corteziensis*, sino también puede considerarse una primera descripción de la taxocenosis de diatomeas del estero Camichín, Nayarit y de ambientes similares de la región.

En cuanto a la composición específica de diatomeas observada en este estudio, fue diferente de aquellas en el contenido intestinal de otras especies de ostréidos, *e.g.*, *Hyotissa hyotis* (Linné, 1758) (Villale-

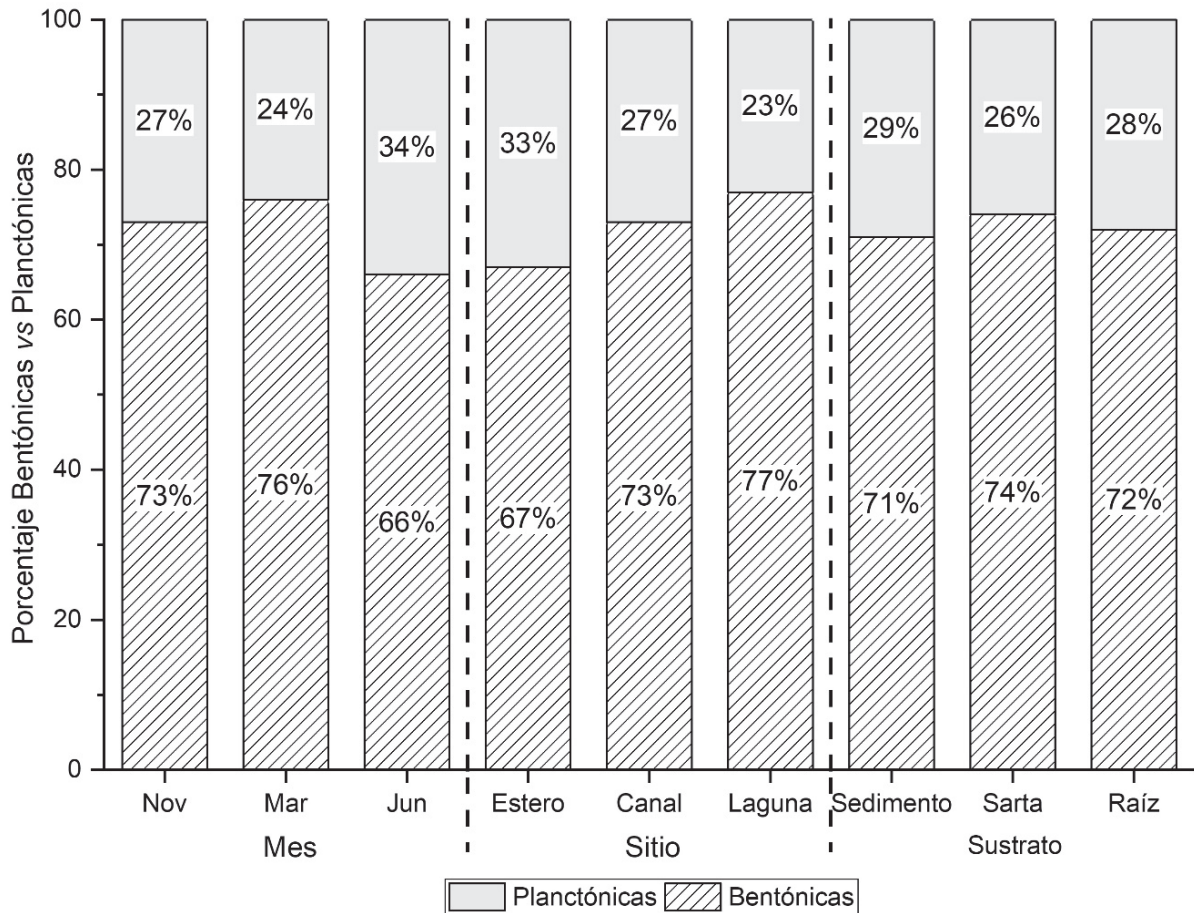


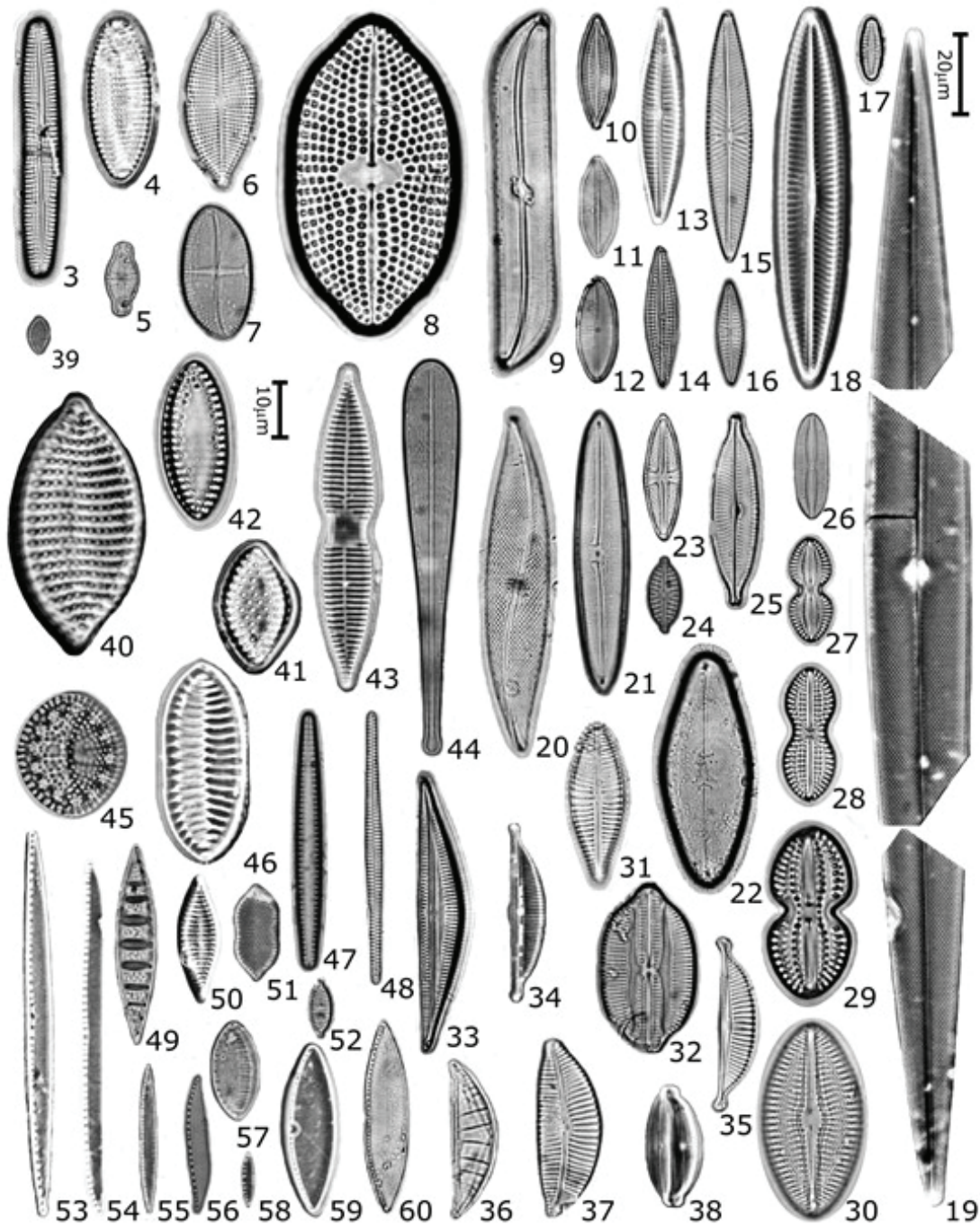
Figura 2. Proporción de especies de diatomeas bentónicas y planctónicas en contenidos intestinales de *C. corteziensis* por mes, sitio y sustrato.

jo-Fuerte *et al.*, 2005) y *M. gigas* Kasim y Mukai (2009). Para *H. hyotis* los géneros con mayor número de especies fueron *Chaetoceros*, *Rhizosolenia*, *Thalassionema*, *Cylindrotheca* y *Coscinodiscus* (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2005); casi todos estos de origen planctónico. A pesar de ello, en abundancia dominaron las formas bentónicas. Por otra parte, los especímenes revisados por los autores fueron extraídos en la zona rocosa de una isla, a 10 m de profundidad; por lo que la composición específica fue típica de ambientes oceánicos. Por su parte, la composición de la taxocenosis de diatomeas del contenido intestinal de *M. gigas* estuvo constituida por especies de *Achnanthes*, *Cocconeis*, *Grammatophora*, *Melosira*, *Navicula*, *Nitzschia* y *Paralia* (Kasim & Mukai, 2009); dicha composición es de formas típicamente epifitas; en particular es similar a la taxocenosis de diatomeas epifitas observadas sobre el pasto marino *Zostera marina* (Linnaeus, 1753) por Siqueiros-Beltrones *et al.* (1987), Kasim & Mukai (2006) y Chung & Lee (2008).

Lo anterior sugiere que la composición de diatomeas en el contenido intestinal de los ostréidos es influenciada por el ambiente particular en donde habitan o son cultivados. Esto confirma las propuestas de Kasim y Mukai (2006) y Siqueiros-Beltrones y Argumedo-Hernández (2012) quienes sostienen que la composición de especies de diatomeas

observada en contenidos intestinales de moluscos es representativa de aquellas taxocenosis presentes en su hábitat.

La comparación de la riqueza específica se dificulta dada la influencia que tienen el tamaño de muestra y el enfoque particular de cada estudio. No obstante, resalta que la riqueza en contenidos intestinales de *C. corteziensis* ($S=212$) fue mayor que la observada para otros ostréidos. Por ejemplo, Villalejo-Fuerte *et al.* (2005) registraron 11 géneros en contenido intestinal de *Hytissa hyotis* Linné, 1758, mientras que Kasim y Mukai (2009) anotaron 66 especies en *M. gigas*; pero debe considerarse que en ambos estudios el enfoque fue cuantitativo, lo que limita el registro de la riqueza. Por otra parte, la riqueza específica que se observó es similar a la obtenida en sedimentos de manglar del noroeste mexicano, *v.gr.*, en B.C.S., Siqueiros-Beltrones y Sánchez-Castrejón (1999) obtuvieron 230 taxones de diatomeas en el manglar de la laguna de Balandra, Siqueiros-Beltrones *et al.* (2005) observaron 177 especies en Bahía Magdalena y Siqueiros-Beltrones *et al.* (2017) registraron 232 especies en laguna de Guerrero Negro. De acuerdo con lo anterior, los contenidos intestinales de *C. corteziensis* no son solo representativos de la composición específica de su hábitat, sino también de la riqueza específica.



Figuras 3-60. Diatomeas del contenido intestinal de *C. corteziensis*. 3) *Achnanthes pseudogroenlandica*; 4) *Achnanthes separata*; 5) *Achnanthes bergii*; 6) *Achnanthes curvirostrum*; 7) *Cocconeis diruptoides*; 8) *Petronis arabica*; 9) *Gyrosigma eximium*; 10) *Navicula phyllepta*; 11) *Navicula cf. johanrossii*; 12) *Pinnunavis cf. yarrensii*; 13) *Navicula flantica*; 14) *Cymatoneis cf. margarita*; 15) *Navicula microdigitradiata*; 16) *Navicula perminuta*; 17) *Hippodonta linearis*; 18) *Navicula normaloides*; 19) *Pleurosigma intermedium* var. *mauritanica*; 20) *Pleurosigma diverse-striatum*; 21) *Frustulia weinholdii*; 22) *Parlibellus hagelsteinii*; 23) *Luticola mutica*; 24) *Navicula platyventris*; 25) *Navicula rostollata*; 26) *Fallacia litoricola*; 27) *Diploneis caffra*; 28) *Diploneis weissflogii*; 29) *Diploneis gruendleri*; 30) *Diploneis smithii*; 31) *Gomphonema cf. lagenula*; 32) *Lyrella clavata* var. *caribaea*; 33) *Seminavis robusta*; 34) *Halamphora cymbifera*; 35) *Amphora ayensuensis*; 36) *Rhopalodia musculus*; 37) *Cymbella turgidula*; 38) *Halamphora coffeaeformis*; 39) *Delphineis surirella*; 40) *Tryblionella compressa*; 41) *Tryblionella granulata*; 42) *Tryblionella hyalina*; 43) *Synedra goulardii*; 44) *Licmophora gracilis*; 45) *Tryblioptychus cocconeiformis*; 46) *Tryblionella victoriae*; 47) *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulatum*; 48) *Neodelphineis silenda*; 49) *Cymatonitzschia marina*; 50) *Tryblionella lanceola*; 51) *Tryblionella coarctata*; 52) *Nitzschia compressa* var. *vexans*; 53) *Nitzschia filiformis*; 54) *Nitzschia obtusa*; 55) *Nitzschia frustulum*; 56) *Nitzschia clausii*; 57) *Nitzschia cf. debilis*; 58) *Nitzschia perminuta*; 59) *Nitzschia brittoni*; 60) *Nitzschia ligowskii*. Barra de escala de 10 mm excepto para Fig. 18 = 20 µm.

Tabla 1. Taxones de diatomeas y su frecuencia en contenidos intestinales de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951. La clasificación se presenta de acuerdo con Round *et al.* (1990).

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
Phylum Bacillariophyta Karsten		
Clase Bacillariophyceae Haeckel		
Orden Bacillariales Hendey		
Familia Bacillariaceae Ehrenberg		
<i>Bacillaria socialis</i> (W. Gregory) Ralfs	77	Bentónica
<i>Cymatonitzschia marina</i> (F.W Lewis) Simonsen (Fig. 49)	12	Bentónica
<i>Fragilariopsis</i> sp. 1	27	Bentónica
<i>Hantzschia virgata</i> (Roper) Grunow	11	Bentónica
<i>Nitzschia amabilis</i> H. Suzuki	38	Bentónica
<i>Nitzschia brittoni</i> Hagelstein (Fig. 59)	15	Bentónica
<i>Nitzschia</i> cf. <i>debilis</i> (Arnott ex O'Meara) Grunow (Fig. 57)	42	Bentónica
<i>Nitzschia</i> cf. <i>fusiformis</i> Grunow	4	Bentónica
<i>Nitzschia</i> cf. <i>pellucida</i> Grunow	4	Bentónica
<i>Nitzschia clausii</i> Hantzsch (Fig. 56)	19	Bentónica
<i>Nitzschia compressa</i> var. <i>vexans</i> (Grunow) Lange-Bertalot (Fig. 52)	7	Bentónica
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Rabenhorst	31	Bentónica
<i>Nitzschia distans</i> W. Gregory	38	Bentónica
<i>Nitzschia elegantula</i> Grunow	23	Bentónica
<i>Nitzschia filiformis</i> (W. Smith) Van Heurck (Fig. 53)	35	Bentónica
<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow (Fig. 55)	88	Bentónica
<i>Nitzschia gracilis</i> Hantzsch	46	Bentónica
<i>Nitzschia hadriatica</i> Lange-Bertalot	11	Bentónica
<i>Nitzschia lanceolata</i> var. <i>minor</i> (Grunow) H. Peragallo & M. Peragallo	46	Bentónica
<i>Nitzschia ligowskii</i> Lange-Bertalot, Kociolek & Brzezinska (Fig. 60)	88	Bentónica
<i>Nitzschia martiana</i> (C. Agardh) Schütt	19	Bentónica
<i>Nitzschia obtusa</i> W. Smith (Fig. 54)	31	Bentónica
<i>Nitzschia perminuta</i> (Grunow) M. Peragallo (Fig. 58)	38	Bentónica
<i>Nitzschia perspicua</i> Chohnoky	69	Bentónica
<i>Nitzschia reversa</i> W. Smith	38	Bentónica
<i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W. Smith	35	Bentónica
<i>Nitzschia sigmaformis</i> Hustedt	42	Bentónica
<i>Nitzschia</i> sp.1	8	Bentónica
<i>Nitzschia</i> sp.2	8	Bentónica
<i>Nitzschia</i> sp.3	27	Bentónica
<i>Nitzschia</i> sp.4	19	Bentónica
<i>Tryblionella coarctata</i> (Grunow) D.G. Mann (Fig. 51)	96	Bentónica
<i>Tryblionella compressa</i> (Bailey) Poulin (Fig. 40)	58	Bentónica
<i>Tryblionella granulata</i> (Grunow) D.G. Mann (Fig. 41)	31	Bentónica
<i>Tryblionella hungarica</i> (Grunow) Frenguelli	50	Bentónica
<i>Tryblionella hyalina</i> (Amossé) T. Ohtsuka (Fig. 42)	27	Bentónica
<i>Tryblionella lanceola</i> (Grunow) (Fig. 50)	46	Bentónica
<i>Tryblionella victoriae</i> Grunow (Fig. 46)	8	Bentónica

Continúa tabla 1.

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
Orden Cocconeidales E.J. Cox		
Familia Achnanthidiaceae D.G. Mann		
<i>Achnanthidium exiguum</i> (Grunow) Czarnecki	8	Bentónica
<i>Karayevia amoena</i> (Hustedt) Bukhtiyarova	7	Bentónica
<i>Karayevia rostrata</i> (Hustedt) Kulikovskiy & Genkal	1	Bentónica
<i>Planothidium hauckianum</i> (Grunow) Bukhtiyarova	15	Bentónica
Familia Cocconeidaceae Kützing		
<i>Cocconeis diruptoides</i> Hustedt (Fig. 7)	23	Bentónica
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i> (Ehrenberg) Grunow	31	Bentónica
<i>Cocconeis scutellum</i> Ehrenberg	27	Bentónica
Orden Cymbellales D.G. Mann		
Familia Anomoeoneidaceae D.G. Mann		
<i>Staurophora salina</i> (W. Smith) Mereschkowsky	11	Bentónica
Familia Cymbellaceae Kützing		
<i>Cymbella turgidula</i> Grunow (Fig. 37)	8	Bentónica
Familia Gomphonemataceae Kützing		
<i>Gomphoneis</i> cf. <i>clevei</i> (Fricke) Gil	11	Bentónica
<i>Gomphonema</i> cf. <i>lagenula</i> Kützing (Fig. 31)	4	Bentónica
<i>Gomphonema saphophilum</i> (Lange-Bertalot & Reichardt) Abraca, R. Jahn, J. Zimmermann & Enke	4	Bentónica
Orden Lyrellales D.G. Mann		
Familia Lyrellaceae D.G. Mann		
<i>Lyrella clavata</i> var. <i>caribaea</i> Cleve (Fig. 32)	1	Bentónica
<i>Petroneis arabica</i> (Grunow ex Schmidt) D.G. Mann (Fig. 8)	2	Bentónica
Orden Mastogloiales D.G. Mann		
Familia Achnanthaceae Kützing		
<i>Achnanthes bergii</i> Cleve-Euler (Fig. 5)	15	Bentónica
<i>Achnanthes curvirostrum</i> J. Brun (Fig. 6)	35	Bentónica
<i>Achnanthes longipes</i> C. Agardh	3	Bentónica
<i>Achnanthes pseudogroenlandica</i> Hendey (Fig. 3)	3	Bentónica
<i>Achnanthes separata</i> Hustedt ex Simonsen (Fig. 4)	3	Bentónica
<i>Achnanthes</i> sp. 1	3	Bentónica
<i>Achnanthes</i> sp. 2	3	Bentónica
<i>Achnanthes</i> sp. 3	3	Bentónica
Orden Fragilariales P.C. Silva		
Familia Fragilariaceae Kützing		
<i>Odontidium hyemale</i> (Roth) Kützing	65	Bentónica
<i>Synedra affinis</i> var. <i>gracilis</i> Grunow	23	Bentónica
<i>Synedra gouldarii</i> Brébisson ex Cleve & Grunow (Fig. 43)	12	Bentónica
<i>Synedra tabulata</i> var. <i>obtusa</i> Pantocsek	12	Bentónica
Familia Staurosiraceae Medlin		
<i>Pseudostaurosira brevistriata</i> (Grunow) D.M. Williams & Round	11	Bentónica
<i>Staurosirella pinnata</i> (Ehrenberg) D.M. Williams & Round	4	Bentónica

Continúa tabla 1.

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
Orden Licmophorales Round		
Familia Licmophoraceae Kützing		
<i>Licmophora gracilis</i> (Ehrenberg) Grunow (Fig. 44)	11	Bentónica
Familia Ulnariaceae E.J. Cox		
<i>Catacombas gaillonii</i> (Bory) D.M. Williams & Round	4	Bentónica
<i>Tabularia tabulata</i> (C. Agardh) Snoeijs	69	Bentónica
<i>Ulnaria ulna</i> var. <i>ulna</i> (Nitzsch) Compère	4	Bentónica
Orden Naviculales Cleve		
Familia Amphipleuraceae Grunow		
<i>Frustulia</i> sp. 1	4	Bentónica
<i>Frustulia weinholdii</i> Husted (Fig. 21)	11	Bentónica
<i>Halamphora coffeaeformis</i> (C. Agardh) Levkov (Fig. 38)	88	Bentónica
<i>Halamphora costata</i> (W. Smith) Levkov	15	Bentónica
<i>Halamphora cuneata</i> (Cleve) Levkov	15	Bentónica
<i>Halamphora cymbifera</i> (Gregory) Levkov (Fig. 34)	57	Bentónica
Familia Berkeleyaceae D.G. Mann		
<i>Parlibellus hagelsteinii</i> Cox (Fig. 22)	12	Bentónica
<i>Parlibellus rhombicula</i> (Hustedt) Witkowski	12	Bentónica
<i>Parlibellus</i> sp. 1	12	Bentónica
Familia Diadesmidaceae D.G. Mann		
<i>Luticola mutica</i> (Kützing) D.G. Mann (Fig. 23)	31	Bentónica
<i>Luticola ventricosa</i> (Kützing) D.G. Mann	8	Bentónica
Familia Diploneidaceae D.G. Mann		
<i>Diploneis caffra</i> (Giffen) A. Witkowski, H. Lange-Bertalot & D. Metzeltin (Fig. 27)	62	Bentónica
<i>Diploneis</i> cf. <i>dimorpha</i> Hustedt	58	Bentónica
<i>Diploneis gruendleri</i> (Schmidt) Cleve (Fig. 29)	15	Bentónica
<i>Diploneis smithii</i> (Brébisson) Cleve (Fig. 30)	50	Bentónica
<i>Diploneis weissflogii</i> (A.W.F. Schmidt) Cleve (Fig. 28)	96	Bentónica
Familia Entomoneidaceae Reimer		
<i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	85	Bentónica
Familia Naviculaceae Kützing		
<i>Chamaepinnularia</i> sp. 1	8	Bentónica
<i>Chamaepinnularia</i> sp. 2	8	Bentónica
<i>Cymatoneis</i> cf. <i>margarita</i> A. Witkowski (Fig. 14)	4	Bentónica
<i>Gyrosigma balticum</i> (Ehrenberg) Rabenhorst	40	Bentónica
<i>Gyrosigma fasciola</i> (Ehrenberg) J.W. Griffith & Henfrey	3	Bentónica
<i>Gyrosigma peisonis</i> (Grunow) Hustedt	1	Bentónica
<i>Gyrosigma eximium</i> (Thwaites) Cleve (Fig. 9)	2	Bentónica
<i>Gyrosigma</i> sp. 1	1	Bentónica
<i>Haslea duerrenbergiana</i> (Hustedt) F.A.S. Sterrenbrug	35	Bentónica
<i>Haslea ostrearia</i> (Gaillon) Simonsen	3	Bentónica
<i>Hippodonta linearis</i> (Østrup) Lange-Bertalot, Metzeltin & Witkowski (Fig. 17)	5	Bentónica

Continúa tabla 1.

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
<i>Mayamea</i> cf. <i>recondita</i> (Hustedt) Lange-Bertalot	4	Bentónica
<i>Navicula abunda</i> Hustedt	19	Bentónica
<i>Navicula agnita</i> Hustedt	69	Bentónica
<i>Navicula</i> cf. <i>johanrossii</i> Giffen (Fig. 11)	27	Bentónica
<i>Navicula</i> cf. <i>paul-schulzii</i> A. Witkowski & H. Lange-Bertalot	23	Bentónica
<i>Navicula</i> cf. <i>subinflatooides</i> Hustedt	4	Bentónica
<i>Navicula</i> cf. <i>transistantioides</i> Foged	35	Bentónica
<i>Navicula flantica</i> Grunow (Fig. 13)	85	Bentónica
<i>Navicula microdigitoradiata</i> Lange-Bertalot (Fig. 15)	19	Bentónica
<i>Navicula normaloides</i> Cholnoky (Fig. 18)	50	Bentónica
<i>Navicula perminuta</i> Grunow (Fig. 16)	92	Bentónica
<i>Navicula phylleptosoma</i> Lange-Bertalot (Fig. 10)	50	Bentónica
<i>Navicula platyventris</i> Meister (Fig. 24)	46	Bentónica
<i>Navicula rostellata</i> Kützing (Fig. 25)	4	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 1	8	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 2	11	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 3	4	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 4	23	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 5	88	Bentónica
<i>Navicula</i> sp. 6	27	Bentónica
<i>Pinnunavis</i> cf. <i>yarrensis</i> (Grunow) H. Okuno (Fig. 12)	8	Bentónica
<i>Seminavis robusta</i> D.B. Danielidis & D.G. Mann (Fig. 33)	46	Bentónica
Familia Pinnulariaceae D.G. Mann		
<i>Oestrupia</i> sp. 1	11	Bentónica
<i>Pinnularia cincta</i> (Ehrenberg) Ralfs	31	Bentónica
Familia Pleurosigmataceae Mereschkowsky		
<i>Pleurosigma angulatum</i> (J.T. Queckett) W. Smith	19	Bentónica
<i>Pleurosigma</i> cf. <i>elongatum</i> W. Smith	23	Bentónica
<i>Pleurosigma diversestriatum</i> F. Meister (Fig. 20)	54	Bentónica
<i>Pleurosigma intermedium</i> var. <i>mauritiana</i> (Grunow ex Cleve) M. Peragallo (Fig. 19)	11	Bentónica
<i>Pleurosigma salinarum</i> (Grunow) Grunow	19	Bentónica
<i>Pleurosigma</i> sp. 1	12	Bentónica
Familia Sellaphoraceae Mereschkowsky		
<i>Fallacia forcipata</i> (Greville) Stickle & D.G. Mann	15	Bentónica
<i>Fallacia litoricola</i> (Hustedt) D.G. Mann (Fig. 26)	35	Bentónica
<i>Fallacia subforcipata</i> (Hustedt) D.G. Mann	15	Bentónica
<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkowsky	8	Bentónica
Familia Stauroneidaceae		
<i>Craticula</i> cf. <i>cuspidata</i> (Kützing) Kützing	31	Bentónica
Orden Rhabdonematales Round & R.M. Crawford		
Familia Grammatophoraceae Lobban & Ashworth		
<i>Grammatophora macilenta</i> W. Smith	31	Bentónica
Orden Rhaphoneidales Round		

Continúa tabla 1.

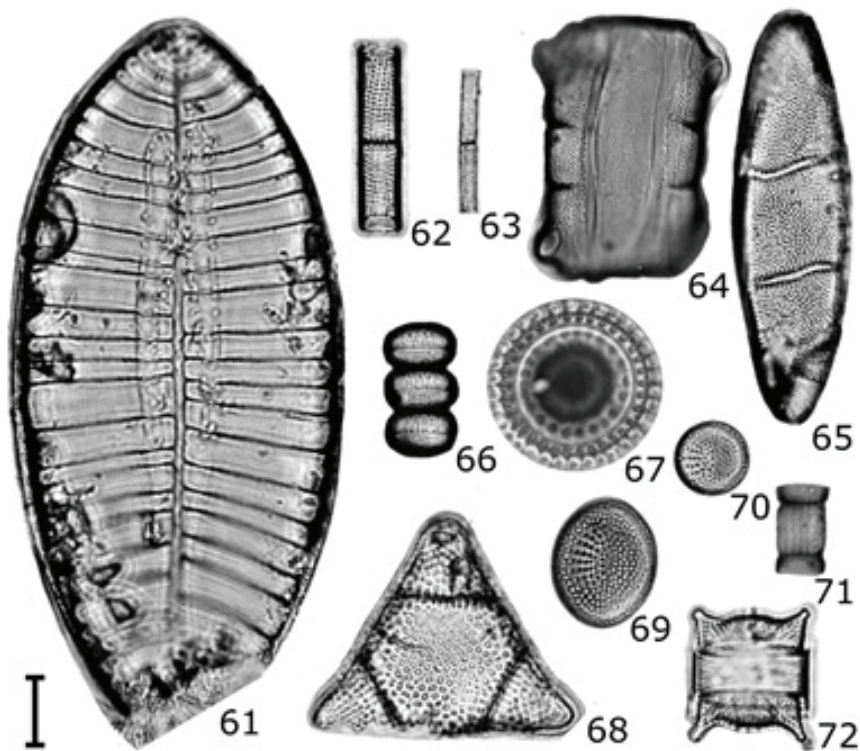
Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
Familia Rhaphoneidaceae Forti		
<i>Delphineis surirella</i> (Ehrenberg) G.W. Andrews (Fig. 39)	88	Bentónica
<i>Neodelphineis silenda</i> (M.H. Hohn & J. Hellerman) N. Desianti & M. Potapova (Fig. 48)	100	Bentónica
Orden Rhopalodiales D.G. Mann		
Familia Rhopalodiaceae (Karsten) Topachevs'kyj & Oksiyuk		
<i>Epithemia adnata</i> (Kützing) Brébisson	15	Bentónica
<i>Epithemia pacifica</i> (Krammer) Lobban & J.S. Park	11	Bentónica
<i>Rhopalodia musculus</i> (Kützing) Otto Müller (Fig. 36)	23	Bentónica
Orden Surirellales D.G. Mann		
Familia Surirellaceae Kützing		
<i>Campylodiscus</i> cf. <i>crebrecostratus</i> Greville	11	Bentónica
<i>Petrodictyon gemma</i> (Ehrenberg) D.G. Mann (Fig. 61)	15	Bentónica
<i>Surirella armoricana</i> H. Peragallo & M. Peragallo	35	Bentónica
<i>Surirella fastuosa</i> var. <i>cuneata</i> O. Witt	12	Bentónica
<i>Tryblioptychus cocconeiformis</i> (Grunow) Hendey (Fig. 45)	85	Bentónica
Orden Thalassionematales Round		
Familia Thalassionemataceae Round		
<i>Thalassionema nitzschioides</i> var. <i>capitulatum</i> (H.J. Schrader) J.L. Moreno-Ruiz (Fig. 47)	100	Bentónica
<i>Thalassiothrix</i> sp. 1	58	Bentónica
Orden Thalassiophysales D.G. Mann		
Familia Catenulaceae Mereschkowsky		
<i>Amphora ayensuensis</i> Foged (Fig. 35)	4	Bentónica
<i>Amphora coffeaeformis</i> var. <i>salina</i> (W. Smith) Schönfeldt	46	Bentónica
<i>Amphora gacialis</i> Ehrenberg	11	Bentónica
<i>Amphora proteus</i> var. <i>contigua</i> Cleve	46	Bentónica
<i>Amphora proteus</i> var. <i>kariana</i> Grunow	38	Bentónica
<i>Amphora</i> sp.1	11	Bentónica
<i>Amphora</i> sp.2	19	Bentónica
<i>Amphora</i> sp.3	11	Bentónica
Clase Bacillariophyta incertae sedis		
Orden Bacillariophyta ordo incertae sedis		
Familia Bacillariophyta familia incertae sedis		
<i>Cosmiodiscus</i> sp. 1	12	Planctónica
Clase Coscinodiscophyceae Round & Crawford		
Orden Asterolamprales Round		
Familia Asterolampraceae H.L. Smith		
<i>Asteromphalus flabellatus</i> (Brébisson) Greville	4	Planctónica
Orden Aulacoseirales R.M. Crawford		
Familia Aulacoseiraceae R.M. Crawford		
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen (Fig. 62)	50	Planctónica
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (Otto Müller) Simonsen (Fig. 63)	42	Planctónica
Orden Coscinodiscales Round & R.M. Crawford		
Familia Aulacodiscaceae (Schütt) Lemmermann		

Continúa tabla 1.

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
<i>Aulacodiscus kittonii</i> Arnott ex Ralfs (Fig. 75)	19	Planctónica
Familia Coscinodiscaceae Kützing		
<i>Coscinodiscus apiculatus</i> Ehrenberg	27	Planctónica
<i>Coscinodiscus argus</i> Ehrenberg	11	Planctónica
<i>Coscinodiscus asteromphalus</i> Ehrenberg	15	Planctónica
<i>Coscinodiscus concinnus</i> Wm. Smith	4	Planctónica
<i>Coscinodiscus divisus</i> Grunow	11	Planctónica
<i>Coscinodiscus heteroporus</i> Ehrenberg	11	Planctónica
<i>Coscinodiscus kuetzingii</i> Schmidt	12	Planctónica
<i>Coscinodiscus oculus-iridis</i> (Ehrenberg) Ehrenberg (Fig. 82)	4	Planctónica
<i>Coscinodiscus radiatus</i> Ehrenberg (Fig. 85)	88	Planctónica
<i>Coscinodiscus rothii</i> (Ehrenberg) Grunow (Fig. 83)	85	Planctónica
<i>Coscinodiscus subtilis</i> Ehrenberg	19	Planctónica
Familia Heliopeltaceae H.L. Smith		
<i>Actinoptychus aster</i> Brun	38	Planctónica
<i>Actinoptychus campanulifer</i> Schmidt	35	Planctónica
<i>Actinoptychus heliopelta</i> Grunow (Fig. 87)	4	Planctónica
<i>Actinoptychus senarius</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	23	Planctónica
Familia Hemidiscaceae Hendey ex Hasle		
<i>Actinocyclus cuneiformis</i> (Wallich) F. Gomez, Lu Wang & Senjie Lin	11	Planctónica
<i>Actinocyclus decussatus</i> D.G. Mann	4	Planctónica
<i>Actinocyclus normanii</i> (Gregory ex Greville) Hustedt	15	Planctónica
<i>Actinocyclus octonarius</i> Ehrenberg	15	Planctónica
<i>Actinocyclus octonarius</i> var. <i>crassus</i> (W. Smith) Hendey (Fig. 74)	27	Planctónica
<i>Actinocyclus octonarius</i> var. <i>ralfsi</i> (W. Smith) Hendey (Fig. 73)	4	Planctónica
<i>Actinocyclus subtilis</i> (Gregory) Ralfs	11	Planctónica
Orden Melosirales R.M Crawford		
Familia Hyalodiscaceae R.M. Crawford		
<i>Podosira stelligera</i> (Bail) Mann	12	Planctónica
Familia Melosiraceae Kützing		
<i>Melosira moniliformis</i> var. <i>octogona</i> (Grunow) Hustedt	11	Planctónica
Orden Paraliales R.M. Crawford		
Familia Paraliaceae R.M. Crawford		
<i>Paralia fenestrata</i> Sawai & Nagumo (Fig. 66, 67)	96	Planctónica
Orden Rhizosoleniales Silva		
Familia Rhizosoleniaceae De Toni		
<i>Pseudosolenia</i> sp. 1	4	Planctónica
Clase Mediophyceae Medlin & Kaczmarska		
Orden Anaulales Round & R.M. Crawford		
Familia Anaulaceae (Schütt) Lemmermann		
<i>Eunotogramma laeve</i> Grunow	54	Planctónica
Orden Biddulphiales Krieger		

Continúa tabla 1.

Taxones	Frecuencia en %	Hábitat
Familia Biddulphiaceae R.M. Crawford		
<i>Biddulphia alternans</i> (Bailey) Van Heurck (Fig. 68)	19	Planctónica
<i>Neohuttonia reichardtii</i> (Grunow) Kuntze (Fig. 64, 65)	38	Planctónica
Orden Chaetocerotales Round & R.M. Crawford		
Familia Chaetocerotaceae Ralfs		
<i>Bacteriastrum hyalinum</i> Lauder	4	Planctónica
<i>Bacteriastrum hyalinum</i> var. <i>princeps</i> (Castrachane) J. Ikary	8	Planctónica
<i>Chaetoceros curvisetus</i> Cleve	38	Planctónica
Orden Cymatosirales Round & R.M. Crawford		
Familia Cymatosiraceae Hasle, Stosch & Syvertsen		
<i>Plagiogrammopsis vanheurckii</i> (Grunow) Hasle, von Stosch & Syvertsen	46	Planctónica
Orden Eupodiscales V.A. Nikoleav & D.M. Harwood		
Familia Eupodiscaceae Ralfs		
<i>Cerataulus turgidus</i> (Ehrenberg) Ehrenberg (Fig. 76)	11	Planctónica
<i>Pleurosira laevis</i> (Ehrenberg) Compère (Fig. 77)	31	Planctónica
<i>Zygoceros rhombus</i> Ehrenberg	38	Planctónica
Familia Odontellaceae P.A. Sims, D.M. Williams & M.P. Ashworth		
<i>Odontella aurita</i> (Lyngbye) Agardh (Fig. 72)	58	Planctónica
<i>Odontella</i> sp. 1	12	Planctónica
Familia Parodontellaceae S. Komura		
<i>Trieres chinensis</i> (Greville) Ashworth & E.C. Theriot	27	Planctónica
Orden Lithodesmiales Round & R.M. Crawford		
Familia Lithodesmiaceae Round		
<i>Ditylum brightwellii</i> (T. West) Grunow	23	Planctónica
Orden Stephanodiscales Nikolaev & Harwood		
Familia Stephanodiscaceae I.V. Makarova		
<i>Cyclotella litoralis</i> Lange & Syvertsen (Fig. 78)	77	Planctónica
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing (Fig. 80)	54	Planctónica
<i>Cyclotella</i> sp. 1	73	Planctónica
<i>Cyclotella striata</i> (Kützing) Grunow (Fig. 79)	100	Planctónica
<i>Cyclotella stylum</i> Brightwell (Fig. 81)	4	Planctónica
<i>Lindavia glomerata</i> (H. Bachmann) Adesalu & Julius	35	Planctónica
Orden Thalassiosirales Glezer & Makarova		
Familia Skeletonemataceae Lebour		
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve (Fig. 71)	85	Planctónica
Familia Thalassiosiraceae M. Lebour		
<i>Cymatotheca minima</i> Voigt (Fig. 70)	85	Planctónica
<i>Cymatotheca weissflogii</i> (Grunow) Hendey (Fig. 69)	100	Planctónica
<i>Ehrenbergiulva granulosa</i> (Grunow) Witkowski, Lange-Bertalot & Metzeltin (Fig. 88)	92	Planctónica
<i>Shionodiscus oestrupii</i> (Ostenfeld) A.J. Alverson, S.H. Kang & E.C. Theriot (Fig. 84)	100	Planctónica
<i>Thalassiosira decipiens</i> (Grunow ex Van Heurck) E.G. Jørgensen (Fig. 86)	88	Planctónica
<i>Thalassiosira eccentrica</i> (Ehrenberg) Cleve	69	Planctónica



Figuras 61-72. Diatomeas del contenido intestinal de *C. corteziensis*. 61) *Petrodictyon gemma*; 62) *Aulacoseira granulata*; 63) *Aulacoseira granulata* var. *angustissima*; 64-65) *Neohuttonia reichardtii* (64 vista conectiva, 65 vista valvar); 66-67) *Paralia fenestrata* (66 vista conectiva, 67 vista valvar); 68) *Biddulphia alternans*; 69) *Cymatothea weissflogii*; 70) *Cymatothea minima*; 71) *Skeletonema costatum*; 72) *Odontella aurita*. Barra de escala = 10 µm.

Tabla 2. Especies de diatomeas observadas en contenidos intestinales de *C. corteziensis* cuya aparición estuvo restringida a una temporada.

Especie	Transición (noviembre)	Secas (marzo)	Lluvias (junio)
<i>Navicula flanatica</i> (Fig. 13)		•	
<i>Halamphora coffeiformis</i> (Fig. 38)		•	
<i>Delphineis surirella</i> (Fig. 39)	•		
<i>Tryblionella coarctata</i> (Fig. 51)			•
<i>Nitzschia frustulum</i> (Fig. 55)			•
<i>Nitzschia ligowskii</i> (Fig. 60)		•	
<i>Aulacoseira granulata</i> (Fig. 62)			•
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (Fig. 63)			•
<i>Skeletonema costatum</i> (Fig. 71)	•		
<i>Coscinodiscus rothii</i> (Fig. 83)			•
<i>Coscinodiscus radiatus</i> (Fig. 85)		•	
<i>Ehrenbergiulva granulosa</i> (Fig. 88)			•
<i>Thalassiosira decipiens</i> (Fig. 86)	•		

Las diatomeas ingeridas por *C. corteziensis* fueron mayormente de origen bentónico (72.6%), lo cual coincide con lo observado en otras especies de bivalvos filtradores como *Chione gnidia* Broderip & Somwerby, 1829, *C. undatella* G. B. Sowerby I, 1835, *C. californiensis*

Broderip, 1835 (García-Domínguez *et al.*, 1994), *Corbicula fluminea* O.F. Müller, 1774 (Boltovskoy *et al.*, 1995), *Anadara tuberculosa* Broderip, 1833 (Muñetón-Gómez *et al.*, 2010), *R. philippinarum* y *M. gigas* (Kasim & Mukai, 2009).

La mayor proporción de especies bentónicas en contenidos intestinales de *C. corteziensis* puede estar relacionada con el tipo de sedimentos (MacIntyre *et al.*, 1996), la acción del viento, turbulencia, corrientes de marea (De Jonge, 1985; De Jonge & Van Beusekom, 1995) y la abundancia de la macrofauna (MacIntyre *et al.*, 1996). La combinación de estos factores ocasiona la suspensión de diatomeas bentónicas en la columna de agua o fitoplancton (fitoplancton de oportunidad); este, incluye tanto formas pennadas como céntricas. De acuerdo con De Jonge & Van Beusekom (1995), en sistemas estuarinos en donde ocurren los fenómenos de suspensión, las diatomeas bentónicas pueden llegar a contribuir entre el 50% y 60 % de la biomasa en la columna de agua, quedando disponibles como alimento para organismos filtradores. Esto último confirma la importancia trófica del microfitorbentos en sistemas estuarinos (Delgado, 1989; MacIntyre *et al.*, 1996; Underwood & Kromkamp, 1999) y su contribución en la alimentación de moluscos filtradores (Dupuy *et al.*, 2000; Kasim & Mukai, 2006).

Por otra parte, la menor proporción de diatomeas bentónicas con respecto a las planctónicas observadas durante junio (lluvia) en el estero (boca del estero), sugiere una relación entre ambos factores, ya que tanto la biomasa como la composición de fitoplancton de los estuarios esta controlada por las descargas de los ríos (Cloern *et al.*, 1983). Así, el efecto de las descargas fluviales sobre la composición específica y por ende de la proporción bentónicas-planctónicas, fue evidenciado por presencia de diatomeas planctónicas como: *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen (Fig. 62), *A. granulata* var. *angustissima* (O. Müller) Simonsen (Fig. 63), *Coscinodiscus rothii* (Ehrenberg) Grunow (Fig. 83), *C. radiatus* Ehrenberg (Fig. 85), *Thalassiosira decipiens* (Grunow ex Van Heurck) E.G. Jørgensen (Fig. 86) y *Ehrenbergiulva granulosa* (Grunow) Witkowski (Fig. 88); estas solo se presentaron en el contenido intestinal de *C. corteziensis* durante la temporada de lluvia (junio). Tanto *A. granulata* como *A. granulata* var. *angustissima* son típicas de ambientes continentales (Sala *et al.*, 1997); y de acuerdo con lo observado por Wang *et al.* (2009), la mayor abundancia de *A. granulata* se registra en los meses más cálidos y con menor salinidad, lo que coincide con este estudio (*A. granulata* var. *angustissima* es una variación morfológica del ciclo de vida de *A. granulata* (Kilham & Kilham, 1975)).

Por otra parte, en raíces de mangle los ostiones enfrentan una alta competencia por espacio y alimento (Chavarin Martínez, 2010); además, están expuestos a desecación por los cambios en el nivel de marea, lo cual no ocurre con los ostiones en los otros sustratos. Esto podría explicar porqué en contenidos intestinales de *C. corteziensis* en raíces de mangle hubo menor riqueza que en especímenes de fondo y de sartas suspendidas; empero, es necesario realizar los estudios ex profeso para poder sustentar esta suposición.

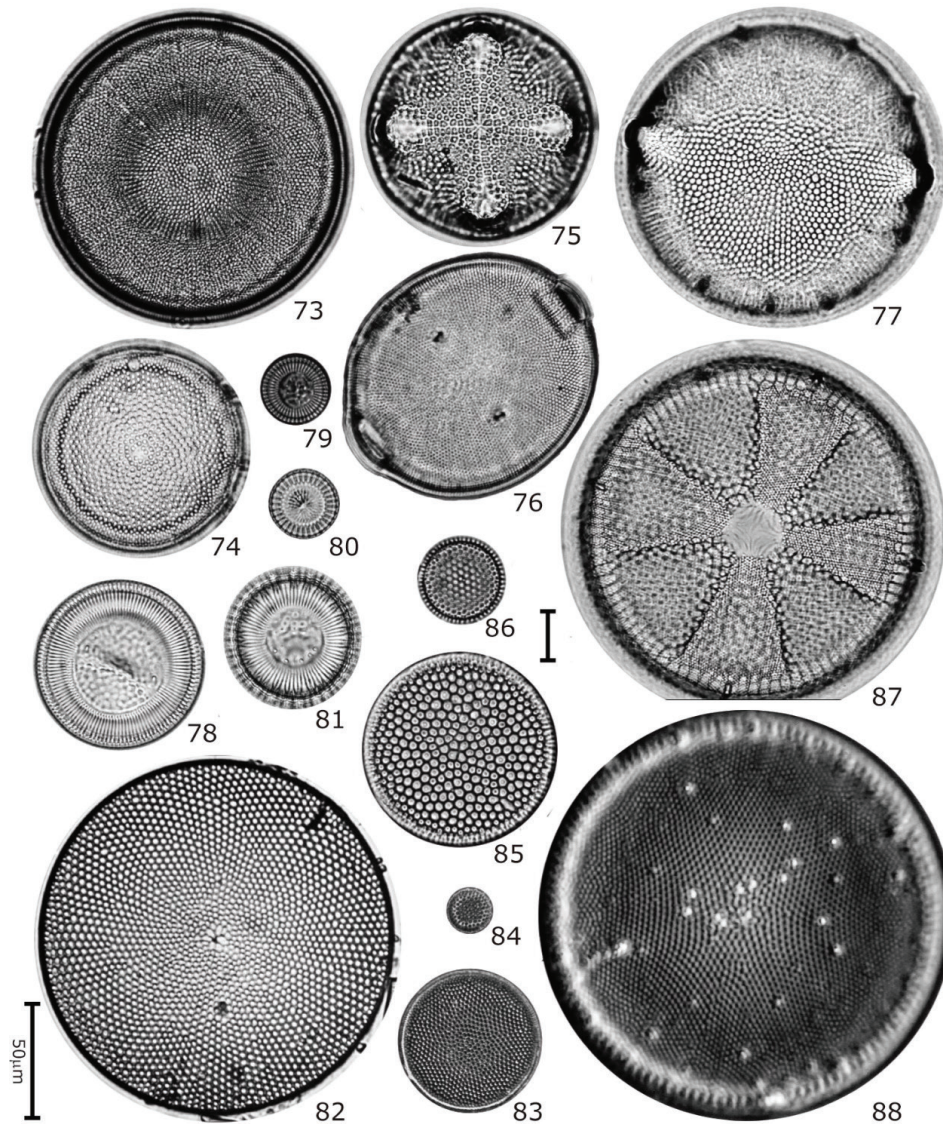
En este estudio, *Neodelphineis silenda* (Fig. 48) y *Cymatotheca weissflogii* (Fig. 69) fueron de las especies más frecuentes en contenidos intestinales de *C. corteziensis*. Estas especies también se han observado abundantemente en el fitoplancton y en sedimentos de estanques de camarón de una granja ubicada en esteros de Teacapán, Sinaloa (Siqueiros-Beltrones & Acevedo-González, 2010). Asimismo, se han observado en sistemas estuarinos de Japón (Hirose *et al.*, 2004; Ohtsuka, 2005; Sar *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012) en donde se cultiva *Magallana gigas*. Lo anterior sugiere que dichas especies son componentes importantes de las comunidades estuarinas y que son susceptibles de ser utilizadas como posibles alternativas para elaborar dietas para la alimentación de bivalvos y crustáceos en cultivo de laboratorio.

Tabla 3. Riqueza específica ("S") de diatomeas en contenidos intestinales de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951 por sitio, sustrato y temporada (N=5).

Sitio	Sustrato	Mes			"S" Sustrato	"S" Sitio
		Noviembre (Transición)	Marzo (Secas)	Junio (Lluvias)		
Estero	Sedimento	51	42	66	100	
	Cultivo	65	70	64	114	152
	Mangle	41	50	57	87	
Canal	Sedimento	64	76	70	113	
	Cultivo	65	87	59	118	147
	Mangle	61	55	48	103	
Laguna	Sedimento	52	53	91	118	
	Cultivo	87	60	NA	105	149
	Mangle	59	48	49	103	
	"S" Mes	143	136	133		

De la misma manera que las especies anteriores, *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulatum* (Fig. 47) fue una de las especies más frecuentes en contenidos intestinales de *C. corteziensis* y también se ha observado en muestras de arrastres superficiales en los esteros de Teacapán (Núñez-Moreno; 1996), en la columna de agua y en sedimentos de estanques de camarón (Siqueiros-Beltrones & Acevedo-González, 2010). Asimismo, ha sido observada en la columna de agua (Kasim & Mukai, 2006), en sedimentos (Hirose *et al.*, 2004; Ohtsuka, 2005; Kasim & Mukai, 2006; Park *et al.*, 2012) y en contenido intestinal de moluscos bivalvos (Kasim & Mukai, 2006) de ambientes estuarinos en Japón. Además, esta especie forma parte del alimento de copépodos (Schultes *et al.*, 2006), sardinas (Cellamare & Gaspar, 2007) y moluscos filtradores (Muñetón-Gómez *et al.*, 2001; Muñetón-Gómez *et al.*, 2010). Por lo tanto, también podría ser considerada como candidata para explorar sus propiedades nutricionales e incorporarla en la dieta de bivalvos y crustáceos en cultivos *in vitro*.

Además de los taxones anteriores, resulta interesante el registro de *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen esta diatomea bentónica sintetiza y libera un pigmento verde-azul hidrosoluble (marenina), el cual provoca que las branquias de los ostiones adquieran una coloración verde (Mouget *et al.*, 2005; Pouvreau *et al.*, 2008). Esta característica en los ostiones ha sido aceptada y valorada en la industria gastronómica; además, se ha demostrado que dicho compuesto tiene efectos antioxidantes, antivirales y anticoagulantes. El reverdecimiento causado por *H. ostrearia* ocurre de manera natural en ambientes similares a los observados en este estudio; es decir, aguas tranquilas y con aportes de agua dulce (Gastineau *et al.*, 2014). De acuerdo con lo anterior, esta diatomea representa un potencial recurso biotecnológico para el cultivo de *C. corteziensis* que podría redituar beneficios desde el punto de vista alimenticio y comercial.



Figuras 73-88. Diatomeas del contenido intestinal de *C. corteziensis*. 73) *Actinocyclus octonarius* var. *ralfsi*; 74) *Actinocyclus octonarius*; 75) *Aulacodiscus kittonii*; 76) *Cerataulus turgidus*; 77) *Pleurosira laevis*; 78) *Cyclotella litoralis*; 79) *Cyclotella striata*; 80) *Cyclotella meneghiniana*; 81) *Cyclotella stylorum*; 82) *Coscinodiscus oculus-iridis*; 83) *Coscinodiscus rothii*; 84) *Shionodiscus oestrupii*; 85) *Coscinodiscus radiatus*; 86) *Thalassiosira decipiens*; 87) *Actinoptychus heliopenita*; 88) *Ehrenbergiulva granulosa*. Barra de escala de 10 µm excepto para Fig. 81 = 50 µm.

Los resultados de este estudio mostraron que *C. corteziensis* se alimentó de un alto número de especies de diatomeas cuyo hábitat es predominantemente bentónico. La composición específica y riqueza de las diatomeas en el contenido intestinal de *C. corteziensis* es propia de sedimentos de zonas estuarinas y representan una primera descripción de la taxocenosis de diatomeas bentónicas del estero Camichín, Nayarit y de ambientes similares de la región. La frecuencia espacial y temporal de *Cyclotella striata*, *Cymatotherca weissflogii*, *Neodelphineis silenda*, *Shionodiscus oestrupii* y *Thalassionema nitzschioides* var. *capitulatum* en contenidos intestinales, representan alternativas para la dieta de *C. corteziensis* en cultivos de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo al proyecto de Retención 203630 "Evaluación de áreas potenciales para el cultivo del ostión *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea iridescens* a través del análisis del alimento disponible y consumido en sitios de mayor crecimiento de los ostiones de la costa de Nayarit" y la beca de manutención (No. becario 336247). A PRODEP por el apoyo financiera al proyecto SEP 23-005. Al M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos y su laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental de la UAN y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN por facilitar las instalaciones y equipos necesarios para el desarrollo de este estudio. A todas las personas que participaron en la recolección del material. DASB es becario COFAA y EDI del IPN. Se reconocen las cuidadosas revisiones hechas al manuscrito por tres árbitros anónimos.

REFERENCIAS

- AL-KANDARI, M., F. Y. AL-YAMANI & K. AL-RIFAI. 2009. *Marine Phytoplankton Atlas of Kuwait's Waters*. Kuwait Institute for Scientific Research, Safat. 351 p.
- BARILLÉ, L., J. HAURE, E. PALES-ESPINOSA & M. MORANCAIS. 2003. Finding new diatoms for intensive rearing of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture* 217 (1-4): 501-514. DOI:10.1016/S0044-8486(02)00257-0
- BENINGER, P. G., A. VALDIZAN, B. COGNIE, F. GUIHENEUF & P. DECOTTIGNIES. 2008. Wanted: alive and not dead: functioning diatom status is a quality cue for the suspension-feeder *Crassostrea gigas*. *Journal of Plankton Research* 30 (6): 689-697. DOI:10.1093/plankt/fbn031
- BEUKEMA, J. J. & G. C. CADEE. 1991. Growth rates of the bivalve *Macoma balthica* in the Wadden Sea during a period of eutrophication: relationships with concentrations of pelagic diatoms and flagellates. *Marine Ecology Progress Series* 68 (3): 249-256. DOI:10.3354/meps068249
- BOLTOVSKOY, D., I. IZAGUIRRE & N. CORREA. 1995. Feeding selectivity of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) on natural phytoplankton. *Hydrobiologia* 312 (3): 171-182. DOI: 10.1007/BF00015510
- CELLAMARE, M. & A. G. GASPAR. 2007. Alimentación de la sardina *Sardinella aurita* (Clupeidae) en el sureste de la isla de Margarita, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela* 46 (1): 23-36. También disponible en la página web <http://www.ojs.udo.edu.ve/index.php/boletiniov/article/view/762/0>
- CHAVARIN-MARTÍNEZ, A. A. 2010. Crecimiento de ostión *Crassostrea corteziensis* en las raíces de mangle de laguna de Agua Brava, Nayarit. Tesis de Licenciatura en Biólogo Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, UAS. Mazatlán, México. 39 p.
- CLOERN, J. E., A. E. ALPINE, B. E. COLE, R. L. J. WONG, J. F. ARTHUR & M. D. BALL. 1983. River discharge controls phytoplankton dynamics in the northern San Francisco Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16 (4): 415-429. DOI: 10.1016/0272-7714(83)90103-8
- COGNIE, B., L. BARILLÉ & Y. RINCÉ. 2001. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. *Estuaries* 24 (1): 126-131. DOI:10.2307/1352819
- COUTTEAU, P. & P. SORGELOS. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey. *Journal of Shellfish Research* 11 (2): 467-476. También disponible en la página web: <http://www.vliz.be/en/imis?module=ref&refid=2726&printversion=1&dropLMIStitle=1>
- DELGADO, M. 1989. Abundance and distribution of microphytobenthos in the bays of Ebro Delta (Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 29 (2): 183-194. DOI:10.1016/0272-7714(89)90007-3
- DE JONGE, V. N. 1985. The occurrence of 'epipsammic' diatom populations: A result of interaction between physical sorting of sediment and certain properties of diatom species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 21 (5): 607-622. DOI: 10.1016/0272-7714(85)90061-7
- DE JONGE, V. N. & J. E. VAN BEUSEKOM. 1995. Wind-and tide-induced resuspension of sediment and microphytobenthos from tidal flats in the Ems estuary. *Limnology and Oceanography* 40 (4): 776-778. DOI:10.4319/lo.1995.40.4.0776
- DE LA LANZA-ESPINO, G., N. SANCHEZ-SANTILLAN, V. SORANI & BOJORQUEZ-TAPIA, J. L. 1996. Características geológicas, hidrológicas y del manglar en la planicie costera de Nayarit, México. *Investigaciones Geográficas* 32 (1): 33-54. DOI:10.14350/ig.59042
- DESIKACHARY, T. V. 1988. Marine diatoms from the Indian Ocean. In: Desikachary, T. V. (ed.). *Atlas of Diatoms. Fasc. V*. Madras Science Foundation, Madras, pp. 1-10.
- DESIKACHARY, T. V. 1989. Marine diatoms from the Indian Ocean. In: Desikachary, T. V. (ed.). *Atlas of Diatoms. Fasc. VI*. Madras Science Foundation, Madras, pp. 1-27.
- DESIKACHARY, T. V., S. GOWTHAMAN & Y. LATHA. 1987. Diatom flora of some sediments from the Indian Ocean region. In: Desikachary, T. V. (ed.). *Atlas of Diatoms. Fasc. II*. Madras Science Foundation, Madras, pp. 1-10.
- DESIKACHARY, T. V. & P. PREMA. 1987. Diatoms from the Bay of Bengal. In: Desikachary, T. V. (ed.). *Atlas of Diatoms. Fasc. III et IV*. Madras Science Foundation, Madras, pp. 1-10.
- DUPUY, C., A. VAQUER, T. LAM-HOAI, C. ROUGIER, N. MAZOUNI, J. LAUTIER, Y. COLLOS & S. L. GALL. 2000. Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 205: 171-184. DOI:10.3354/meps205171
- ESTRADA-GUTIÉRREZ, K. M., D. A. SIQUEIROS-BELTRONES & O. U. HERNÁNDEZ-ALMEIDA. 2017. New records of benthic diatoms (Bacillariophyceae) for Mexico in the Nayarit littoral found in gut contents of *Crassostrea corteziensis* (Mollusca: Bivalvia). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88 (4): 985-987. DOI: 10.1016/j.rmb.2017.10.039
- FOGED, N. 1975. *Some Littoral Diatoms from the Coast of Tanzania*. J. Cramer, Vaduz. 225 p.
- FOGED, N. 1978. *Diatoms from Eastern Australia*. J. Cramer, Vaduz. 243 p.
- FOGED, N. 1984. Freshwater and littoral diatoms from Cuba. J. Cramer, Germany. 243 p.
- GARCÍA-DOMÍNGUEZ, F. A., P. E. FÉLIX-PICO, C. C. JUÁREZ-OLVERA & N. ROMERO. 1994. Alimentación de *Chione gnidia* (Broderip & Somerby, 1829), *C. undatella* (Sowerby, 1835) y *C. californiensis* (Broderip, 1835) (Veneridae) en la Ensenada de la Paz, B.C.S., México. *Investigaciones Marinas-CICIMAR* 9 (2): 113-117.
- GASTINEAU, R., F. TURCOTTE, J. B. POUVREAU, M. MORANCAIS, J. FLEURENCE, E. WINDARTO, F. SEMBA, S. ARSAD, P. JAQUEN, M. BABIN, L. COIFFARD, C. COUTEAU, J. F. BARDEAU, B. JACQUETTE, V. LEIGNEL, Y. HARDIVILLIER, I. MARCOTTE, N. BOURGOUNNON, R. TREMBLAY, J. S. DESCHÉNES, H. BADAWY, P. PASETTO, N. DAVIDOVICH, G. HANSEN, J. DITTMER & J. L. MOUGET. 2014. Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Marine Drugs* 12 (6): 3161-3189. DOI:10.3390/md12063161
- GLANTZ, S. A. 2006. *Bioestadística*. McGraw-Hill Interamericana, Distrito Federal. 520 p.
- GUIRY, M. D & G. M. GUIRY. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponible en línea en: <http://www.algaebase.org> (consultado el 29 septiembre 2017).

- HERNÁNDEZ-ALMEIDA, O. U. 2005. Variaciones temporales en asociaciones de diatomeas epifitas en macroalgas de una zona subtropical. Tesis de Maestría en Ciencias (Especialidad en manejo de recursos marinos), Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. La Paz, México. 129 p.
- HIROSE, K., T. GOTOH, H. SATO & S. YOSHIKAWA. 2004. Diatoms in surface sediments from northeastern part of Osaka Bay, southwestern Japan. *Diatom Research* 20 (1): 229-240. DOI:10.11464/diatom1985.20.0_229
- HURTADO-OLIVA, M. Á. 2008. Efecto de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en la reproducción del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). Tesis de Doctorado en Ciencias (Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Orientación en Acuicultura), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C, La Paz, México. 228 p. También disponible en la página web http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/210/hurtado_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- HUSTEDT, F. 1930. Die kieselalgen Deutschland, Osterreichsun der Schweiz. In: Rabenhorst, L. (ed.). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, OsterreichsunSwweiz, VII Band*. Koeltz Scientific Book, Leipzig, pp. 1-466.
- HUSTEDT, F. 1955. *Marine littoral diatoms of Beaufort, North Carolina*. Duke University Press, Durham. 67 p.
- HUSTEDT, F. 1959. Die kieselalgen Deutschlands, Osterreichs and der Schweiz. In: Rabenhorst, L. (ed.). *Kryptogamen-Flora von Deutschland, OsterreichsunSwweiz, VII Band*. Koeltz Scientific Book, Leipzig, pp. 1-845.
- HUSTEDT, F. 1961-1966. Die kieselalgen Deutschlands, Osterreichs and der Schweiz. In: Rabenhorst, L. (ed.). *Kryptogamen-Flora. VII Band*. Koeltz Scientific Book, Leipzig, pp. 1-861.
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA). 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Nayarit. Disponible en línea en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biblioteca/ficha.aspx?upc=702825293079> (consultado el 8 noviembre 2016).
- KASIM, M. & H. MUKAI. 2006. Contribution of benthic and epiphytic diatoms to clam and oyster production in the Akkeshi-ko estuary. *Journal of Oceanography* 62 (3): 267-281. DOI:10.1007/s10872-006-0051-9
- KASIM, M. & H. MUKAI. 2009. Food sources of the oyster (*Crassostrea gigas*) and the clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Akkeshi-ko estuary. *Plankton & Benthos Research* 4 (3): 104-114. DOI:10.3800/pbr.4.104
- KILHAM, S. & P. KILHAM. 1975. *Melosira granulata* (Ehr.) Ralfs: Morphology and ecology of a cosmopolitan freshwater diatom. *Verhandlungen des Internationalen Verein. Limnologie* 19: 2716-2721. DOI:10.1080/03680770.1974.11896368
- KRAMMER, K. & H. LANGE-BERTALOT. 1991a. Bacillariophyceae, 3 Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/3*. Gustav Fischer Verlag, Germany, pp. 242-398.
- KRAMMER, K. & H. LANGE-BERTALOT. 1991b. Bacillariophyceae, 4 Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: Gerloff, H. J., H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/4*. Gustav Fischer Verlag, Germany, pp. 277-420.
- KRAMMER, K. & H. LANGE-BERTALOT. 1997a. Bacillariophyceae, 1 Teil: Naviculaceae. In: Gerloff, H. J., H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/1*. Gustav Fischer Verlag, Germany, pp. 518-674.
- KRAMMER, K. & H. LANGE-BERTALOT. 1997b. Bacillariophyceae, 2 Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Gerloff, H. J., H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 2/2*. Gustav Fischer Verlag, Germany, pp. 254-448.
- LÓPEZ-FUERTE, F. O., D. A. SIQUEIROS-BELTRONES & J. N. NAVARRO. 2010. *Benthic diatoms associated with mangrove environments in the northwest region of Mexico*. CONABIO-UABCS-IPN, México. 206 p. También disponible en la página web http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitaless/BenticDiatoms.pdf
- MACINTYRE, H. L., R. J. GEIDER & D. C. MILLER. 1996. Microphytobenthos: The Ecological Role of the «Secret Garden» of Unvegetated, Shallow-Water Marine Habitats. I. Distribution, Abundance and Primary Production. *Estuaries and Coasts* 19 (2): 186-201. DOI:10.2307/1352224
- MORENO, J. L., S. LICEA & H. SANTOYO. 1996. *Diatomeas del Golfo de California*. Universidad Autónoma de Baja California Sur-SEP-FOMES-PRO-MARCO. México. 273 p.
- MORENO-RUIZ, J. L., S. LICEA-DURÁN & M. ALVAREZ-RUBIO. 1994. Contenido fitoplanctónico en el tubo digestivo de *Crassostrea virginica* GME-LIN, en la Laguna de Tamiahua (diciembre, 1985-noviembre, 1986). *Series Grandes Temas de la Hidrobiología; Los Sistemas Litorales, UAMI, UNAM* (2):1-14.
- MOUGET, J. L., P. ROSA, C. VACHOUX & G. TREMBLIN. 2005. Enhancement of marenine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology* 17 (5): 437-445. DOI:10.1007/s10811-005-0561-7
- MUÑETÓN-GÓMEZ, M. S., M. VILLALEJO-FUERTE & I. GÁRATE-LIZÁRRAGA. 2001. Contenido estomacal de *Spondylus leucacanthus* (Bivalvia: Spondyliidae) y su relación con la temporada de reproducción y la abundancia de fitoplancton en Isla Danzante, Golfo de California. *Revista de Biología Tropical* 49 (2): 581-590. También disponible en la página web <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/17465/16980>
- MUÑETÓN-GÓMEZ, M. S., M. VILLALEJO-FUERTE & I. GÁRATE-LIZÁRRAGA. 2010. Gut content analysis of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) through histological sections. *CICIMAR-Oceánides* 25 (2): 143-148.
- NÚÑEZ-MORENO, A. 1996. Fitoplancton del sistema lagunar Teacapán-Agua Brava, Sinaloa-Nayarit, México (diciembre, 1989). *Revista de investigación científica, Serie Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Baja California Sur* 7 (1-2):1-14.
- OHTSUKA, T. 2005. Epipellic diatoms blooming in Isahaya Tidal Flat in the Ariake Sea, Japan, before the drainage following the Isahaya-Bay Reclamation Project. *Phycological Research* 53 (2): 138-148. DOI:10.1111/j.1440-183.2005.00380.x
- PADILLA-LARDIZABAL, G. & V. AGUILAR-MEDINA. 2014. Manual de buenas prácticas y protocolo sanitario para el cultivo de ostión en el estado de

- Nayarit. Comité Estatal de Sanidad Acuicola del Estado de Nayarit. Tepic. Nay. 38 p.
- PARK, J., J. S. KHIM, T. OHTSUKA, H. ARAKI, A. WITKOWSKI & C. H. KOH. 2012. Diatom assemblages on Nanaura mudflat, Ariake Sea, Japan: with reference to the biogeography of marine benthic diatoms in Northeast Asia. *Botanical Studies* 53: 105-124. También disponible en la página web <https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2012/1/Bot531-11.pdf>
- PERAGALLO, H. & M. PERAGALLO. 1908. *Diatomees marines de France et des districts marines voisins*. M. J. Tempère, Grez-sur-Loing. 493 p.
- PONIS, E., I. PROBERT, B. VÉRON, M. MATHIEU & R. ROBERT. 2006. New microalgae for the pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 253 (1-4): 618-627. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.09.011
- POUVREAU, J. B., M. MORANCAIS, P. PONDAVEN, J. FLEURENCE, F. GUÉRARD & L. DUFOSSÉ. 2008. Colorimetric study of marennine, a blue-green pigment from the diatom *Haslea ostrearia* responsible for natural greening of cultured oyster. In: Heinonen, M. (ed.). *Pigments in Food, For Quality and Health*. Yliopistopaino, Helsinki, pp. 174-176. También disponible en la página web https://www.researchgate.net/profile/Laurent_Dufosse/publication/258148992_Colorimetric_study_of_marennine_a_blue-green_pigment_from_the_diatom_Haslea_ostrearia_responsible_for_natural_greening_of_cultured_oyster/links/0deec52aa74159ba5b000000/Colorimetric-study-of-marennine-a-blue-green-pigment-from-the-diatom-Haslea-ostrearia-responsible-for-natural-greening-of-cultured-oyster.pdf
- ROUILLON, G. & E. NAVARRO. 2003. Differential utilization of species of phytoplankton by the mussel *Mytilus edulis*. *Acta Oecologica* 24: 299-305. DOI:10.1016/S1146-609X(03)00029-8
- RICARD, M. 1987. *Atlas Do Phytoplankton Marin. Volume II: Diatomophycées*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 297 p.
- ROUND, F. E., R. M. CRAWFORD & D. G. MANN. 1990. *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 747 p.
- SALA, S. E., S. R. DUQUE, M. NÚÑEZ-AVELLANEDA & A. A. LAMARO. 1997. Nuevos Registros de Diatomeas (Bacillariophyceae) de la Amazonia Colombia. *Caldasia* 21 (1): 26-37. También disponible en la página web <https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/17485/18352>
- SAR, E. A., I. SUNESEN & A. S. LAVIGNE. 2010. *Cymatotheca*, *Trybliptychus*, *Skeletonema* and *Cyclotella* (Thalassiosirales) from Argentinian coastal waters. Description of *Cyclotella Cubiculata* sp. nov. *Vie et Milieu-Life and Environment* 60 (2): 133-154. Also available at: https://www.researchgate.net/publication/233741545_Cymatotheca_Trybliptychus_Skeletonema_and_Cyclotella_Thalassiosirales_From_Argentinian_coastalwaters_Description_of_Cyclotella_Cubiculata_sp_nov
- SCHULTES, S., P. G. VERITY & U. BATHMANN. 2006. Copepod grazing during an iron-induced diatom bloom in the Antarctic Circumpolar Current (EisenEx): I. Feeding patterns and grazing impact on prey populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 338 (1): 16-34. DOI:10.1016/j.jembe.2006.06.028
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. 2002. *Diatomeas bentónicas de la Península de Baja California; diversidad y potencial ecológico*. Océánides/CICIMAR-IPN/UABCS. 102 p.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. & A. ACEVEDO-GONZÁLEZ. 2010. Cambios temporales en asociaciones de diatomeas bentónicas en estanques de cultivo de camarón. *CICIMAR-Océánides* 25 (1): 39-52.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. & U. ARGUMEDO-HERNÁNDEZ. 2012. Diversidad de diatomeas en la dieta *in situ* de *Chiton virgulatus* Sowerby, 1840 (Mollusca: Polyplacophora) de Baja California Sur. *Hidrobiológica* 22 (3): 267-281. También disponible en la página web http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972012000300008
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A., U. ARGUMEDO-HERNÁNDEZ & F. O. LÓPEZ-FUERTE. 2017. Diversity of benthic diatoms in the Guerrero Negro Lagoon (El Vizcaino Biosphere Reserve), Baja California Peninsula, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88 (1): 21-35. DOI:10.1016/j.rmb.2017.01.026
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A., S. IBARRA-OBANDO, S & D. H. LOYA-SALINAS. 1987. An approximation to the floristic structure of the epiphytic diatoms of *Zostera marina* and its temporal variations in Bahía Falsa, San Quintin, B.C. *Ciencias marinas* 11 (3): 69-88.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. & E. SÁNCHEZ-CASTREJÓN. 1999. Structure of benthic diatom assemblages from a mangrove environment in Mexican subtropical lagoon. *Biotropica* 31 (1): 48-70.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A., F. O. LÓPEZ-FUERTE & I. GÁRATE-LIZÁRRAGA. 2005. Structure of diatoms assemblages living on prop roots of the red mangrove (*Rhizophora mangle*) from the west coast of Baja California Sur, Mexico. *Pacific Science* 59 (1): 79-96.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. & D. VOLTOLINA. 2000. Grazing Selectivity of Red Abalone *Haliotis rufescens* Postlarvae on Benthic Diatom Films under Culture Conditions. *Journal of the World Aquaculture Society* 31 (2): 239-246. DOI:10.1111/j.1749-7345.2000.tb00359.x
- SCHMIDT, A., M. SCHMIDT, F. FRICKE, H. HEIDEN, O. MÜLLER & F. HUSTEDT. 1874-1959. *Atlas der diatomaceenkunde*. Heft 1-120, Tafeln 1-460. Reissland, Leipzig. 208 p.
- STIDOLPH, S. R., F. A. S. STERRENBURG, K. E. L. SMITH & A. KRABERG. 2012. *Stuard R. Stidolph Diatom Atlas*. U. S. Geological Survey, Reston. 199 p.
- UNDERWOOD, G. J. C. & J. C. KROMKAMP. 1999. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: Nedwell, D. B. & D. G. Raffaelli (eds.). *Estuaries*. Vol. 29. Academic Press. Londres, pp. 93-153. DOI: 10.1016/S0065-2504(08)60192-0 29:
- VILLALEJO-FUERTE, M., M. S. MUÑETÓN-GÓMEZ & I. GÁRATE LIZÁRRAGA. 2005. Gut content, phytoplankton abundance and reproductive season in the black oyster (*Hyotissa hyotis*, Linné, 1758) at Isla Espíritu Santo, Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* 24 (1): 185-190.
- WANG, C., X. LI, Z. LAI, X. TAN, S. PANG & W. YANG. 2009. Seasonal variations of *Aulacoseira granulata* population abundance in the Pearl River Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85 (4): 585-592.
- WITKOWSKI, A., H. LANGE-BERTALOT & D. METZELTIN. 2000. *Diatom flora of marine coasts I*. A.R.G. Gantner Verlag K.G, Alemania. 925 p.
- ZAMBRANO-SORIA, M. 2015. Crecimiento y calidad del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* cultivado en Nayarit. Tesis de Maestría en Ciencias (Área Pesquera), Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, México. 39 p.

Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* de la costa central de Sinaloa, México

Prevalence of *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) in the callista clam *Megapitaria squalida* from the central coast of Sinaloa, Mexico

Andrés Martín Góngora-Gómez¹, Pedro Antonio Sandoval-Rivera¹, Lizeth Carolina Villanueva-Fonseca¹, Melina López-Meyer², Juan Carlos Sainz-Hernández¹, Laura Gabriela Espinosa-Alonso², Diana Cecilia Escobedo-Urías³, Juan Antonio Hernández-Sepúlveda³, Hervey Rodríguez-González¹ y Manuel García-Ulloa^{1*}

Recibido: 27 de junio de 2018.

Aceptado: 31 de julio de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

RESUMEN

¹ Departamento de Acuicultura, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa, 81101, México

² Departamento de Biotecnología, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa, 81101, México

³ Departamento de Medio Ambiente, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa, 81101, México

*Corresponding author:

Manuel García-Ulloa: e-mail: turbotuag@hotmail.com

Tel/fax: (687) 8729626, ext. 87651.

To quote as:

Góngora-Gómez A. M., P. A. Sandoval Rivera, L. C. Villanueva-Fonseca, M. López-Meyer, J. C. Sainz-Hernández, L. G. Espinosa-Alonso, D. C. Escobedo-Urías, J. A. Hernández-Sepúlveda, H. Rodríguez-González & M. García-Ulloa. 2019. Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* de la costa central de Sinaloa, México. *Hidrobiológica* 29 (3): 129-136.

Antecedentes: Diferentes especies del protozoario *Perkinsus* spp. han sido asociados con mortalidades de moluscos comerciales. **Objetivos:** Se evaluó la prevalencia de *Perkinsus* sp. en la almeja *Megapitaria squalida* (junio 2015 a noviembre de 2016) para determinar la relación de la infección con la talla. **Métodos:** Se sembraron 5,000 semillas (5.73 mm altura de la concha y 0.03 g de peso inicial) en un refugio pesquero de Altata, Sinaloa. Se recolectaron 60 ejemplares cada mes para evaluar su crecimiento y prevalencia del parásito. Se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, profundidad y transparencia) y la longitud, largo y ancho de la concha y peso final de *M. squalida*. **Resultados:** La prueba de medio fluido de tioglicolato de Ray (MFTR) detectó células esféricas (10X) de color oscuro, indicando la presencia de presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. durante los primeros 17 meses de muestreo. La intensidad de la infección promedio fue de grado 2 (leve), mientras que la prevalencia máxima fue de 43.33% en los meses de noviembre (2015) y marzo (2016), con un promedio de 21.05%. Ninguna de las muestras positivas (n = 112) de *Perkinsus* sp. con MFTR confirmó la presencia del protozoario. No se obtuvo correlación ($p > 0.05$) entre la prevalencia del patógeno con todos los parámetros estudiados. **Conclusiones:** Los resultados sugieren que *M. squalida* es poco susceptible a la infección de *Perkinsus* sp. El presente trabajo representa el primer reporte de *Perkinsus* sp. en la almeja chocolata *M. squalida*.

Palabras clave: almeja chocolata, Bahía de Altata, estado sanitario, Perkinsosis, refugio pesquero

ABSTRACT

Background. Different species of *Perkinsus* spp. have been associated to mortality of commercial mollusks. **Goals.** The prevalence of *Perkinsus* sp. in the callista clam *Megapitaria squalida* was evaluated monthly (June 2015 to November 2016) to determine the relationship between the infection and size of clam. **Methods.** 5,000 clam seeds (5.73 mm height of the shell and 0.03 g of initial weight) were placed in a fishing refuge of Altata, Sinaloa. A total of 60 specimens were collected each month to evaluate their growth and parasite prevalence. The water physicochemical parameters (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, depth, and transparency) and the length, height, and width of the shell and final weight of *M. squalida* were obtained. **Results.** Ray's thioglycollate fluid medium test (MFTR) detected spherical cells (10X) of dark color indicating the presence of presumed hypospores of *Perkinsus* sp. during the first 17 months of sampling. The mean infection intensity was grade 2 (mild), while the maximum prevalence was 43.33% in the months of November (2015) and March (2016), with an average of 21.05%. None of the *Perkinsus* sp sample (n = 112) positively detected by MFTR confirmed the presence of the protozoan. There was no correlation ($p > 0.05$) between the prevalence of the pathogen with all the parameters studied. **Conclusions.** The results suggest that *M. squalida* is not susceptible to *Perkinsus* sp. The present represents the first report of *Perkinsus* sp. in the callista clam *M. squalida*.

Keywords: Altata Bay, callista clam, fishing refuge, Perkinsosis, sanitary status

INTRODUCCIÓN

Algunas de las principales especies de moluscos bivalvos que se producen en México están representadas por los ostiones y las almejas (SAGARPA, 2016), las cuales, son destinadas al mercado local y en algunos casos, constituyen la única fuente de ingresos para muchas familias de los campos pesqueros ubicados en los márgenes de las bahías. De los bivalvos nativos explotados comercialmente destacan: *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) (ostión de placer, Ostreidae) *Anadara* spp. (pata de mula, Arcidae), *Atrina* spp. (callo de hacha, Pinnidae), *Chione* spp. (almeja roñosa, Veneridae) y *Megapitaria* spp. (almeja chocolata, Veneridae) (SAGARPA, 2015). Las últimas estadísticas de producción de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en Sinaloa, indican un volumen total de 5,083 toneladas (CONAPEPESCA, 2018). Específicamente en Bahía Altata, Sinaloa, la captura promedio anual de *M. squalida* en 2009 fue de 41.22 toneladas, sin embargo, se presentó un colapso en el volumen de extracción en 2014 y 2017, años en los que se registraron solo 1.18 y 2.82 toneladas, respectivamente (CONAPEPESCA, 2018), lo que sugiere la acción de factores como la sobreexplotación, que han afectado su población; aunque la contaminación de su hábitat (Muñoz-Sevilla *et al.*, 2017) y las enfermedades provocadas por parásitos (Góngora-Gómez *et al.*, 2016) también deben ser considerados en la reducción de su población.

La afección de patógenos en moluscos es descrita con diversos signos que van desde el simple desarrollo de la enfermedad (Navarro-Barrera, 2011), daño en tejidos (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007) y perforaciones de la concha (Gallo-García *et al.*, 2004), hasta mortalidades masivas (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010). Cáceres-Martínez *et al.* (2010) concluyeron que el protozoario *Perkinsus marinus* (Levine, 1978) representa uno de los mayores riesgos en la industria ostrícola. De hecho, Enríquez-Espinoza *et al.* (2010) reportaron que la mortalidad masiva registrada en más de 30 granjas de ostión de la costa de Sonora durante 2006, estuvo asociada con la presencia de este parásito. Los bivalvos que han sido infectados en el Golfo de California por diversas especies de *Perkinsus* incluyen poblaciones silvestres de ostiones (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; 2012), almejas (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015) y callos de hacha (Góngora-Gómez *et al.*, 2016); además de ostiones cultivados (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013).

A pesar de los reportes acerca de la presencia de este protozoario en moluscos de la costa sureste del Golfo de California (Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013; Góngora-Gómez *et al.*, 2016), de la facilidad con que se transmite horizontalmente entre huéspedes de diferentes especies (Villalba *et al.*, 2004; OIE, 2012) y de ser la presunta causa de mortalidades en moluscos comerciales del noroeste de México (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez & Vázquez-Yoemans, 2012), no existe información disponible del estado sanitario de *M. squalida* en Sinaloa con relación a la presencia de *Perkinsus* sp., por lo que es prioritario registrar su posible aparición y grado de infección en la población silvestre de esta almeja mantenida en el refugio pesquero de bahía de Altata, Municipio de Navolato, Sinaloa, donde regularmente se siembran semillas producidas en laboratorio con fines de repoblación. Por lo tanto, la determinación de la prevalencia y grado de infección de *Perkinsus* sp. con relación a la talla de la almeja *M. squalida* del refugio pesquero de bahía de Altata, Sinaloa, representa el objetivo de la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La bahía de Altata se encuentra dentro del sistema lagunar Altata-Pabellones, Navolato, Sinaloa (Fig. 1), entre las coordenadas 24° 20' y 24° 40' de latitud norte y los 107° 30' y 108° 00' longitud oeste (CAADES, 1996). La siembra se realizó introduciendo 5,000 semillas de almeja chocolata (5.73 mm altura de la concha y 0.03 g de peso inicial) donadas por el Instituto Sinaloense de Acuicultura y Pesca (ISAPESCA), en el corral acuícola (10 X 5 metros) ubicado dentro del refugio pesquero en la bahía de Altata (Fig.1).

Las semillas fueron aclimatadas y sembradas siguiendo el método descrito por Góngora-Gómez *et al.* (2012) para especies bentónicas. Después de los primeros cuatro meses de mantenimiento en bolsas mosquiteras contenidas en canastas ostrícolas, las almejas fueron esparcidas dentro del corral. Cada mes durante 18 meses (junio 2015 a noviembre 2016), se recolectaron al azar 60 almejas del refugio pesquero mediante buceo libre (semiautónomo).

De las conchas, se obtuvieron la longitud (distancia desde la zona anterior hasta la zona posterior de la concha), altura (distancia desde el umbo hasta la parte más distal de la concha) y ancho (la parte más amplia de la concha por el lado dorsal) utilizando una regla vernier de precisión digital (0.01 mm, Mitutoyo, CD-8" CS) (Figura 2). El peso total individual se registró con una balanza granataria (0.01 g, OHAUS, Scout Pro SP 2001).

Mensualmente, se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos *in situ*: la salinidad se registró con un refractómetro de precisión (Atago, S/ Mill, Japón); el pH se obtuvo con un potenciómetro (HANNA, HI 8314, USA); el oxígeno disuelto y la temperatura del agua se midieron con un oxímetro (YIS, 55/12 FT, Ohio 45387); la profundidad y transparencia con un disco Secchi; y para la temperatura ambiente, se utilizó un termómetro de mercurio. Para la clorofila *a* (Cl_a), las muestras de agua se analizaron de acuerdo al protocolo descrito por Strickland & Parsons (1972) y los cálculos usando la ecuación de Jeffrey & Humphrey (1975).

Para determinar la presencia de posibles hipnosporas de *Perkinsus* sp. en *M. squalida*, se preparó medio fluido de tioglicolato de Ray (MFTR), el cual, es considerado la mejor técnica para la detección de este protozoario (OIE, 2009) por su alta sensibilidad y bajo costo. El MFTR se enriqueció con dextrosa y cloruro de sodio siguiendo las concentraciones recomendadas por la OIE (2016): Para 610 ml de H₂O destilada, se agregaron 18.17 g de MFTR, 17.81 g de dextrosa y 12.2 g de NaCl. Posteriormente, se disolvieron los compuestos aplicando calor y agitación en un termo-agitador y el medio se esterilizó usando una autoclave (120 °C) por 15 minutos a una atmósfera de presión. Después, se adicionaron antibióticos (pemprocilina a 500 U ml⁻¹ y estreptomycinina a 500 U ml⁻¹), se vertieron 25 ml de medio preparado en tubos de 50 ml y como antifúngico, se aplicó Nistatina a 400 U ml⁻¹ directamente en el tubo (OIE, 2016).

Las muestras de tejido (glándula digestiva, branquias y manto) recolectadas mensualmente, fueron colocadas en tubos de 50 ml conteniendo MFTR y antibióticos. Los tubos se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 4-7 días. Después, los fragmentos de tejido se maceraron con una hoja de bisturí estéril sobre un portaobjetos de vidrio, se añadió solución yodada de Lugol, para finalmente, contar el número de presuntas hipnosporas mediante observación al microscopio (10X). La intensidad de infección por *Perkinsus* sp. se calculó con el uso de la escala de Mackin (1962) (Tabla 1).

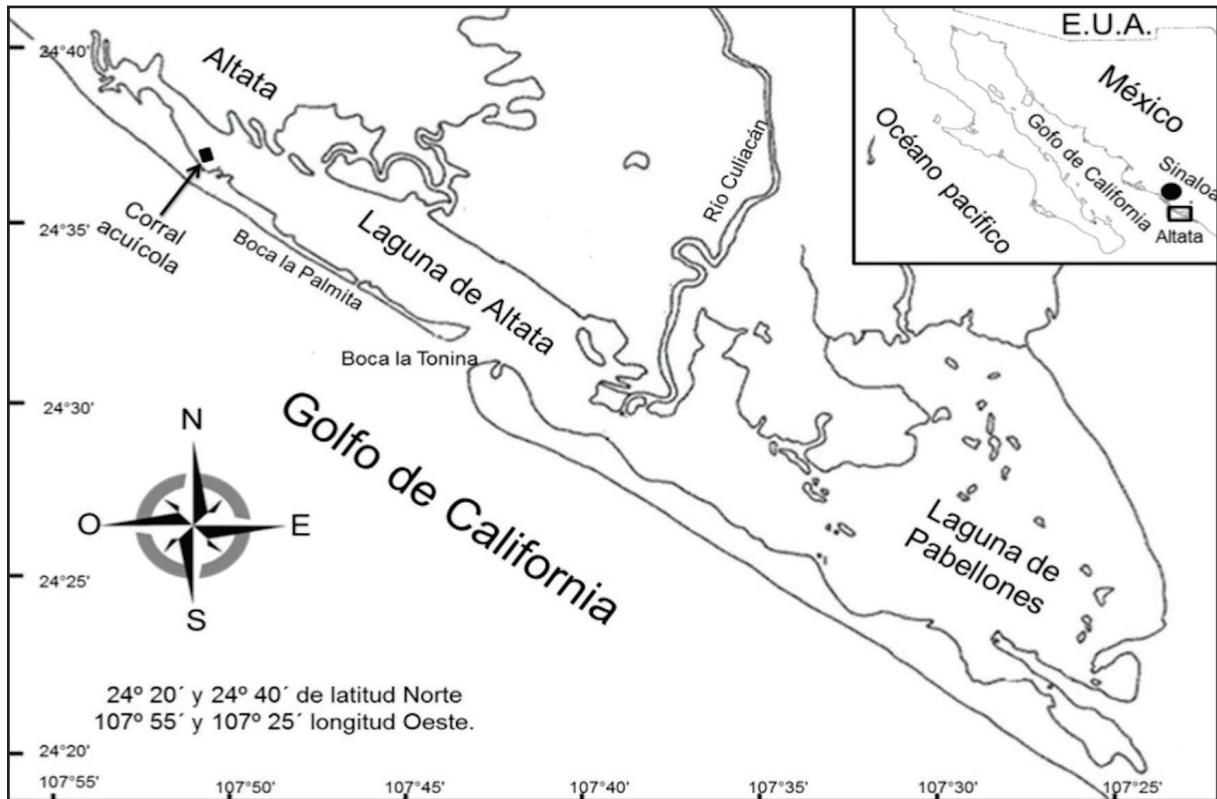


Figura 1. Localización geográfica del corral acuícola frente a la bahía de Altata-Ensenada del Pabellón, Navolato, Sinaloa.

La prevalencia de la infección (P, %) por *Perkinsus* sp. se obtuvo aplicando la fórmula de Thrusfield (1995): $P = (\text{Número de organismos infectados} / \text{No. total de organismos analizados}) \times 100$. Para confirmar la identidad del parásito se realizó un análisis de ADN con la técnica de PCR. Para eso, se extrajo ADN del tejido de branquia (50-100 mg) utilizando el método de DNAzol® siguiendo las indicaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati OH, USA). Se aplicó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; OIE, 2009), utilizando los oligonucleótidos PerkITS85 (5'-CCG CTT TGT TTG GAT CCC-3') y PerkITS750 (5'-ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG-3') (SIGMA-ALDRICH) que amplifican la región espaciadora transcrita interna (internal transcribed spacer, ITS) del rARN ribosomal de *Perkinsus* sp., obteniendo un producto de 703 pares de bases (pb) (OIE, 2009). Los componentes de la reacción fueron los siguientes: My Taq Reaction Buffer 5X (BIOLINE), My Taq DNA Polimerasa 1 U (Bioline Cat. B10 21105 y 1 μM de cada oligonucleótido. Para la reacción, se usaron 100 ng de ADN molde. Estos iniciadores detectan cualquier especie del género *Perkinsus* sp. excepto *P. qugwadi* sp. nov. (*incertae sedis*) (OIE, 2009). El volumen de cada reacción fue de 25 μL.

El ADN extraído del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) infectado por *P. marinus* fue utilizado como control positivo; mientras que el control negativo consistió en la mezcla de reacción de la PCR sustituyendo el ADN por agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1

min; y extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y visualizados con bromuro de etidio (1 μg ml⁻¹) bajo luz UV.

Se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homoscedasticidad (Bartlett) para analizar los datos obtenidos. Las diferencias entre los promedios de cada indicador biométrico de *M. squalida* (n = 60 almejas cada mes durante 18 meses), se obtuvieron con las pruebas de ANOVA y de Tukey. La relación entre las variables físico-químicas, prevalencia e intensidad de la infección fueron obtenidas usando la correlación de Pearson. Para analizar los datos se utilizó el programa STATISTICA 8, a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 1.- Escala de Mackin para calcular la intensidad de infección (Ray, 1954).

Nivel	No. de células de <i>Perkinsus marinus</i> (Levine, 1978)
1	0 (no infectada)
2	1 a 10 células (leve)
3	11 a 30 células (moderada)
4	31 a 100 células (alta)
5	Más de 101 células (muy alta)

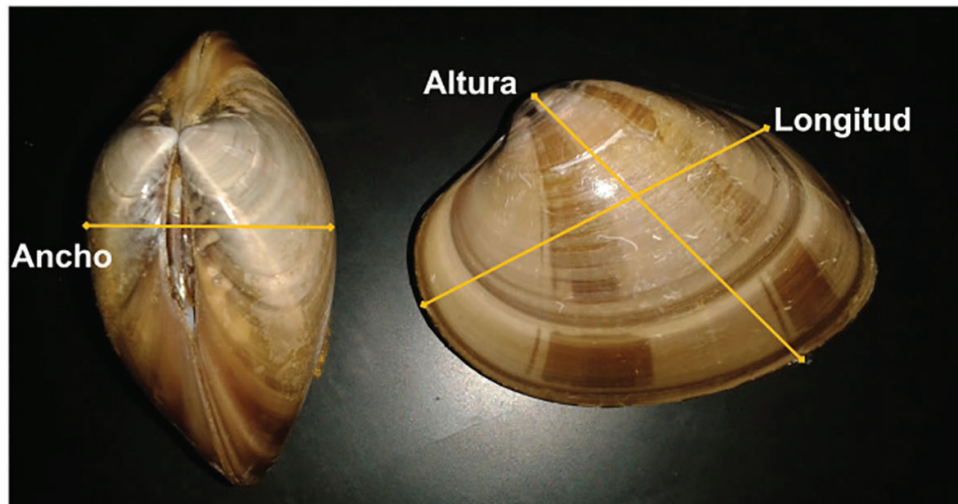


Figura 2. Medidas biométricas (longitud, altura y ancho de la concha) de *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835).

RESULTADOS

Los intervalos de las variables ambientales fueron: temperatura 20-32.5 °C, salinidad 29.8-35‰, pH 5.15-7.84, oxígeno disuelto 3.07-9.56 mg l⁻¹, profundidad y transparencia 0.7-1.8 m y clorofila *a* 0.6-11.7 mg m⁻³. Ninguno de los parámetros mostró correlación con la prevalencia de *Perkinsus* sp. ($r = -0.15$, $r = 0.22$, $r = 0.37$, $r = -0.10$, $r = 0.11$ y $r = 0.04$, respectivamente). Después de 18 meses, las almejas alcanzaron las siguientes medidas: largo de la concha = 59.6 mm, altura de la concha = 46.2 mm, ancho de la concha = 27.5 mm y peso total = 52.6 g. Al igual que los parámetros ambientales, las variables biométricas de *M. squalida* no mostraron correlación con la prevalencia mensual del parásito ($r = -0.37$, $r = -0.24$, $r = 0.40$ y $r = -0.34$, respectivamente). La detección de *Perkinsus* sp. por medio de la

técnica MFTR mostro células esféricas en el microscopio (10X) de color oscuro indicando la presencia de presuntas hiposporas del patógeno en los primeros 17 meses (Figuras 3 y 4). La intensidad de la infección fluctuó desde 0 células (junio 2015) hasta 2.2 células (octubre 2016). En promedio, la intensidad total fue de 2 (1-10 esporas, Mackin, 1962), considerándose leve.

La prevalencia no mostró tendencia o relación con la talla de la almeja (Fig. 4).

Para la confirmación de *Perkinsus* sp. mediante la técnica de PCR, se analizaron 112 muestras (positivas con MFTR) de *M. squalida* presuntamente infectadas por el protozooario, pero ninguna resultó positiva (Figura 5).

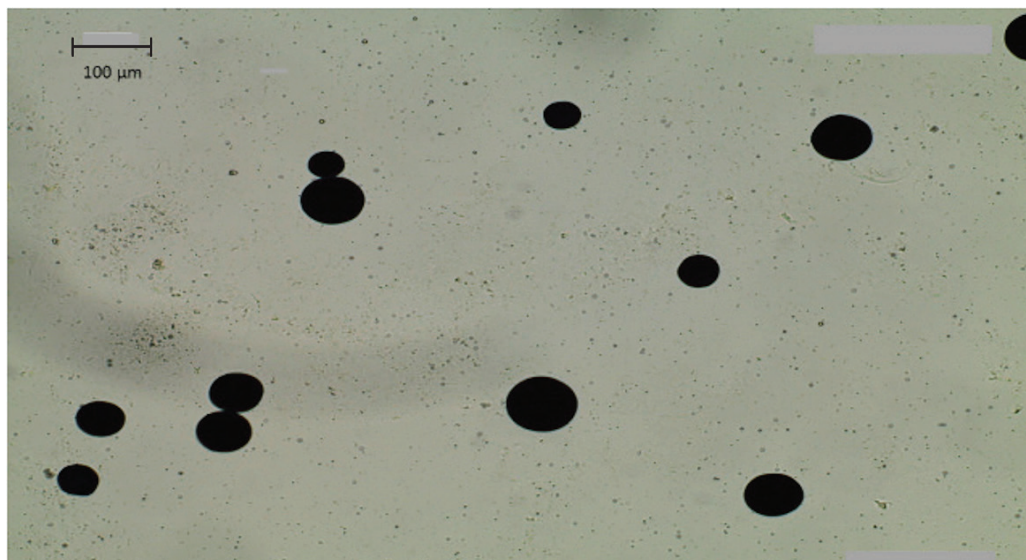


Figura 3. Presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. (10X) en tejido de *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) mostrando un grado de infección 2 en la escala de Mackin (Ray 1954).

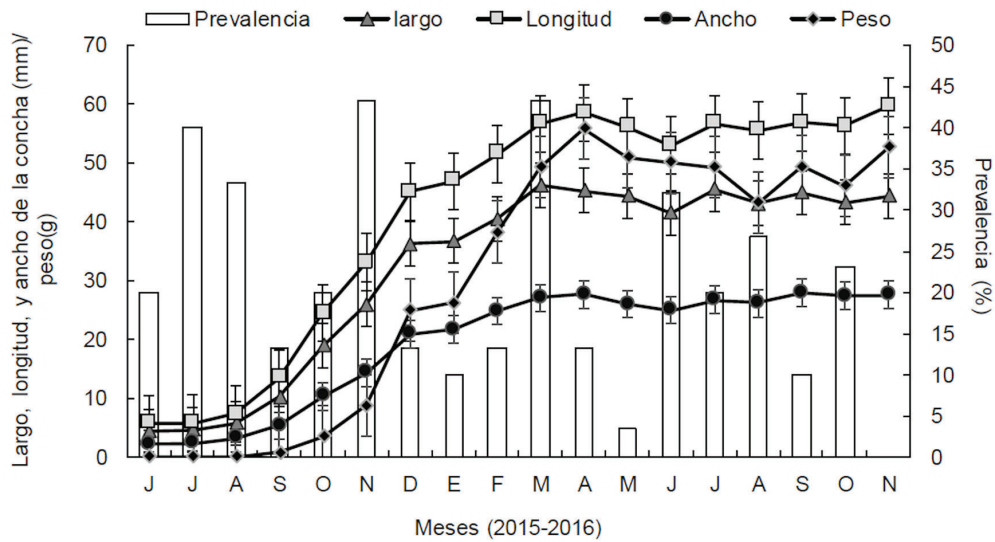


Figura 4. Prevalencia (%) de *Perkinsus* sp. y parámetros biométricos [largo, longitud y ancho de la concha (mm) y peso (g)] de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) registrada durante los 18 meses de cultivo en el corral acuícola de bahía de Altata, Navolato, Sinaloa.

DISCUSIÓN

La prevalencia e intensidad de infección de *Perkinsus* sp. fue determinada en *M. squalida* desde juveniles recién producidos en laboratorio, hasta almejas que, por la talla alcanzada después de 18 meses en el refugio pesquero, pueden considerarse como adultas (Álvarez-Dagnino *et al.*, 2017). La presencia del parásito en el primer mes (20% de prevalencia) y su ausencia en el último muestreo, sugieren que la almeja chocolata pudiera ser infectada con diferentes grados de intensidad, independientemente de su talla, lo cual, es contradictorio a lo encontrado por Taskinen & Valtonen (1995) y Yee-Duarte *et al.* (2017) quienes reportaron que la intensidad infecciosa de diversos parásitos aumenta con la talla y edad de las almejas *Anodonta piscinalis* (Nilsson, 1823) y *M. squalida*, respectivamente. La prevalencia e intensidad de infección encontradas para la almeja chocolata en este trabajo sugieren que en comparación con otros moluscos bivalvos (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007; Gullian-Klanian *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Pineda-García, 2011; Luz *et al.*, 2018), pudiera ser poco susceptible a *Perkinsus* spp., lo cual, coincide con las conclusiones reportadas por Sotelo-López (2014) y Sandoval-Rivera (2016) en *M. squalida* colectada cerca de la zona de este estudio. La prevalencia de la infección mostró tres picos (julio y noviembre 2015 y mayo 2016) durante el estudio sin presentar tendencia estacional, coincidiendo con Brandao *et al.* (2013) para *Crasostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). Burreson & Ragone-Calvo (1996) y Villalba *et al.* (2005) mencionan que la dinámica de infección del parásito está fuertemente asociada a la aparición de amplios intervalos en la temperatura (<20 y >30 °C) y la salinidad del agua (<15 y >35‰), lo cual, es común en el Golfo de México donde se cultiva el ostión americano *C. virginica*. En nuestro trabajo, los intervalos fluctuaron de 20 a 32.5 °C para la temperatura y de 29.8 a 35‰ para la salinidad sin presentar correlación con los indicadores de infección, lo que sugiere que dichos parámetros no alteraron la relación huésped-parásito más allá de los valores de prevalencia e intensidad infecciosa obtenidos.

La detección de esferas redondas y oscuras en *M. squalida*, características de presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. mediante MFTR, indicaron la presencia en lugar de infección del parásito, sin embargo, no se confirmó al probar las muestras positivas con PCR. Algunos autores mencionan que esto puede deberse a una baja intensidad infecciosa del parásito y/o a la poca cantidad de ADN del patógeno usada en la prueba (Burreson, 2008; Sanil *et al.*, 2012; Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015). Dantas-Neto *et al.* (2015) reportó mayores prevalencias de infección de *Perkinsus* sp. en *C. rhizophorae* (Guilding, 1828) utilizando MFTR comparado con PCR, en dos esteros de Brasil. Por lo anterior, se considera que el método de MFTR es más sensible que el PCR (OIE, 2009) en la detección de presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. Enríquez-Espinoza *et al.* (2015) mencionan que para tener resultados positivos con la prueba de PCR, es necesario que la infección sea moderada o mayor según la escala de Mackin (Ray, 1954), lo cual, no sucedió en este estudio.

Los resultados obtenidos pueden ser discutidos analizando algunos factores externos e inherentes a la almeja. Por ejemplo, Villalba *et al.* (2004) mencionan que la fase de vida libre del parásito se caracteriza por células biflageladas que forman parte del plancton, es decir, se encuentran suspendidas en la columna de agua. Por otro lado, el hábitat bentónico de la almeja implica que una vez asentada en el fondo arenoso, donde permanece enterrada gran parte de su vida, reduciría la posibilidad de contacto entre el bivalvo con *Perkinsus* sp. Por otro lado, la mayor parte de las mortalidades reportadas para moluscos comerciales por este protozooario, se refieren a ostiones (Villalba *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2014; Scardua *et al.*, 2017), moluscos cuyos tejidos corporales son más blandos que los que presenta *M. squalida*. Lo anterior sugiere una mayor dificultad de *Perkinsus* sp. para penetrar los tejidos de la almeja, sin embargo, es necesaria la realización de estudios al respecto para confirmarlo.

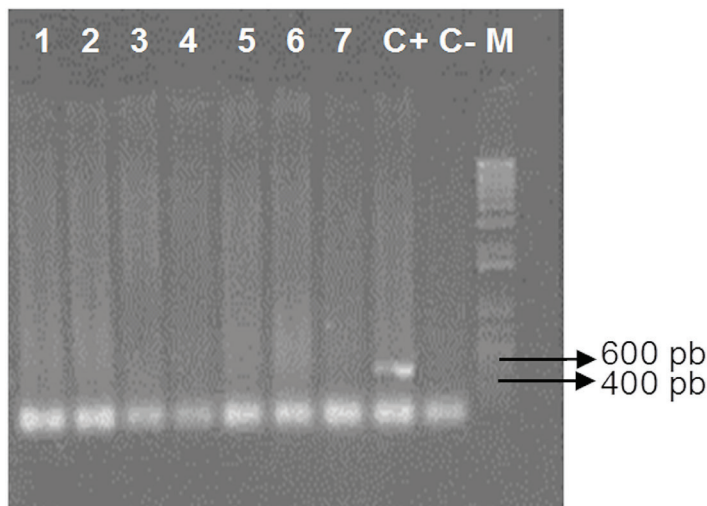


Figura 5. Diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. en gel de agarosa (1%). Detección de la región ITS del rRNA de *Perkinsus* sp. por PCR en *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) de la bahía de Altata, Navolato, Sinaloa. Carriles 1-7) muestras negativas de *Perkinsus* sp.; C+ Control positivo de *Perkinsus* sp.; C- Control negativo y M) Marcador de peso molecular.

Aunque la prevalencia e intensidad de infección fueron bajas, la detección de *Perkinsus* sp en *M. squalida* de la Bahía de Altata, Sinaloa, plantea la necesidad de establecer un programa de monitoreo para conocer el estado sanitario de esa población de almejas en dicho lugar, ya que cambios ambientales y/o efectos antropogénicos conjuntamente con cambios en la dinámica de infección de este patógeno u otros, pudieran poner en riesgo su condición fisiológica y tolerancia a ser infectado. De hecho, es recomendable monitorear sanitariamente otras especies de moluscos en la zona para prevenir y/o evitar una posible transmisión debido a la fácil dispersión del patógeno entre diferentes especies de moluscos (Villalba *et al.*, 2004; OIE, 2012).

El presente trabajo representa el primer informe de la presencia de *Perkinsus* sp. en *M. squalida* en la costa central de Sinaloa, considerando, además, la dinámica de la infección con relación a la talla de la almeja. Sin embargo, es importante realizar otros estudios aplicando diversas técnicas como histología, hibridación *in vitro* u otras herramientas moleculares (Shridar *et al.*, 2013; Aranguren & Figueras, 2016; Guo & Ford, 2016) para conocer el papel como huésped de la almeja en la posible dispersión del protozoario en el refugio pesquero de bahía Altata, Sinaloa y en la entidad en general. En conclusión, la prevalencia de *Perkinsus* sp. no mostró relación con el desarrollo de *M. squalida* y la intensidad de la infección fue leve (grado 2). Se infiere que la almeja chocolata presentó baja susceptibilidad al protozoario.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo logístico y financiero para la realización del presente trabajo, mediante los proyectos: “Crecimiento y supervivencia de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) cultivada en Bahía Altata, Navolato, Sinaloa” (IPN-SIP-20161188) y “Ciclo reproductivo de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en bahía Agiabampo, Ahome, Sinaloa” (IPN-SIP-20170030). AMGG (IPN-EDI y IPN-COFFA), MGU (IPN-

EDI), PASR y LCVF (BEIFI y CONACyT) agradecen el apoyo becario. MLM, JCSh, LGEA, DCEU y JAHS realizaron trabajos de laboratorio, campo y revisión del documento. Al Instituto Sinaloense de Acuicultura y Pesca (ISAPESCA), nuestro agradecimiento por las facilidades otorgadas tanto por la obtención de la semilla, como por la vigilancia y muestreo de almejas.

REFERENCIAS

- AGUIRRE-MACEDO, M. L., R. A. SIMÁ-ÁLVAREZ, M. K. ROMÁN-MAGAÑA & J. I. GÜEMEZ-RICALDE. 2007. Parasite survey of the Eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 19 (4): 270-279. DOI:10.1577/H06-050.1.
- ÁLVAREZ-DAGNINO, E., A. SANTAMARÍA-MIRANDA, M. GARCÍA-ULLOA & A. M. GÓNGORA-GÓMEZ. 2017. Reproduction of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) in the southeast Gulf of California, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 65 (3): 881-889. DOI:10.15517/rbt.v65i3.26371
- ARANGUREN, R. & A. FIGUERAS. 2016. Moving from histopathology to molecular tools in the diagnosis of mollusks diseases of concern under EU legislation. *Frontiers in Physiology* 7: 538. DOI: 10.3389/fphys.2016.00538
- BRANDAO, R. P., G. BOEHS, R. C. SABRY, L. O. CEUTA, M. S. AGUIAR LUZ, F. RAMOS QUEIROGA & P. M. DA SILVA. 2013. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 112 (2): 138-141. DOI:10.1016/j.jip.2012.11.003
- BURRESON, E. M. 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusk protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms* 80 (1): 81-83. DOI:10.3354/dao01925

- BURRESON, E. M. & L. M. RAGONE-CALVO. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oyster in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15: 17-34.
- CAADES (CONFEDERACIÓN DE ASOCIACIONES AGRÍCOLAS DEL ESTADO DE SINALOA). 1996. *Análisis de la agricultura sinaloense*. Reporte 143, 128 p.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J. & R. VÁZQUEZ-YEOMANS. 2012. *Diagnóstico sanitario mediante análisis histopatológico de ostión japonés Crassostrea gigas a la Empresa Sol Azul, SA de CV*. Informe de Resultados (Documento interno). Instituto de Sanidad Acuicola, A. C. 6 p.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., R. VÁZQUEZ-YEOMANS & G. PADILLA-LARDIZÁBAL. 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 22 (3): 141-151. DOI: 10.1577/H09-052.1
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., R. VÁSQUEZ-YEOMANS, G. PADILLA-LARDIZÁBAL & M. A. RIO. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* 99 (1): 66-73. DOI:10.1016/j.jip.2008.03.005
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., M. GARCÍA-ORTEGA, R. VÁSQUEZ-YEOMANS, T. PINEDA-GARCÍA, N. A. STOKES & R. B. CARNEGIE. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 110 (3): 215-325. DOI:10.1016/j.jip.2012.03.019
- CONAPESCA. 2018. *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, 253 p.
- DA SILVA, P. M., M. P. SCARDUA, R. T. VIANNA, R. C. MENDOÇA, C. B. VIERA, C. F. DUNGAN, G. P. SCOTT & K. C. REECE. 2014. Two *Perkinsus* spp. Infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio Sao Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 119: 62-71. DOI:10.1016/j.jip.2014.04.005
- DANTAS-NETO, M. P., R. C. SABRY, L. P. FERREIRA, L. S. ROMAO & R. MAGGIONI. 2015. *Perkinsus* sp. infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 75 (4): 1030-1034. DOI:10.1590/1519-6984.06314
- ENRÍQUEZ-ESPIÑOZA, T. L., J. M. GRIJALVA-CHON, R. CASTRO-LONGORIA & J. RAMOS-PAREDES. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* from the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89 (3): 269-273. DOI:10.3354/dao02199
- ENRÍQUEZ-ESPIÑOZA, T. L., J. M. GRIJALVA-CHON, R. CASTRO-LONGORIA & F. MENDOZA-CANO. 2015. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 17 (1): 10-13.
- GALLO-GARCÍA, M. C., M. GARCÍA-ULLOA & D. E. GODÍNEZ-SIORDIA. 2004. Evaluación de dos tratamientos en la intensidad de gusanos poliquetos asociados a las valvas del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Ciencias Marinas* 30 (3): 455-464.
- GÓNGORA-GÓMEZ, A. M., M. GARCÍA-ULLOA, A. L. DOMÍNGUEZ-OROZCO, J. A. HERNÁNDEZ-SEPÚLVEDA & A. NOLASCO-ORTA. 2012. *Desarrollo Científico y biotecnología para el cultivo comercial de callo de hacha (Atrina maura), en el estado de Sinaloa México*. Mundilibros S. A. de C. V., Tlaxcala. 188 p.
- GÓNGORA-GÓMEZ, A. M., F. RUBIO-ZEPEDA, B. P. VILLANUEVA-FONSECA, E. ÁLVAREZ-DAGNINO, N. P. MUÑOZ-SEVILLA, J. A. HERNÁNDEZ-SEPÚLVEDA & M. GARCÍA-ULLOA. 2016. Primer registro de *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha *Atrina maura* en Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 51 (3): 689-694. DOI:10.4067/S0718-19572016000300020
- GULLIAN-KLANIAN, M., J. A. HERRERA-SILVEIRA, R. RODRÍGUEZ-CANUL & L. AGUIRRE-MACEDO. 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 79 (3): 237-247. DOI:10.3354/dao01910
- GUO, X. & S. E. FORD. 2016. Infectious diseases of marine mollusks and host responses as revealed by genomic tools. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 371(1689):20150206. DOI:10.1098/rstb.2015.0206
- JEFFREY, S. W. & G. F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a1, b1, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical and Physiology Pflanz* 167:191-194.
- LUZ, M. S. A., F. S. CARVALHO, H. C. OLIVEIRA & G. BOEHS. 2018. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 78 (2): 289-295. DOI: 10.1590/1519-6984.07016
- MACKIN, J. G. 1962. *Oyster disease caused by Dermocystidium marinum and other microorganisms in Louisiana*. Institute for Marine Science University of Texas. Texas, pp. 132-229.
- MUÑOZ-SEVILLA, N. P., B. P. VILLANUEVA-FONSECA, A. M. GÓNGORA-GÓMEZ, M. GARCÍA-ULLOA, A. L. DOMÍNGUEZ-OROZCO, R. ORTEGA-IZAGUIRRE & L. E. CAMPOS-VILLEGAS. 2017. Heavy metal concentrations in diploid and triploid oysters (*Crassostrea gigas*) from three farms on the north-central coast of Sinaloa, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment* 189 (11): 536. DOI:10.1007/s10661-017-6223-9
- NAVARRO-BARRERA, A. A. 2011. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, CICESE. Ensenada, Baja California. 66 p.
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2009. *Infection with Perkinsus marinus*. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 2.4.5. 12 p.
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2012. *Manual of diagnostic test for Aquatic Animals*. Available online at: <http://www.oie.int/es/normasinternacionales/manual-acuatico/acceso-enlinea> (consultado el 25 de mayo de 2018).
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2016. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos*. Disponible en línea en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_perkinsus_marinus (consultado el 14 de abril de 2018).
- PINEDA-GARCÍA, T. J. 2011. Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y herpes-virus OsHV-1 en *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas* en el estado de Sinaloa. Tesis de Maestría, Centro de

- Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., (CIAD). Mazatlán, Sinaloa. 60 p.
- RAY, S. M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungi parasite of oysters. Thesis for the degree of Doctor, Rice Institute. Houston, Texas. 119 p.
- SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México. Disponible en línea en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion (consultado el 5 de marzo de 2018).
- SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México. Disponible en línea en: <http://sagarpa.gob.mx/Delegaciones/chihuahua/boletines/Paginas/B001-CSCH01-2016.aspx> (consultado el 14 de abril de 2018).
- SANDOVAL-RIVERA, P. A. 2016. Primer registro de la infección por *Perkinsus* sp., en la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en la bahía de Altata, Navolato, Sinaloa. Tesis de Licenciatura, Universidad de Occidente. Guasave, Sinaloa. 53 p.
- SANIL N. K., G. SUJA, J. LIJO & K. K. VIJAYAN. 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms* 98 (3):209-220. DOI:10.3354/dao02440
- SCARDUA, M. P., R. T. VIANNA, S. S. DUARTE, N. D. FARIAS, M. L. DIAS CORREIA, H. T. A DOS SANTOS & P. M. DA SILVA. 2017. Growth, mortality, and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. Infection during on growing in northeast Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary and Parasitology, Jaboticabal* 26 (4): 401-410. DOI:10.1590/S1984-29612017061
- SHRIDHAR, S., K. HASSAN, D. J. SULLIVAN, G. R. VASTA & J. A. FERNÁNDEZ ROBLEDÓ. 2013. Quantitative assessment of the proliferation of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* using a bioluminescence assay for ATP content. *International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 3: 85-92. DOI:10.1016/j.ijpddr.2013.03.001
- SOTELO-LÓPEZ, F. 2014. Detección del protozoario patógeno *Perkinsus* sp. en almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en el estero Bacorehuis, Ahome, Sinaloa. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa. 48 p.
- STRICKLAND, J. D. & PARSONS, T. R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310 p.
- TASKINEN, J. & E. T. VALTONEN. 1995. Age-, size-, and sex-specific infection of *Anodonta piscinalis* (Bivalvia: Unionidae) with *Rhipidocotyle fenica* (Digenea: Bucephalidae) and its influence on host reproduction. *Canadian Journal of Zoology* 73 (5): 887-897. DOI:10.1139/z95-104
- THRUSFIELD, M. 1995. *Veterinary epidemiology*. Black-Well Publishing, Ames Iowa. 593 p.
- VILLALBA, A., S. M. CASAS, M. C. LÓPEZ & M. J. CARBALLAL. 2005. Study of perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 257-267. DOI: 10.3354/dao065257
- VILLALBA, A., C. GESTAL, S. M. CASAS & A. FIGUERAS. 2011. Perkinsosis en moluscos. In: Figueras, A., B. Novoa (eds.). *Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, pp. 181-242.
- VILLALBA, A., K. S. REECE, M. C. ORDÁS, S. M. CASAS & A. FIGUERAS. 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources* 17 (4): 411-432. DOI:10.1051/alr:2004050.
- VILLANUEVA-FONSECA, L. C. & C. M. ESCOBEDO-BONILLA. 2013. Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41(5): 996-1002. DOI:103856/vol41-issue5-fu011-text-19
- YEE-DUARTE J. A., B. P. CEBALLOS-VÁZQUEZ, E. SHUMILIN, K. KIDD & M. ARELLANO-MARTÍNEZ. 2017. Evidence of health impairment of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) near the "hot spot" of a mining port, Gulf of California. *Hidrobiológica* 27 (3): 391-398.

Taxocenosis macroalgales indicadoras de calidad del agua en sistemas costeros

Macroalgal taxocoenosis as indicators of water quality in coastal systems

Leidy S. Ardila-Poveda*

Recibido: 03 de julio de 2018.

Aceptado: 07 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

RESUMEN

Antecedentes: Las comunidades de macroalgas predominan en las costas marinas, especialmente en las zonas rocosas. La composición de las especies de estas comunidades puede ser característica según la calidad del agua, debido a que cada especie tolera o no variaciones fisicoquímicas, i.e., temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y concentración de nutrientes; por lo tanto, se esperaría que la composición de especies refleje diferentes condiciones fisicoquímicas del agua. **Objetivos:** Determinar los intervalos de tolerancia de especies de macroalgas a condiciones fisicoquímicas y clasificarlas, ya sean tolerantes si sobreviven en amplios intervalos, o como especies sensibles o poco tolerantes, que se distribuyen en condiciones restringidas del agua. **Métodos:** Se construyó una base de datos de los registros georreferenciados de diversos lugares del planeta, donde se ha registrado especies también presentes en el litoral de Baja California Sur (BCS), México, obtenidos del Global Biodiversity Information Facility (GBIF); además, se obtuvieron los promedios de 2005 a 2012 de los valores de variables fisicoquímicas de los lugares donde se ha registrado cada especie, a través de imágenes satelitales obtenidas por sensores remotos de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). **Resultados:** Se generó un mapa de calor que muestra un aparente cambio en la composición de especies (taxocenosis) frente a posibles escenarios de cambio; así, se propone presentar a las especies que sobreviven en amplias variaciones fisicoquímicas y/o nutrientes, como parte de los protocolos de referencia para la distribución del contenido mineral; mientras que las especies con intervalos estrechos de ocurrencia se incluyen como taxa, que indican condiciones en donde estas se presenten. **Conclusiones:** Se proponen las posibles taxocenosis, que se presentarían en BCS bajo diferentes estados de calidad del agua, dependiendo de las concentraciones de nutrientes (silicato y materia orgánica) y fisicoquímicos (oxígeno disuelto y pH) que más contribuyeron a definir la asociación de especies por estado de calidad de agua.

* Programa de Doctorado en Ciencias Marinas. Biodiversidad y Dinámica de Ecosistemas Marinos, Departamento de Desarrollo de Tecnologías, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23096. México

***Corresponding author:**

Leidy S. Ardila-Poveda: e-mail: lsardilap@gmail.com

Palabras clave: bioindicadores, contaminación, distribución de especies, sensible, tolerante

To quote as:

Ardila-Poveda L. S. 2019. Taxocenosis macroalgales indicadoras de calidad del agua en sistemas costeros. *Hidrobiológica* 29 (3): 137-153.

ABSTRACT

Background: Macroalgae communities predominate in coastal areas, especially on rocky shores. The species composition of such communities may be characteristic of a quality status of water inasmuch each species either adapt or not to the physicochemical variables (temperature, pH, salinity and dissolved oxygen). Therefore, differences in species composition would be expected from different concentrations of diluted compounds in water. **Goals:** To determine the macroalgae's tolerance intervals to physicochemical conditions, and to classify them as tolerant if they survive within wide intervals, or as sensitive, poorly tolerant species that are distributed under restricted water conditions. **Methods:** A database was built of georeferenced records of other localities on the planet where species present on the coast of Baja California Sur are also found, was obtained from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Besides, the 2005 to 2012 average values for physicochemical variables and the concentration of nutrients in the water (nitrate, phosphate, silicate and dissolved organic matter) were gathered from other places where each specie has been recorded through satellite images obtained by remote sensors of the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). **Results:** A heatmap was generated showing an apparent distinction in the floristic composition (taxocoenosis), facing possible change scenarios which proposes to include the species that survive within wide physicochemical and/or nutrient variations as part of the reference for protocols on the distribution of mineral content. While species with narrow intervals of occurrence in the measured variables should be considered as taxa that indicate the intervals at which they occur. **Conclusions.** Possible taxocoenosis that can occur in BCS under different water quality conditions are here

proposed. These depend mainly on the concentration of nutrients (silicate and organic matter) and physicochemical (dissolved oxygen and pH) as being those variables with a greater influence on the species association for a given quality status.

Keywords: bioindicators, pollution, sensible, species distribution, tolerant

INTRODUCCIÓN

La calidad del agua en el litoral Pacífico mexicano continúa cambiando por efecto del desarrollo urbano, turístico e industrial (Lara-Lara *et al.*, 2008). El aumento o disminución de los límites naturales en la concentración de compuestos químicos, como oxígeno disuelto, nitratos, fosfatos y metales en la columna de agua, pueden afectar la calidad de los ecosistemas (Botello *et al.*, 2014) debido a tres factores principales: 1) Toxicidad 2) Persistencia y 3) Bioacumulación (Quintero-Rendón *et al.*, 2010).

Las macroalgas se consideran indicadores biológicos, porque presentan ciclos de vida cortos, toman los nutrientes directamente de la columna de agua, son sensibles a contaminantes, son fáciles de observar y de recolectar (Ospina-Álvarez & Peña-Salamanca, 2004; Robledo & Friele-Pelegrián, 2014). Además, reflejan la magnitud del estrés con cambios en el contenido de minerales, así como, las características del hábitat y el grado de exposición a un estresor (Páez-Osuna *et al.*, 2000). La selección de las mejores especies indicadoras, del vasto acervo natural, se obtiene evaluando la sensibilidad o tolerancia (intervalo) a la concentración de elementos en el agua de mar, en el que viven los distintos taxa; y que pueden variar naturalmente y por la contaminación antropogénica (De la Lanza-Espino, 2000).

Se ha observado, que no todas las macroalgas sobreviven en áreas con fuertes actividades antrópicas (Godínez, 2000); es decir, estas especies se distribuyen en intervalos estrechos respecto a las concentraciones de los elementos químicos disueltos en el agua. Por lo tanto, se esperaría que, ante el aumento en las concentraciones de compuestos disueltos, se produzcan cambios a nivel comunitario en la taxocenosis, i.e., florísticos. Dicho cambio, en la asociación de especies puede constituirse como bioindicador de contaminación; para establecer este indicador de cambio se requiere que la taxonomía y la taxocenosis de una comunidad, en un estado inicial de un sistema costero de interés, sean bien conocidas. En el área de Baja California Sur, México, Siqueiros-Beltrones & Riosmena Rodríguez (1995) identificaron 102 especies de macroalgas. Adicionalmente, para la zona se conocen otros aspectos comunitarios, como la variabilidad espaciotemporal de especies conspicuas (Cruz-Ayala, 1996), las especies con mayor producción de biomasa (Fajardo, 1993) y los cambios en contenidos de minerales ante los procesos de contaminación (Páez-Osuna *et al.*, 2000; Hernández-Almaraz *et al.*, 2014, 2016).

Los efectos de variables ambientales en la distribución de las especies pueden estudiarse a través del programa ModestR® que permite descargar, importar y depurar registros georreferenciados de las especies en bases de datos a nivel global (García-Rosello *et al.*, 2014; GBIF, 2018). Las especies con distribución en un amplio intervalo de concentración de un compuesto en el agua indican especies tolerantes ante cambios de la variable. Mientras que, las especies presentes en intervalos estrechos revelan taxa sensibles al cambio (Quintero-Rendón *et al.*, 2010) y muestran un estado particular del sistema costero. Teóricamente, un cambio extraordinario de los límites (máximos y mínimos) que se establecieron a partir de la distribución a nivel mundial, comprometería la supervivencia de cierta especie en el sistema costero, donde se presente dicha condición (Godínez, 2000).

En el presente trabajo, primero se analiza cada variable donde se establecen las concentraciones críticas para la supervivencia a nivel de especie y a nivel de clases. Y, luego, se plantea un modelo hipotético de variación taxocenótica por estados de calidad de sistemas costeros, para Baja California Sur ante escenarios de eutrofización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las variables bióticas o la taxocenosis conformada por 102 especies de macroalgas publicadas en GBIF (Siqueiros-Beltrones *et al.*, 2017) para muestreos de 1994 y 1995 de las bahías La Ventana y La Paz en Baja California Sur (Siqueiros-Beltrones & Riosmena Rodríguez, 1995) fueron actualizadas taxonómicamente mediante la base de datos ALGABASE (Guiry & Guiry, 2018) y utilizando el Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2018). Sin embargo, dado que el programa ModestR® utiliza esta última base para obtener los registros, los nombres derivados se ajustan a esta e incluyen las sinonimias registradas.

La lista taxonómica lograda se consideró como "taxocenosis modelo" de un sistema costero en condiciones iniciales, sin perturbación antropogénica; ésta se incorporó a la aplicación Data Manager, con el fin de obtener las presencias georreferenciadas para todo el planeta en el ambiente marino, de especímenes preservados y/o citados en la literatura de cada especie (García-Rosello *et al.*, 2014; GBIF, 2018). Se obtuvieron 71 especies, con un número robusto de datos de presencia, para elaborar un modelo de distribución de Kernel y realizar una comparación estadística con promedios y desviaciones estándar.

La capa obtenida para cada especie se depuró (García-Rosello *et al.*, 2014) y se superpuso a las capas de variables abióticas, que se obtuvieron del promedio de un conjunto de campos climatológicos, analizados objetivamente (cuadrícula 1°) y campos estadísticos asociados de datos de perfil oceanográfico (5°, 1° y 0.25°) a niveles de profundidad estándar para períodos de composición anuales, estacionales y mensuales para el Océano Mundial del World Ocean Atlas 2013 versión 2 (WOA13 V2). Aquí se analizaron, la temperatura superficial del mar (°C) (Locarnini *et al.*, 2013), salinidad, oxígeno disuelto (ml l⁻¹), silicatos (μmol l⁻¹), fosfatos (μmol l⁻¹), nitratos (μmol l⁻¹) y materia orgánica disuelta (μmol l⁻¹) en agua de mar de 2005 a 2012 (García *et al.*, 2013a, 2013b; Zweng *et al.*, 2013); este análisis se superpuso con la capa obtenida del registro de presencias y con el modelo de distribución de Kernel de cada especie, creando y exportando esto a una base de datos cruzada (Guisande, 2013; García-Rosello *et al.*, 2014) donde cada registro de presencia de la especie le corresponde un promedio para cada valor fisicoquímico y de nutrientes.

Se determinó el intervalo de tolerancia a partir de la amplitud, el método más simple para estimar la dispersión de los datos, es decir, la diferencia entre el mínimo y el máximo de la serie de datos obtenidos. Sin embargo, para evitar muestras sobreestimadas o subestimadas (valores atípicos) se tiene en cuenta aquí, la desviación típica o estándar que mide la variabilidad de los datos respecto a la media en la muestra (Guisande *et al.*, 2006) o tolerancia de la especie. Para visualizar esto, las especies se ordenaron en el eje X, en función del incremento de las concentraciones del compuesto químico en el agua de mar. En el eje Y, se establecieron los valores críticos en donde se perdería el 95% de las especies que conforman la taxocenosis de Baja California Sur. Es así como los valores óptimos que se establecieron corresponden al intercuartil del recorrido del intervalo definido, o donde se agrupa el mayor número de presencia de cada especie.

Se planteó el escenario actual de Baja California Sur con promedios de los últimos seis años, de temperatura superficial del agua de mar (2012-2017) (<https://seatemperature.info/es/mexico/la-paz-temperatura-del-agua-del-mar.html>), lo cual varía según la época del año, invierno (noviembre a febrero) y verano (marzo-octubre) entre 17 y 28 °C (Fig. 2) y se sobrepuso a los intervalos de tolerancia a la temperatura superficial de agua de mar de cada especie (eje x_1), ordenadas en función del incremento de esta variable.

Además, se hipotetizan posibles escenarios futuros que refieren el descenso en la temperatura promedio en -2°C, así como, el aumento del promedio en 1°C del agua superficial; para ello, se establecieron tolerancia mínima a 15 °C y máxima de 29 °C en el agua de mar de sistemas costeros.

Para determinar si es posible discriminar si las clases de macroalgas crecen en diferentes condiciones fisicoquímicas y de concentración de nutrientes del agua, se llevó a cabo un análisis de clasificación, discriminante, usando la aplicación StatR del programa Rwizard. Esta técnica estadística multivariante caracteriza clases de elementos a partir de una clasificación inicial en función de los valores observados de un conjunto de variables, como en este caso de fisicoquímicos y nutrientes. Así, este asigna en qué clase debe estar cada elemento a partir de la proximidad (o similitud) y buscando la variable que hace máxima la separación entre grupos, lo que equivale a minimizar la variabilidad, usando el criterio de Bayes: cada elemento se asigna a la clase, para la que tiene mayor probabilidad de pertenecer, condicionada por los valores que toman las funciones discriminantes (Guisande *et al.*, 2016).

Las hipótesis de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas (M de Box) se utilizan para el cálculo de las probabilidades de asignación de los elementos a las distintas clases; no obstante, estas son muy sensibles a pequeñas desviaciones y, con datos reales, prácticamente siempre nos dirán que no se cumplen. Por tanto, el discriminante es razonablemente robusto, frente a un incumplimiento parcial de estas hipótesis y ese incumplimiento no es crítico, si el porcentaje de acierto en la clasificación (especialmente en la validación cruzada)

es elevado, no solamente en el conjunto de los elementos, sino también en cada uno de los grupos. No es necesario ni conveniente verificar las hipótesis, salvo que tengamos una clara evidencia de que se incumplen de forma manifiesta. Si el porcentaje de acierto es bajo, ello podría deberse al incumplimiento de las hipótesis (Guisande *et al.*, 2016).

Como referencia visual, se generó un mapa de calor que muestra con distintos colores y tonos, la intensidad de la relación entre las variables estudiadas entre filas (bióticas: especie) y columnas (abióticas: fisicoquímicos y nutrientes en el agua), clasificando de acuerdo con el valor de correlación entre las variables, uniendo en primer lugar, los dos elementos más próximos entre sí y elaborando dendrogramas marginales para las filas y otro para las columnas. Los colores indican la intensidad de la relación o los valores de la variable representada, desde el blanco (máxima relación o valor más alto), pasando por el amarillo y naranja, hasta el rojo intenso del valor mínimo (Guisande *et al.*, 2016).

RESULTADOS

En este trabajo se establecieron los intervalos de tolerancia (promedios y la desviación estándar) de las especies de macroalgas, que fueron registradas para Baja California Sur en 1995, a variables fisicoquímicos del agua de mar (Tabla 1, se incluyen las autoridades de cada taxón). Asimismo, se establecieron intervalos y valores críticos para cada Clase y para la taxocenosis de macroalgas de Baja California Sur, lo que se discute a continuación por variable abiótica estudiada.

Temperatura. Las especies de macroalgas de BCS agrupadas por Clase muestran que las Florideophyceae y Ulvophyceae se distribuyen en un intervalo más amplio (desviación estándar; entre 0 a 34 °C, Fig. 1); mientras que, las especies de Bangiophyceae (11 a 25 °C) y Phaeophyceae (8 a 26 °C) se restringen a intervalos estrechos. Sin embargo, el promedio de temperatura en la que se encuentran las algas pardas (Phaeophyceae) (15 °C) revela que estas se desarrollan en aguas más frías que otras clases. La temperatura superficial del agua de mar "óptima" (intercuartil del intervalo) para macroalgas se encuentra entre 12 y 27 °C.

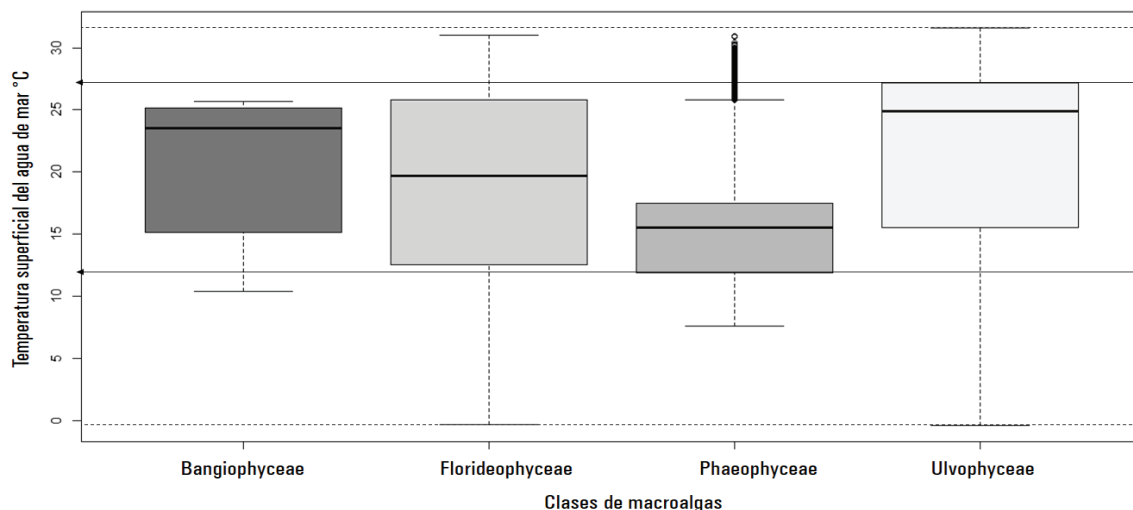


Figura 1. Intervalo de la tolerancia de las clases de macroalgas a la temperatura superficial (°C) del agua de mar — = promedio, □ = intercuartil, | = desviación estándar, ° = atípicos, ◀ = óptimos, --- = críticos.

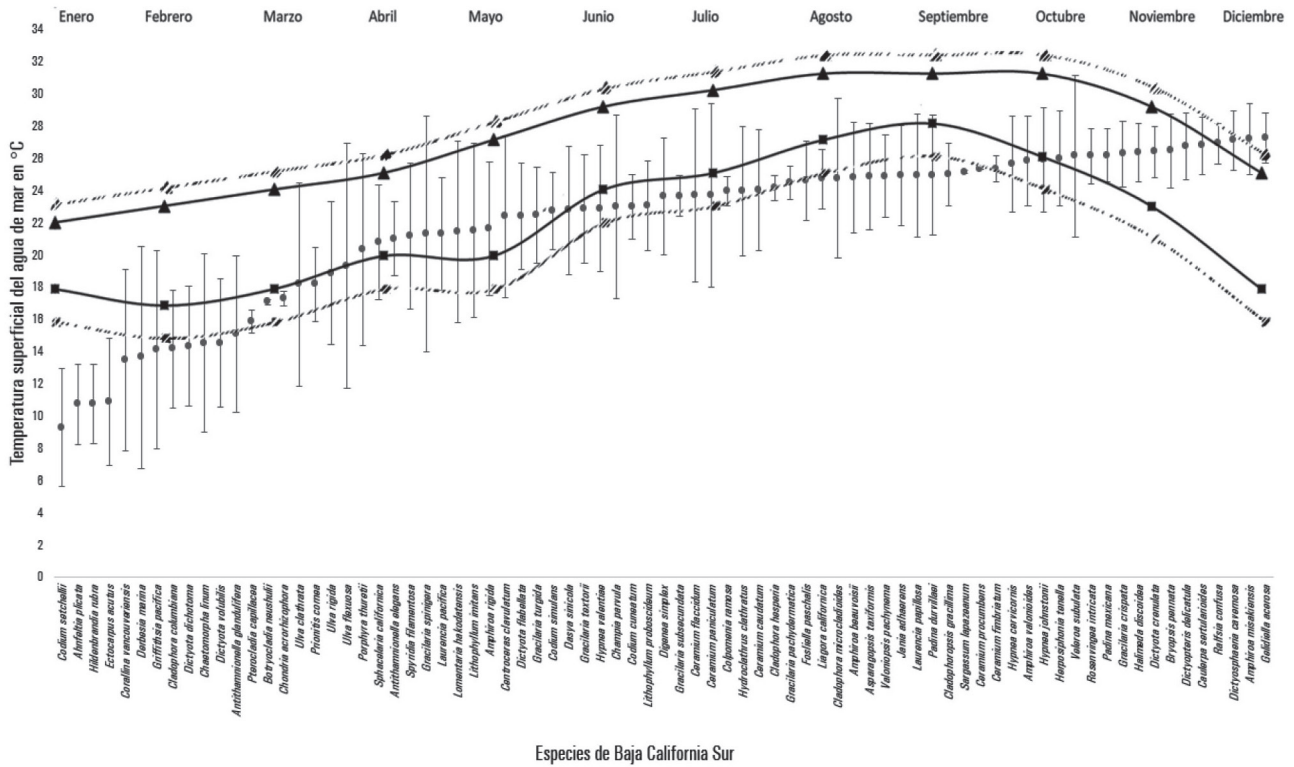


Figura 2. Intervalos de temperatura (°C) superficial en el agua de mar donde se distribuyen las especies de macroalgas ● = promedio \bar{x} = desviación estándar ▲ = valores máximos y ■ = valores mínimos mensuales de 6 años (2012 a 2017) de temperatura del agua de BCS, México. Posibles escenarios futuros ■ -2°C y/o ▲ +1°C en el promedio del agua de mar en BCS.

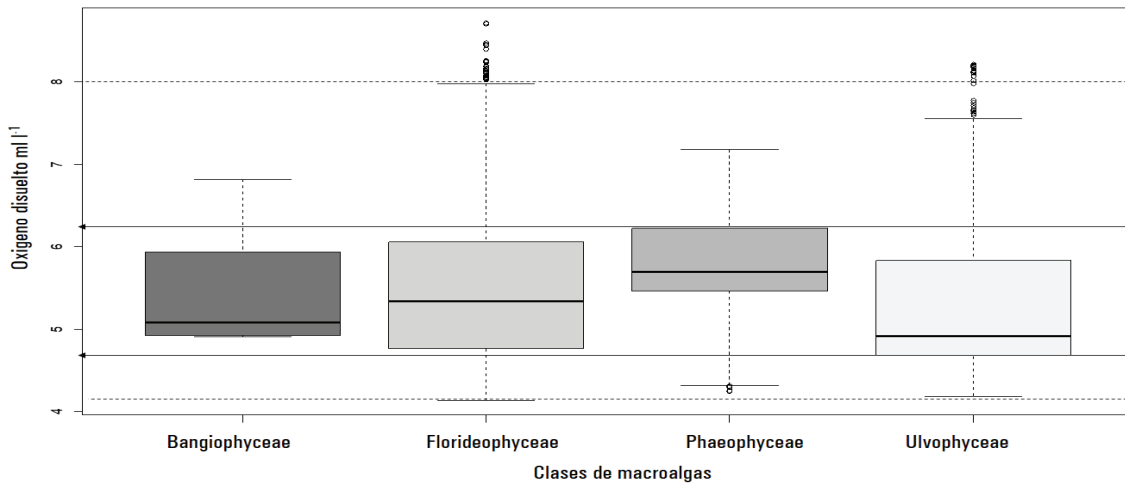


Figura 3. Intervalos de tolerancia de macroalgas a la concentración de oxígeno disuelto ($ml\ l^{-1}$) en el agua de mar — = promedio, \square = intercuartil, \bar{x} = desviación estándar, ° = valores atípicos, ◀ = concentraciones óptimas.

Oxígeno disuelto. El promedio de OD en el que habitan las Phaeophyceae ($5.6\ ml\ l^{-1}$) es significativamente mayor a las demás clases. Mientras que, Florideophyceae ($4.1\ a\ 8\ ml\ l^{-1}$) y Ulvophyceae ($4.1\ a\ 7.6\ ml\ l^{-1}$) toleran intervalos más amplios de concentración de oxígeno en el agua, Phaeophyceae ($4.2\ a\ 7.1\ ml\ l^{-1}$) y Bangiophyceae ($5\ a\ 6.9\ ml\ l^{-1}$) se distribuyen en intervalos más estrechos (desviación estándar; Fig. 3).

Las especies evaluadas prosperan en concentraciones de oxígeno mínimas de 4.6 , a máximas a $7.4\ ml\ l^{-1}$, es decir, aguas oxigenadas. Sin embargo, el óptimo o intervalo de distribución del mayor número de especies se encuentra entre los 4.8 y $6.2\ ml\ l^{-1}$, siendo el valor máximo de tolerancia para la taxocenosis el de $7.5\ ml\ l^{-1}$ (Fig. 4).

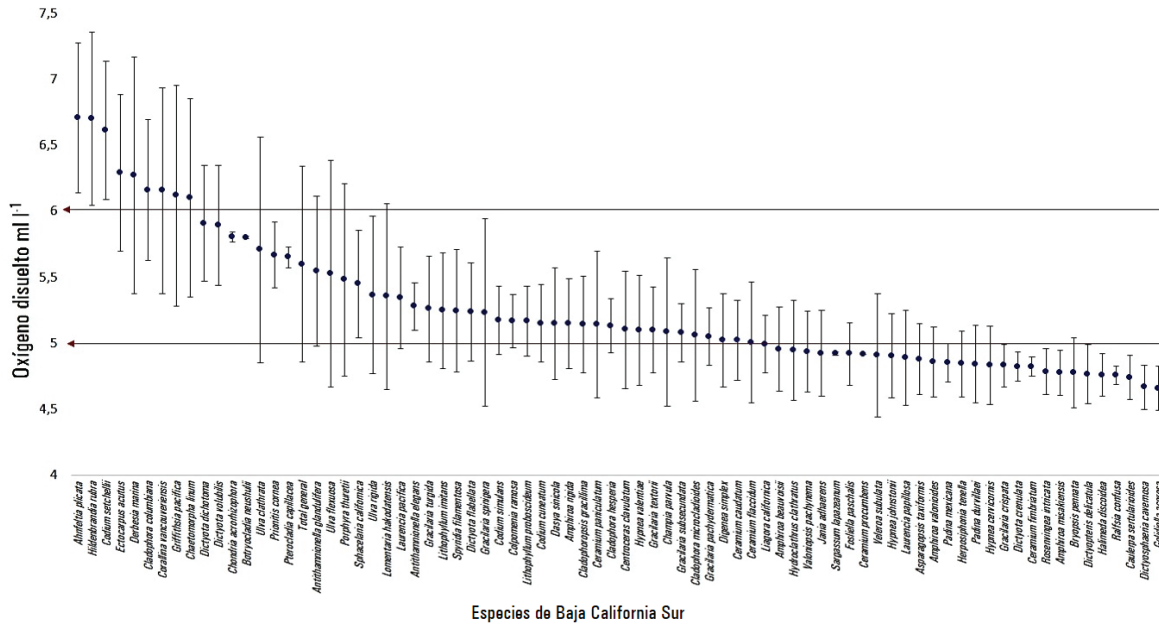


Figura 4. Intervalos de tolerancia de macroalgas a la concentración de oxígeno disuelto (ml l^{-1}) en el agua de mar ● = promedio, $\bar{\text{I}}$ = desviación estándar (2005-2012) ← = concentraciones críticas para cambios en la taxocenosis de Baja California Sur.

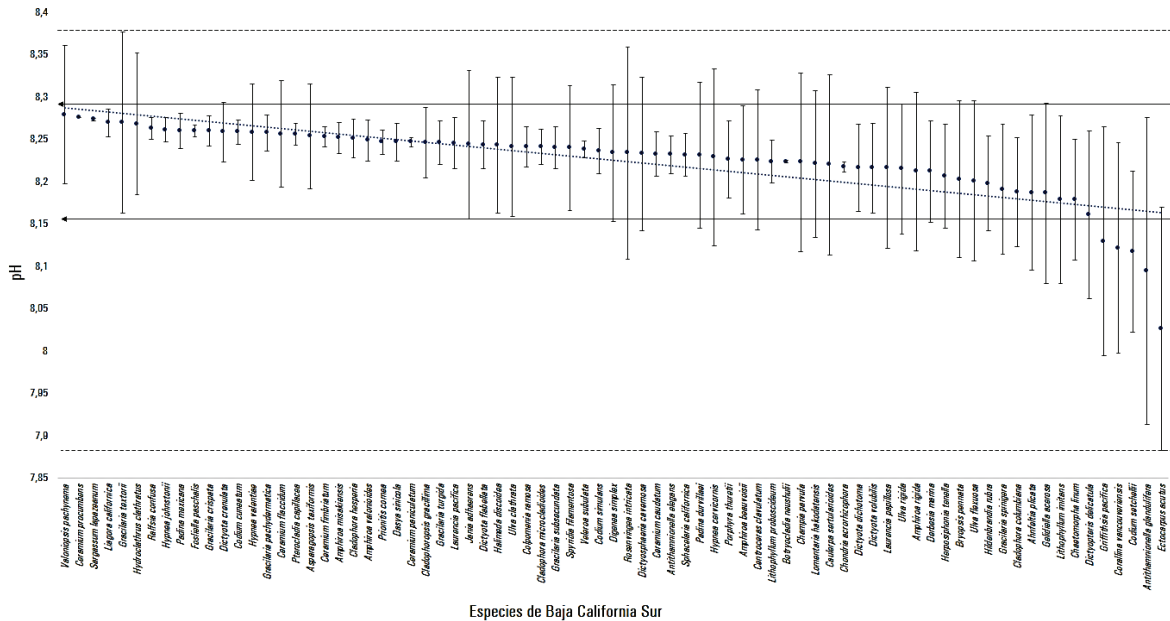


Figura 5. Intervalos de tolerancia de las especies de macroalgas al pH del agua de mar. ● = pH promedio en agua de mar, $\bar{\text{I}}$ = desviación estándar, ← = concentraciones óptimas, — = línea de tendencia, --- = concentraciones críticas para la taxocenosis de Baja California Sur.

pH. Las macroalgas estudiadas se desarrollan en aguas con valores de pH entre 7.88 y 8.37. El intervalo donde se desarrollarían el mayor número de especies es de 8.1 a 8.3 (línea de tendencia) (Fig. 5).

Materia orgánica disuelta. Las especies de macroalgas estudiadas para BCS se distribuyen en el planeta en aguas de sistemas costeros con un intervalo de concentración de 1.1 a 7.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de materia orgánica disuelta en el agua. Los valores donde se presenta el mayor número de registros se establecieron entre 2 y 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Fig. 6).

Tabla 1. Intervalos de tolerancia (promedio y desviación estándar) de las especies de macroalgas a diversas concentraciones de nutrientes y condiciones fisicoquímicas en el océano mundial.

Especies	Fisicoquímicos					Nutrientes				
	Temperatura °C	pH	OD ml l ⁻¹	Salinidad	Silicato µmol l ⁻¹	Fosfatos µmol l ⁻¹	Nitrato µmol l ⁻¹	MOD µmol l ⁻¹		
<i>Ahnfeltia plicata</i> (Hudson) Fries	10,72 ± 2,52	8,19 ± 0,09	6,71 ± 0,57	27,48 ± 7,85	5,24 ± 4,08	0,44 ± 0,21	4,09 ± 2,78	3,08 ± 1,18		
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux	24,79 ± 3,42	8,23 ± 0,06	4,95 ± 0,32	34,91 ± 0,80	3,73 ± 3,22	0,37 ± 0,27	1,42 ± 0,89	3,62 ± 1,07		
<i>Amphiroa misakiensis</i> Yendo	27,21 ± 2,18	8,25 ± 0,02	4,78 ± 0,17	34,45 ± 0,35	3,69 ± 2,76	0,42 ± 0,23	1,58 ± 0,61	3,59 ± 0,88		
<i>Amphiroa rigida</i> J.V. Lamouroux	21,61 ± 4,15	8,21 ± 0,09	5,15 ± 0,34	36,81 ± 1,24	2,15 ± 1,51	0,21 ± 0,16	1,19 ± 0,43	4,21 ± 1,31		
<i>Amphiroa valonioides</i> Yendo	25,85 ± 2,78	8,25 ± 0,02	4,86 ± 0,27	34,63 ± 0,54	4,67 ± 4,10	0,43 ± 0,33	1,62 ± 1,10	3,33 ± 1,68		
<i>Antithamnionella elegans</i> (Berthold) J.H. Price et D.M. John	21,02 ± 2,31	8,23 ± 0,02	5,28 ± 0,18	36,62 ± 1,09	5,03 ± 5,57	0,39 ± 0,44	1,88 ± 1,22	4,70 ± 0,94		
<i>Antithamnionella glandulifera</i> (Kyllin) E.M. Wollaston	15,09 ± 4,87	8,09 ± 0,18	5,55 ± 0,57	32,98 ± 3,64	17,81 ± 18,45	0,85 ± 0,77	4,13 ± 3,70	3,69 ± 0,88		
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevisan	24,88 ± 3,33	8,25 ± 0,06	4,88 ± 0,27	35,41 ± 0,88	2,38 ± 1,22	0,20 ± 0,11	0,96 ± 0,62	2,67 ± 1,54		
<i>Botryocladia neushulii</i> E.Y. Dawson	17,08 ± 0,17	8,22 ± 0,00	5,80 ± 0,01	33,51 ± 0,01	2,53 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,06 ± 0,00	3,59 ± 0,05		
<i>Bryopsis pennata</i> J.V. Lamouroux	26,48 ± 2,31	8,20 ± 0,09	4,78 ± 0,27	35,33 ± 0,85	3,07 ± 2,17	0,24 ± 0,19	1,31 ± 0,71	2,82 ± 1,52		
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G. Gmelin) M. Howe	26,79 ± 1,76	8,22 ± 0,11	4,74 ± 0,17	35,39 ± 0,88	2,82 ± 1,35	0,21 ± 0,17	0,94 ± 0,51	3,57 ± 1,44		
<i>Centroceras clavulatum</i> (C. Agardh) Montagne	22,39 ± 4,99	8,23 ± 0,08	5,10 ± 0,45	35,35 ± 0,90	2,63 ± 1,62	0,23 ± 0,18	1,56 ± 1,55	3,37 ± 1,45		
<i>Ceramium caudatum</i> Setchell et N.L. Gardner	24,04 ± 3,77	8,23 ± 0,03	5,02 ± 0,30	34,50 ± 0,64	5,08 ± 3,50	0,57 ± 0,26	1,65 ± 1,09	4,02 ± 1,29		
<i>Ceramium fimbriatum</i> Setchell et N.L. Gardner	25,36 ± 0,84	8,25 ± 0,01	4,82 ± 0,07	34,96 ± 0,23	3,09 ± 2,46	0,20 ± 0,20	1,51 ± 0,73	2,38 ± 1,33		
<i>Ceramium flaccidum</i> (Harvey ex Kützinger) Ardissonne	23,69 ± 5,39	8,26 ± 0,06	5,00 ± 0,46	35,02 ± 0,71	2,35 ± 1,40	0,23 ± 0,13	1,65 ± 1,48	2,77 ± 1,42		
<i>Ceramium paniculatum</i> Okamura	23,72 ± 5,70	8,25 ± 0,01	5,14 ± 0,55	33,94 ± 0,41	4,30 ± 2,42	0,27 ± 0,05	1,49 ± 0,09	3,50 ± 0,51		
<i>Ceramium procumbens</i> Setchell et N.L. Gardner	25,34 ± 0,00	8,28 ± 0,00	4,91 ± 0,00	34,63 ± 0,00	4,50 ± 0,00	0,53 ± 0,00	1,27 ± 0,00	3,98 ± 0,00		
<i>Chaetomorpha linum</i> (O.F. Müller) Kützinger	14,52 ± 5,55	8,18 ± 0,07	6,10 ± 0,75	32,38 ± 6,33	3,75 ± 2,97	0,38 ± 0,23	4,34 ± 3,88	4,01 ± 1,41		
<i>Champia parvula</i> (C. Agardh) Harvey	22,98 ± 5,70	8,22 ± 0,11	5,09 ± 0,56	34,83 ± 1,67	2,67 ± 1,68	0,24 ± 0,19	1,49 ± 1,43	3,06 ± 1,48		
<i>Chondria acrorhizophora</i> Setchell et N.L. Gardner	17,31 ± 0,46	8,22 ± 0,01	5,80 ± 0,04	33,50 ± 0,01	2,62 ± 0,10	0,36 ± 0,01	0,17 ± 0,11	3,34 ± 0,25		
<i>Cladophora columbiana</i> Collins	14,16 ± 3,64	8,19 ± 0,06	6,16 ± 0,53	32,83 ± 1,56	8,99 ± 8,16	0,67 ± 0,26	2,96 ± 2,11	3,25 ± 0,64		
<i>Cladophora hesperia</i> Setchell et N.L. Gardner	24,18 ± 0,78	8,25 ± 0,02	5,13 ± 0,21	35,06 ± 0,33	9,69 ± 4,15	0,88 ± 0,26	2,73 ± 1,08	4,15 ± 0,70		
<i>Cladophora microcladioides</i> Collins	24,76 ± 4,94	8,24 ± 0,02	5,06 ± 0,50	34,38 ± 0,59	4,87 ± 3,77	0,52 ± 0,29	1,90 ± 1,10	3,55 ± 0,87		
<i>Cladophoropsis gracillima</i> E.Y. Dawson	25,01 ± 1,93	8,25 ± 0,04	5,14 ± 0,37	35,15 ± 0,47	9,17 ± 5,46	0,75 ± 0,44	2,36 ± 1,46	2,24 ± 1,18		
<i>Codium cuneatum</i> Setchell et N.L. Gardner	23,01 ± 2,01	8,26 ± 0,01	5,15 ± 0,30	34,48 ± 0,53	5,68 ± 3,05	0,62 ± 0,22	1,60 ± 1,04	4,31 ± 1,22		
<i>Codium setchellii</i> N.L. Gardner	9,28 ± 3,67	8,12 ± 0,10	6,62 ± 0,52	31,90 ± 1,30	20,36 ± 9,56	1,17 ± 0,42	7,52 ± 3,54	2,67 ± 0,83		
<i>Codium simulans</i> Setchell et N.L. Gardner	22,74 ± 2,42	8,24 ± 0,03	5,17 ± 0,26	34,72 ± 0,63	8,34 ± 4,86	0,79 ± 0,32	2,29 ± 1,51	3,71 ± 0,79		
<i>Colpomenia ramosa</i> W.R. Taylor	23,94 ± 0,91	8,24 ± 0,02	5,17 ± 0,20	35,12 ± 0,26	11,12 ± 3,89	0,97 ± 0,25	3,10 ± 1,07	4,27 ± 0,92		

Continúa tabla 1.

Especies	Fisicoquímicos					Nutrientes				
	Temperatura °C	pH	OD ml l ⁻¹	Salinidad	Silicato µmol l ⁻¹	Fosfatos µmol l ⁻¹	Nitrato µmol l ⁻¹	MOD µmol l ⁻¹		
<i>Corallina vancouveriensis</i> Yendo	13,46 ± 5,63	8,12 ± 0,12	6,16 ± 0,78	31,74 ± 2,66	16,82 ± 12,12	0,95 ± 0,51	4,73 ± 3,15	3,27 ± 1,12		
<i>Dasya sinicola</i> (Setchell et N.L. Gardner) E.Y. Dawson	22,77 ± 3,98	8,25 ± 0,02	5,15 ± 0,42	34,36 ± 0,65	4,93 ± 3,18	0,54 ± 0,24	1,35 ± 1,11	4,00 ± 1,23		
<i>Derbesia marina</i> (Lyngbye) Solier	13,65 ± 6,89	8,21 ± 0,06	6,27 ± 0,90	32,87 ± 3,72	4,23 ± 4,55	0,43 ± 0,25	4,00 ± 3,20	3,21 ± 1,08		
<i>Dictyopteris delicatula</i> J.V. Lamouroux	26,75 ± 2,05	8,16 ± 0,10	4,76 ± 0,22	35,79 ± 0,99	2,75 ± 1,10	0,19 ± 0,10	1,17 ± 1,09	4,06 ± 1,54		
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i> (Forsskål) Børgesen	27,11 ± 1,83	8,23 ± 0,09	4,67 ± 0,17	35,15 ± 0,80	2,66 ± 0,93	0,15 ± 0,08	0,90 ± 0,61	2,84 ± 1,66		
<i>Dictyota crenulata</i> J. Agardh	26,40 ± 1,60	8,26 ± 0,03	4,82 ± 0,11	34,68 ± 0,57	3,62 ± 1,74	0,40 ± 0,19	1,23 ± 0,45	4,04 ± 0,80		
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	14,35 ± 3,75	8,22 ± 0,05	5,91 ± 0,44	35,20 ± 1,00	2,36 ± 1,41	0,31 ± 0,18	3,72 ± 3,02	3,90 ± 1,04		
<i>Dictyota flabellata</i> (Collins) Setchell et N.L. Gardner	22,42 ± 3,29	8,24 ± 0,03	5,24 ± 0,37	34,51 ± 0,69	6,43 ± 4,25	0,65 ± 0,28	1,70 ± 1,31	3,83 ± 0,86		
<i>Digenea simplex</i> (Wulfen) C. Agardh	23,62 ± 3,62	8,23 ± 0,08	5,02 ± 0,35	36,43 ± 1,11	2,37 ± 1,64	0,19 ± 0,16	0,89 ± 0,42	4,52 ± 1,30		
<i>Ectocarpus acutus</i> Setchell et N.L. Gardner	10,87 ± 3,94	8,03 ± 0,14	6,29 ± 0,59	30,51 ± 1,76	18,73 ± 13,46	1,01 ± 0,54	4,84 ± 2,99	3,81 ± 1,30		
<i>Fosliella paschalis</i> (Me. Lemoine) Setchell et N.L. Gardner	24,61 ± 2,48	8,26 ± 0,01	4,92 ± 0,24	34,81 ± 0,47	6,36 ± 2,07	0,69 ± 0,18	2,00 ± 0,70	4,85 ± 1,21		
<i>Gelidliella acerosa</i> (Forsskål) Feldmann et Hamel	27,28 ± 1,57	8,19 ± 0,11	4,66 ± 0,17	35,69 ± 1,09	2,97 ± 1,06	0,18 ± 0,11	0,89 ± 0,43	3,89 ± 2,00		
<i>Gracilaria crispata</i> Setchell et N.L. Gardner	26,26 ± 2,02	8,26 ± 0,02	4,83 ± 0,16	34,58 ± 0,43	4,95 ± 3,04	0,54 ± 0,23	1,71 ± 0,75	4,45 ± 1,29		
<i>Gracilaria pachydermatica</i> Setchell et N.L. Gardner	24,48 ± 1,02	8,26 ± 0,02	5,05 ± 0,22	34,88 ± 0,35	7,87 ± 4,26	0,75 ± 0,27	2,20 ± 1,10	4,10 ± 0,87		
<i>Gracilaria spinigera</i> E.Y. Dawson	21,29 ± 7,32	8,19 ± 0,08	5,23 ± 0,71	34,04 ± 1,31	4,79 ± 2,21	0,54 ± 0,31	3,00 ± 3,34	3,45 ± 1,05		
<i>Gracilaria subsecundata</i> Setchell et N.L. Gardner	23,67 ± 1,28	8,24 ± 0,02	5,08 ± 0,22	34,92 ± 0,53	9,55 ± 4,58	0,85 ± 0,27	2,67 ± 1,23	4,96 ± 0,95		
<i>Gracilaria textorii</i> (Suringar) Hariot	22,85 ± 3,36	8,27 ± 0,11	5,10 ± 0,32	34,64 ± 0,97	6,19 ± 3,31	0,44 ± 0,31	1,45 ± 1,35	3,88 ± 1,14		
<i>Gracilaria turgida</i> E.Y. Dawson	22,47 ± 2,97	8,25 ± 0,03	5,26 ± 0,40	34,40 ± 0,65	5,90 ± 4,27	0,60 ± 0,28	1,45 ± 1,37	3,84 ± 0,83		
<i>Griffithsia pacifica</i> Kylin	14,12 ± 6,13	8,13 ± 0,13	6,12 ± 0,83	31,59 ± 2,34	19,82 ± 10,68	1,06 ± 0,49	4,74 ± 2,35	3,30 ± 1,19		
<i>Halimeda discoidea</i> Decaisne	26,35 ± 1,80	8,24 ± 0,08	4,76 ± 0,16	35,28 ± 0,72	2,62 ± 1,35	0,21 ± 0,15	0,97 ± 0,60	2,58 ± 1,28		
<i>Laurencia pacifica</i> Kylin	21,33 ± 3,50	8,25 ± 0,03	5,34 ± 0,39	34,11 ± 0,54	3,83 ± 1,20	0,48 ± 0,10	0,89 ± 0,56	3,66 ± 0,66		
<i>Laurencia papillosa</i> (C.Agardh) Bertoloni	24,96 ± 3,82	8,22 ± 0,10	4,89 ± 0,36	36,03 ± 1,38	2,64 ± 1,40	0,16 ± 0,12	0,88 ± 0,55	4,19 ± 1,69		
<i>Liagora californica</i> Zeh	24,72 ± 1,82	8,27 ± 0,02	4,99 ± 0,22	34,62 ± 0,33	4,86 ± 0,86	0,57 ± 0,08	1,37 ± 0,35	3,68 ± 0,51		
<i>Lithophyllum imitans</i> Foslie	21,53 ± 5,44	8,18 ± 0,10	5,25 ± 0,44	34,41 ± 1,59	15,14 ± 8,30	1,08 ± 0,38	4,03 ± 1,80	4,64 ± 1,16		
<i>Lithophyllum proboscideum</i> (Foslie) Foslie	23,09 ± 2,79	8,22 ± 0,03	5,17 ± 0,26	34,90 ± 0,65	10,86 ± 5,32	0,90 ± 0,33	2,87 ± 1,62	4,38 ± 1,51		
<i>Lomentaria hakodatensis</i> Yendo	21,44 ± 5,65	8,22 ± 0,09	5,35 ± 0,71	33,53 ± 2,28	6,93 ± 8,93	0,33 ± 0,28	1,97 ± 1,68	3,12 ± 1,50		
<i>Padina durvillaei</i> Bory	24,96 ± 3,75	8,23 ± 0,09	4,84 ± 0,30	35,58 ± 0,99	2,55 ± 1,69	0,18 ± 0,16	1,03 ± 0,72	3,20 ± 1,57		
<i>Padina mexicana</i> E.Y. Dawson	26,19 ± 1,67	8,26 ± 0,02	4,85 ± 0,14	34,65 ± 0,40	5,56 ± 3,73	0,58 ± 0,26	1,80 ± 0,90	4,01 ± 0,92		
<i>Porphyra thuretii</i> Setchell et E.Y. Dawson	20,35 ± 5,93	8,23 ± 0,05	5,48 ± 0,73	33,87 ± 1,56	9,17 ± 6,24	0,72 ± 0,24	2,38 ± 1,31	3,71 ± 0,69		

Continúa tabla 1.

Especies	Fisicoquímicos					Nutrientes				
	Temperatura °C	pH	OD ml l ⁻¹	Salinidad	Silicato µmol l ⁻¹	Fosfatos µmol l ⁻¹	Nitrato µmol l ⁻¹	MOD µmol l ⁻¹		
<i>Prionitis cornea</i> (Okamura) E.Y.Dawson	18,19 ± 2,30	8,25 ± 0,01	5,67 ± 0,25	33,60 ± 0,39	6,35 ± 1,52	0,30 ± 0,10	1,35 ± 0,43	3,84 ± 0,77		
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Bornet in Bornet & Thuret	15,89 ± 0,72	8,26 ± 0,01	5,65 ± 0,08	35,57 ± 0,12	0,97 ± 0,35	0,17 ± 0,05	0,76 ± 0,52	3,80 ± 0,77		
<i>Ralfsia confusa</i> Hollenberg	26,92 ± 1,29	8,26 ± 0,01	4,76 ± 0,07	34,47 ± 0,40	4,14 ± 2,25	0,48 ± 0,20	1,55 ± 0,57	4,14 ± 1,03		
<i>Rosenvingea intricata</i> (J.Agardh) Børgesen	26,14 ± 1,71	8,23 ± 0,13	4,78 ± 0,17	35,39 ± 0,67	2,75 ± 1,80	0,20 ± 0,20	0,92 ± 0,60	3,95 ± 1,73		
<i>Sargassum lapazeanum</i> Setchell et N.L. Gardner	25,15 ± 0,09	8,27 ± 0,00	4,92 ± 0,01	34,63 ± 0,07	4,83 ± 0,33	0,56 ± 0,03	1,39 ± 0,11	3,97 ± 0,41		
<i>Sphaelaria californica</i> Setchell. et N.L. Gardner, N.L.	20,76 ± 3,57	8,23 ± 0,03	5,45 ± 0,41	34,06 ± 0,66	5,01 ± 4,21	0,53 ± 0,27	1,14 ± 1,31	3,76 ± 0,98		
<i>Spyridia filamentosa</i> (Wulfen) Harvey	21,19 ± 4,55	8,24 ± 0,07	5,25 ± 0,47	35,65 ± 1,44	2,48 ± 1,94	0,24 ± 0,20	1,52 ± 1,91	3,99 ± 1,51		
<i>Ulva clathrata</i> (Roth) C. Agardh	18,17 ± 6,32	8,24 ± 0,08	5,71 ± 0,86	32,89 ± 5,35	4,43 ± 5,28	0,36 ± 0,28	2,22 ± 2,54	3,31 ± 1,49		
<i>Ulva flexuosa</i> Wulfen	19,33 ± 7,61	8,20 ± 0,09	5,53 ± 0,86	33,61 ± 4,57	3,43 ± 2,89	0,32 ± 0,19	3,14 ± 3,31	3,36 ± 1,49		
<i>Ulva rigida</i> C. Agardh	18,86 ± 4,45	8,21 ± 0,08	5,36 ± 0,60	35,79 ± 1,46	3,35 ± 3,66	0,39 ± 0,41	2,50 ± 2,89	3,65 ± 1,15		
<i>Valoniopsis pachynema</i> (G. Martens) Børgesen	24,90 ± 2,55	8,28 ± 0,08	4,94 ± 0,31	35,19 ± 0,52	5,19 ± 4,10	0,40 ± 0,37	1,29 ± 1,28	3,45 ± 1,54		
<i>Veleroa subulata</i> E.Y. Dawson	26,14 ± 5,03	8,24 ± 0,01	4,91 ± 0,47	34,06 ± 0,32	2,16 ± 0,14	0,29 ± 0,05	1,14 ± 0,62	3,24 ± 0,37		

Nitratos. Las macroalgas se desarrollan en intervalos de concentraciones de 0 a 13 µmol l⁻¹ de nitrato en la columna de agua con óptimos entre 0.5 y 5.2 µmol l⁻¹; las Phaeophyceae se presentan a mayor concentración promedio de este nutriente y mayor tolerancia con amplitudes de 13 µmol l⁻¹; no obstante, Florideophyceae y Ulvophyceae, aunque presentan valores atípicos en concentraciones mayores a 20 µmol l⁻¹, el mayor número de datos se distribuye en un estrecho intervalo con máximos de desviación estándar de 4 y 5 µmol l⁻¹ respectivamente (Fig. 7).

Una concentración superior a 3 µmol l⁻¹ de NO₃ es crítica para la mayor parte de las especies, sin embargo, será óptima para, por lo menos, 18 de ellas. Por el contrario, el aumento a promedios de 5 µmol l⁻¹ de NO₃ constituye un valor crítico para todas las especies de macroalgas registradas para Baja California Sur (Fig. 8).

Fosfatos. Las macroalgas estudiadas se presentan en concentraciones de 0 a 1.8 µmol l⁻¹ PO₄ disueltos en la columna de agua; 0.4 y 0.9 µmol l⁻¹ muestran ser valores críticos para la taxocenosis de Baja California Sur. Pocas especies muestran intervalos amplios de distribución a pesar de las bajas concentraciones de este compuesto en el agua. Ninguna especie se distribuye en promedios superiores a 1.8 µmol l⁻¹ PO₄ (Fig. 9).

Silicatos. Las macroalgas se distribuyen dentro de intervalos de concentración de silicatos de 0.1 a 35 µmol l⁻¹ en la columna de agua. La mayor parte de las especies se desarrollan en concentraciones menores a 10 µmol l⁻¹. Muy pocas especies de los litorales de BCS se presentan en concentraciones de silicato promedio mayores a 20 µmol l⁻¹ (Fig. 10).

Salinidad. Todas las especies de macroalgas estudiadas son esencialmente marinas y se desarrollan en concentraciones promedio entre 32 y 36.5 (línea de tendencia; Fig. 11); el límite superior es 38.5 y a partir de este valor no se registra ninguna especie evaluada y el límite inferior será de 19.

En la figura 11 se plantea un escenario en donde se muestran los valores mínimo y máximo para bahía de La Paz, BCS y los cambios en la salinidad por intrusión de Agua del Golfo de California (AGC) y Agua Superficial Ecuatorial (ASE) (Obeso-Nieblas *et al.*, 2007); además, se plantea el escenario hipotético donde se suma la diferencia entre las dos masas de agua, como límite superior e inferior (±0.43) donde se observa cambios taxocenóticos relacionados con la intrusión de las dos masas de agua a partir de 35.5.

Especies tolerantes. Las especies tolerantes presentaron los intervalos de mayor amplitud para cada variable (Tabla 2). En el caso de la temperatura, se encontraron especies que toleran cambios mayores a 5°C en el promedio del agua superficial del mar. Por otra parte, otras especies toleran cambios hasta de 1.5 µmol l⁻¹ en las concentraciones de materia orgánica disuelta y mayores de 0.1 de pH. Las especies más tolerantes al nitrato presentaron intervalos mayores a 3 µmol l⁻¹ y hasta 3.8 µmol l⁻¹ en el promedio de la concentración en el agua de mar, así como, de mayores a 0.4 µmol l⁻¹ en fosfato; mientras que, para silicato los intervalos fueron mayores a 10 µmol l⁻¹.

Especies sensibles. Las especies sensibles son las que se distribuyen en intervalos estrechos de tolerancia de cada variable. Algunas especies se distribuyen en intervalos de amplitud menores a 1°C de temperatura superficial de agua de mar (Tabla 3), 0.5 µmol l⁻¹ de concentración de materia orgánica disuelta, así como la variación menor a 0.5 µmol l⁻¹ de nitrato, 0.1 µmol l⁻¹ de fosfato y/o 1 µmol l⁻¹ de silicato.

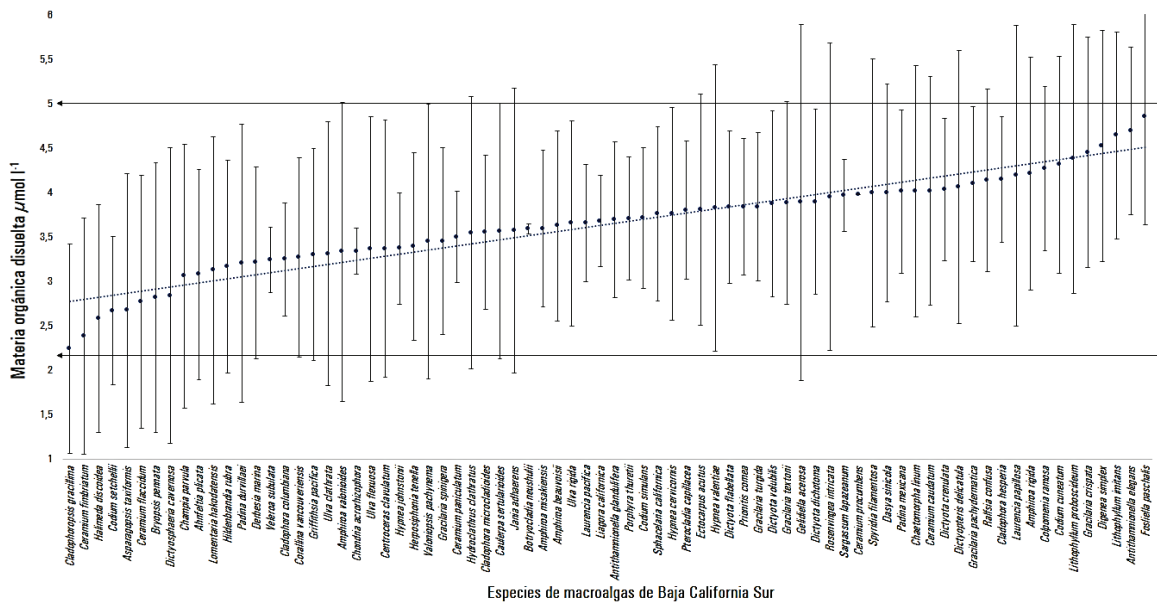


Figura 6. Intervalos de tolerancia de macroalgas a la concentración de materia orgánica disuelta ($\mu\text{mol l}^{-1}$ MOD) en agua de mar ● = promedio, I = desviación estándar, = línea de tendencia, ← = concentraciones óptimas.

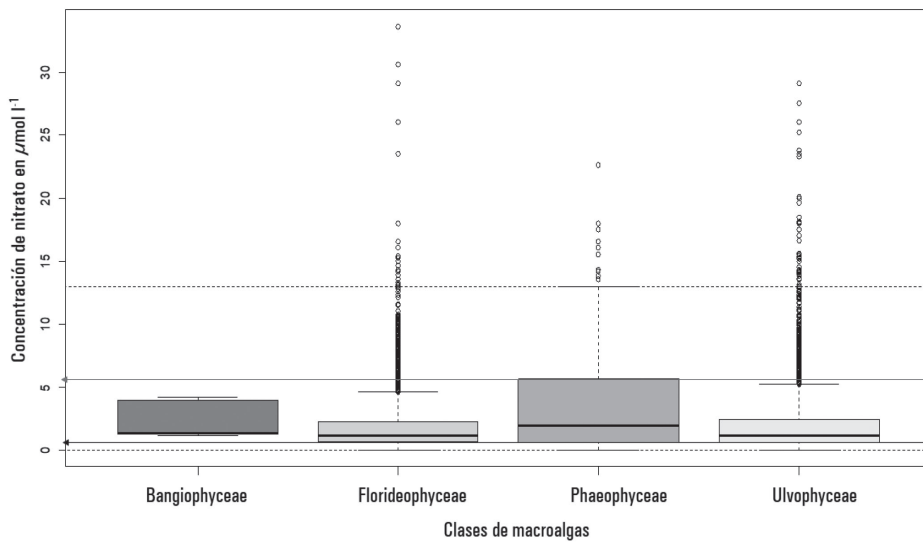


Figura 7. Diagrama de caja del intervalo de tolerancia de la concentración de nitrato ($\text{NO}_3 \text{ mol l}^{-1}$), — = promedio del agua de mar, □ = intercuartil, I = desviación estándar, ° = residuos, ← = óptimos, --- = críticos para supervivencia de macroalgas de B.C.S., México, agrupadas por Clase.

Variables fisicoquímicas y nutrientes que más afectan la taxocenosis. El análisis discriminante (Fig. 12) muestra que el canónico 1, clasificó con el 91.9% de confianza las clases de macroalgas, según las concentraciones de compuestos químicos en el agua de mar donde se han registrado. Se determinó que las Ulvophyceae y las algas rojas (Florideophyceae) se distribuyen en intervalos amplios de concentración de oxígeno, nitrato y silicato, mientras que, las Phaeophyceae se restringen en intervalos estrechos y toleran menor concentración de silicatos en el agua (7.78 % de la varianza) y requieren mayores concentraciones de nitrato en la columna de agua y oxígeno disuelto.

DISCUSIÓN

El desarrollo de un modelo de distribución de especies implica múltiples ajustes; por ejemplo, tener en cuenta las sinonimias. Ello debido a la determinación taxonómica inicial y los cambios de nomenclatura de las especies, así como, por el uso de sinonimias válidas en la base general ITIS durante el proceso de obtención de las ocurrencias de las especies en el planeta; estas han sido actualizadas en otras bases especializadas, como ALGABASE y el world register of marine species (WORMS).

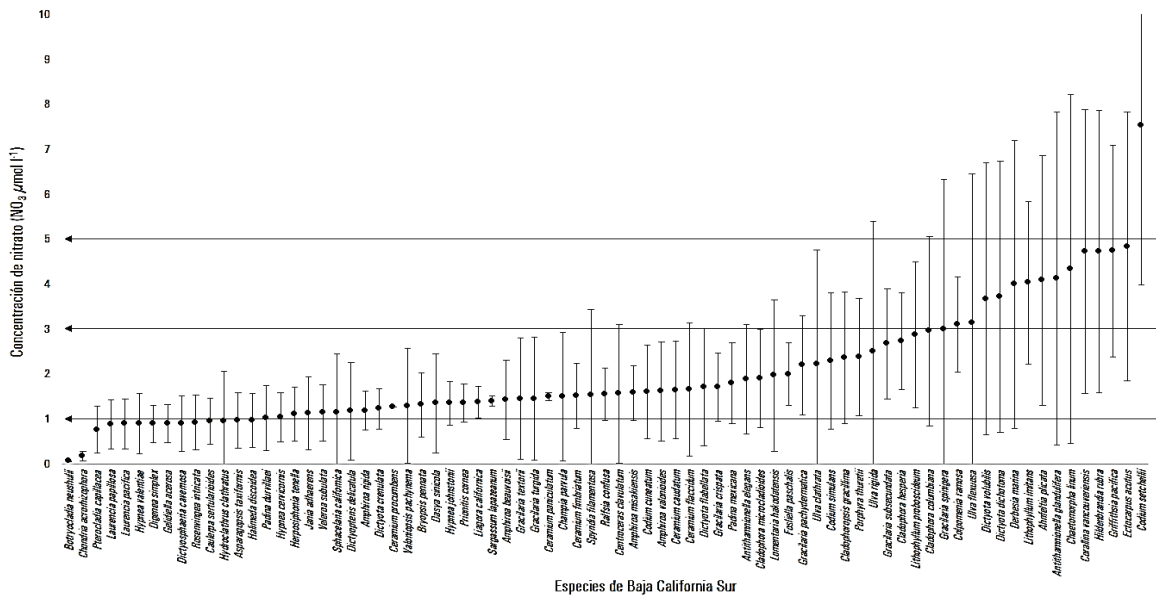


Figura 8. Intervalos de tolerancia de cada especie a concentraciones de nitrato ($\text{NO}_3 \mu\text{mol l}^{-1}$) en agua de mar. ● = promedio y \pm = desviación estándar, \leftarrow = concentraciones críticas para cambios en la taxocenosis de B.C.S.

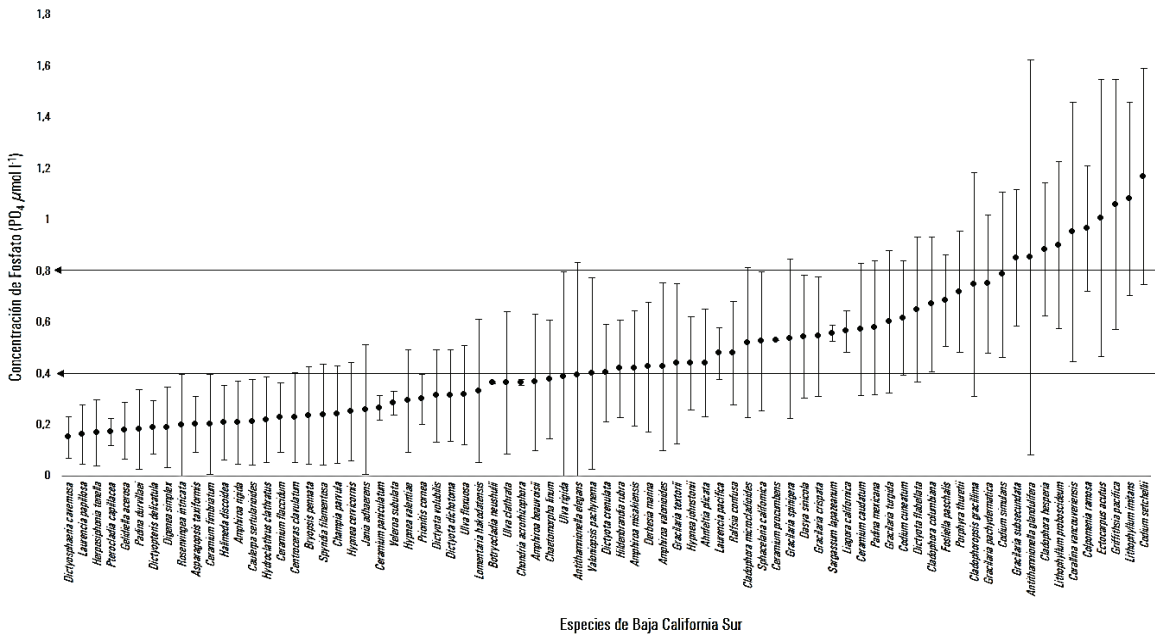


Figura 9. Intervalos de tolerancia de las macroalgas a la concentración de fosfatos ($\text{PO}_4 \mu\text{mol l}^{-1}$) en agua de mar. ● = promedio y \pm = desviación estándar, \leftarrow = concentraciones óptimas para las especies de macroalgas de B.C.S.

De la lista taxonómica lograda se presentan varios casos, v.g., *Antithamnionella glandulifera* que cambió en 1989 a *Antithamnionella spirographidis* (Schiffner) E.M.Wollaston. *Ceramium fimbriatum* del que se hizo una revisión del género en 2008 y cambió a *Gayliella fimbriata*, así como, *C. flaccidum* sinonimia de *Gayliella flaccida* (T.O.Cho & L.J.McIvor, 2008). *Laurencia papillosa*, que pasa a ser *Palisada perforata* (Bory) K.W.Nam en el 2007. *Porphyra thuretii*, donde la especie es la mis-

ma, pero cambió de género a *Pyropia thuretii* en 2011. Mientras que, *Prionitis cornea* pasó a ser *Grateloupia cornea* en 2001. Y, por último, *Pterocladia capillacea* cambió a *Pterocladia capillacea* (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand. El uso de la información de registros para las sinonimias obtenidas por el programa confiere robustez a la base de datos obtenida.

Las variaciones observadas en la taxocenosis de macroalgas se asocian principalmente a la variación en la temperatura superficial del agua de mar, que determina la distribución espacial y el cambio temporal de los taxa. Esto produce cambios a nivel de atributos comunitarios de las macroalgas, por ejemplo, en la riqueza y composición de especies encontradas por mes (Siqueiros-Beltrones, 1998); mientras que, la diferencia de temperatura en el agua de mar superficial entre invierno (febrero) y verano (septiembre) para 1995 en la bahía de La Paz fue de 16 grados centígrados; actualmente encontramos esa diferencia en 11°C (Fig. 2). La tolerancia de las especies estudiadas aquí, se determinó entre 9 y 26 °C de temperatura superficial del agua de mar, un intervalo de 15°C. Así, son tolerantes a temperaturas más bajas, que los promedios actuales en aguas de BCS, lo que sugiere que estas especies podrían distribuirse actualmente en aguas más frías.

Por tanto, esto explica que la taxocenosis en BCS pudo cambiar e incluiría especies introducidas, que han arribado a costas sudcalifornianas

en los últimos años (Riosmena *et al.*, 2014). Las especies de macroalgas agrupadas en las clases Bangiophyceae y Ulvophyceae tendrían mayor tolerancia ante un escenario de aumento de temperatura, mientras que, promedios de temperatura en el agua de mar entre 10 y 16 °C favorecerían el crecimiento de macroalgas pardas (Phaeophyceae); temperaturas menores a los 10 °C originarían nuevas taxocenosis, dado que la mayor parte de las especies que fueron analizadas, no presentan intervalos en estos promedios de temperatura, en su distribución a nivel mundial. En un escenario de cambio, el aumento del promedio de la temperatura máxima en 1 °C en BCS tendría un mayor efecto en la composición de las especies de la comunidad de macroalgas (Fig. 2), debido a que pocas especies presentan amplitudes que superen los máximos actuales; mientras que, si disminuyera la temperatura en un promedio de 2 °C, un mayor número de especies de esta taxocenosis sobreviviría, debido a las condiciones iniciales del sistema.

Tabla 2. Especies más tolerantes por variable fisicoquímica en el agua de mar

Especies tolerantes	Temperatura > 5 °C	MOD >1.5 µmol l ⁻¹	pH >0.1	Nitrato >3 µmol l ⁻¹	Fosfato >0.4 µmol l ⁻¹	Silicato >10 µmol l ⁻¹
<i>Corallina vancouveriensis</i>	X		X	X	X	X
<i>Griffithsia pacifica</i>	X		X		X	X
<i>Derbesia marina</i>	X			X		
<i>Gracilaria spinigera</i>	X			X		
<i>Ulva flexuosa</i>	X			X		
<i>Veleroa subulata</i>	X					
<i>Ceramium flaccidum</i>	X					
<i>Lithophyllum imitans</i>	X					
<i>Chaetomorpha linum</i>	X					
<i>Ceramium paniculatum</i>	X					
<i>Champia parvula</i>	X					
<i>Porphyra thuretii</i>	X					
<i>Ulva clathrata</i>	X					
<i>Rosenvingea intricata</i>		X	X			
<i>Gelidiella acerosa</i>		X				
<i>Laurencia papillosa</i>		X				
<i>Amphiroa valonioides</i>		X				
<i>Hypnea valentiae</i>		X				
<i>Jania adhaerens</i>		X				
<i>Padina durvillaei</i>		X				
<i>Valoniopsis pachynema</i>		X				
<i>Asparagopsis taxiformis</i>		X				
<i>Dictyopteria delicatula</i>		X				
<i>Hydroclathrus clathratus</i>		X				
<i>Bryopsis pennata</i>		X				
<i>Lithophyllum proboscideum</i>		X				
<i>Spyridia filamentosa</i>		X				
<i>Ectocarpus acutus</i>			X		X	X
<i>Antithamnionella spirographidis</i>			X	X	X	X
<i>Codium setchellii</i>			X	X		
<i>Dictyota dichotoma</i>				X		
<i>Hildenbrandia rubra</i>				X		
<i>Chaetomorpha linum</i>				X		
<i>Antithamnionella elegans</i>					X	

Cambios globales de temperatura, también implicarían cambios en los promedios decadales en las concentraciones de oxígeno y a su vez a diferentes niveles taxonómicos de las macroalgas. Por ejemplo, la disminución a concentraciones promedio menores a 4.2 ml l⁻¹ de oxígeno, promovería la variación en la composición de las especies registradas para Baja California Sur. El oxígeno disuelto (OD) en agua de mar fue la variable con mayor aporte a la diferenciación de los ambientes, donde se desarrollan las clases de macroalgas. Cruz-Ayala (1996) encontró en la bahía de La Paz (BCS) mayor riqueza en áreas con corrientes y atribuyó esto a la mayor concentración de oxígeno en el agua.

Se ha observado, que la disminución en la velocidad de la circulación de las masas de agua con bajas concentraciones de OD, los cambios en los patrones del viento, el aumento en la estratificación y la baja concentración inicial de OD en aguas superficiales de temperatura alta (el oxígeno preformado), pueden ser los responsables de los eventos de hipoxia en el mar abierto; es así como, la concentración de oxígeno disuelto en el agua del Pacífico mexicano varía entre lo hipóxico (<1 ml l⁻¹) en aguas profundas hasta la sobresaturación (>10 ml l⁻¹) (Rubach *et al.*, 2017). Adicionalmente, en los sistemas costeros la materia orgánica que ingresa por cualquier vía consume oxígeno durante su descomposición y favorece la anoxia (De La Lanza-Espino *et al.*, 2011; De La Lanza-Espino & Gutiérrez-Mendieta, 2017).

La pérdida de especies de macroalgas en un hábitat presume disminuciones en el promedio de las concentraciones de oxígeno en la columna de agua (Fig. 4). En BCS, en donde probablemente la disminución o el aumento de 1 ml l⁻¹ en la concentración promedio de oxígeno en el agua propiciaría diferentes taxocenosis, debido que aquí se encontró, que ninguna especie presenta intervalos de tolerancia mayores a 2 ml l⁻¹. Concentraciones promedio mayores a 5.3 ml l⁻¹ de OD propiciará, al menos para un tercio de las especies, salir de concentraciones

óptimas; otro punto crítico sería el aumento a promedios mayores a 5.8 ml l⁻¹ a las que probablemente sobreviva apenas un tercio de la composición actual; las mismas que muestran intervalos de tolerancia a mayores concentraciones de oxígeno en la columna de agua.

Se conoce que el OD está estrechamente relacionado con el pH del agua de mar, es decir, procesos como la respiración generan la liberación de CO₂, lo que disminuye el pH. Por tanto, aguas hipóxicas son también aguas de menor pH. Por ejemplo, aguas de bajo pH sobre la plataforma continental se presentan desde Canadá hasta las costas de Baja California en México (Feely *et al.*, 2008); si las corrientes de California se hicieran más severas por disminución en la temperatura del océano, probablemente el fenómeno descrito anteriormente alcanzaría las costas de Baja California Sur, presentándose aguas anóxicas o hipóxicas en áreas de surgencias.

Las macroalgas rojas (Florideophyceae y Bangiophyceae) se han registrado en ambientes más básicos (mayor pH) que Ulvophyceae y Phaeophyceae; es así como, se encontró que las características fisicoquímicas y de concentración de los nutrientes de los ambientes donde se desarrollan algas pardas (Phaeophyceae), algas rojas (Florideophyceae y Bangiophyceae) y algas verdes (Ulvophyceae) son diferentes.

Las Ulvophyceae presentan mayor tolerancia al cambio en el pH en el agua (desviación estándar; Fig. 5), este grupo es el más tolerante ante un escenario de cambio en conjunto con bajas concentraciones de oxígeno disuelto, como lo sugieren Rubach *et al.* (2017). El límite superior de pH para la supervivencia de las macroalgas (8.37) puede deberse a la acumulación de la materia orgánica; por ejemplo, en el sedimento de las lagunas costeras, dado que los nutrientes procedentes de la columna de agua ya remineralizados (fracción reciclada) y de aportes fluviales (fracción nueva) sin descomponerse, se convierten

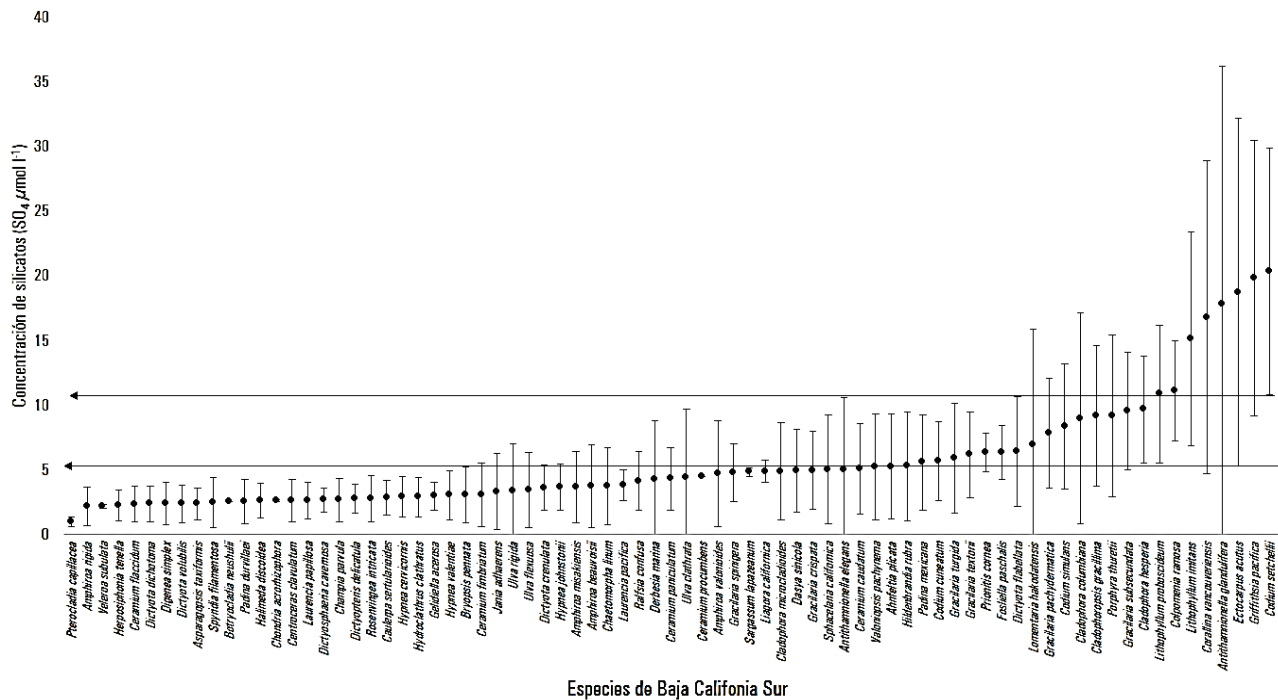


Figura 10. Intervalo de tolerancia de macroalgas a la concentración de silicatos (SO₄ μmol l⁻¹) en agua de mar, ● = promedio y I = desviación estándar, ← = concentraciones óptimas para las especies de macroalgas de B.C.S

en una fuente potencialmente tóxica, porque el amonio se transforma en amoníaco (gas) en condiciones alcalinas por arriba de pH 8 (De La Lanza-Espino & Gutiérrez-Mendieta, 2017).

La materia orgánica disuelta contiene formas de nitrógeno y fósforo orgánicos, las cuales al descomponerse o remineralizarse se transforman en nutrientes inorgánicos y puede generar condiciones de

eutrofia (De la Lanza-Espino, 2014). En sistemas costeros, los compuestos inorgánicos nitrogenados varían espacial y temporalmente según condiciones locales, desde lo indetectable hasta más de 30 μM para NO_3^- , según las condiciones prevalecientes de óxido-reducción (De la Lanza-Espino, 2014; Okolodkov *et al.*, 2014). En este ejercicio se encontró que las especies de la taxocenosis propuesta se desarrollan en concentración de nitratos menores a 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

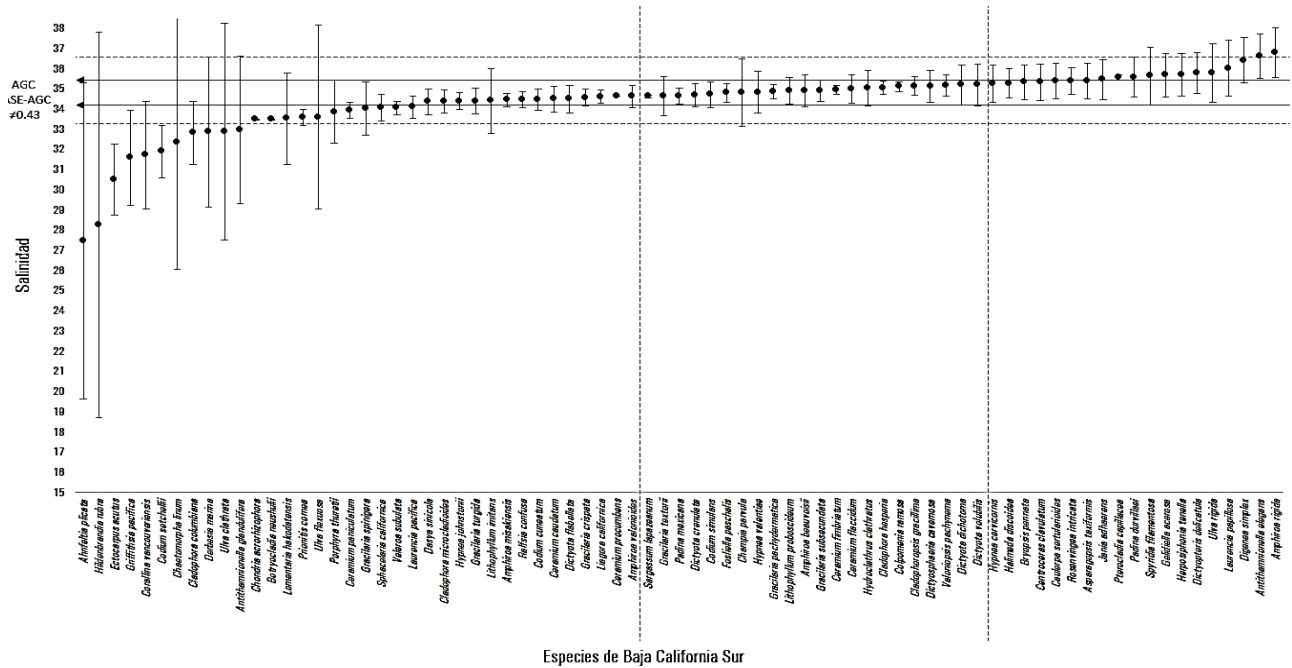


Figura 11. Intervalos de tolerancia de macroalgas a la salinidad del agua de mar. ● = promedio, I = desviación estándar, ◀ = valor mínimo y máximo para bahía de La Paz, BCS, México, AGC = Agua del Golfo de California, ASE = Agua Superficial Ecuatorial (Obeso-Nieblas *et al.*, 2007), --- = Limite superior e inferior (± 0.43), máxima diferencia actual como cambio hipotético en BCS.

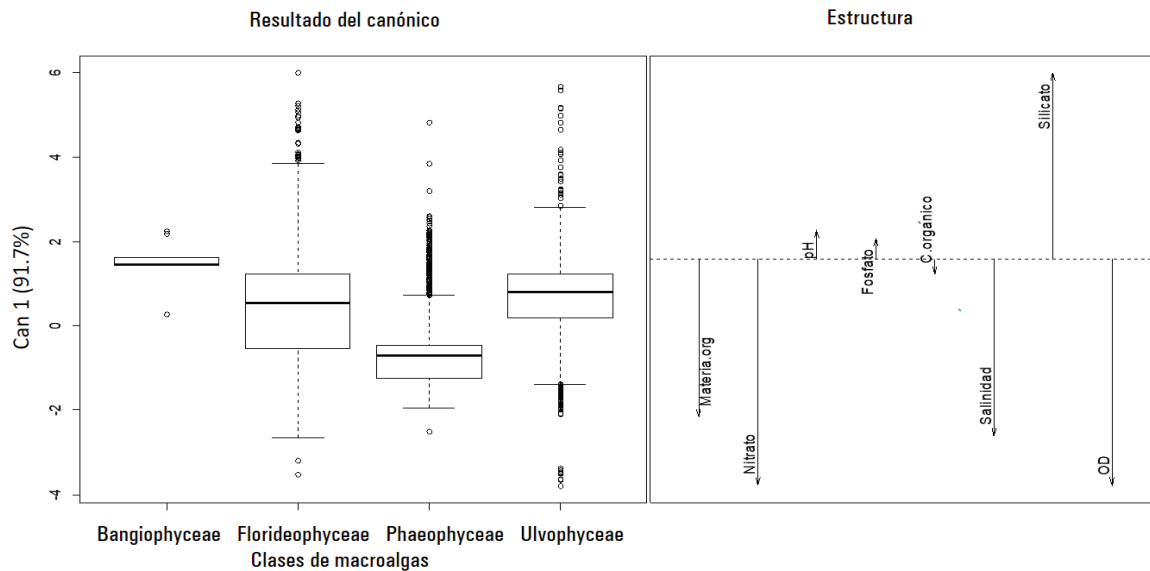


Figura 12. Prueba de análisis discriminante que separó las clases de macroalgas de Baja California Sur, México, respecto a los promedios (2005 -2012) de parámetros fisicoquímicos y nutrientes del agua de mar, de los lugares donde se han registrado en el planeta. El canónico 1 corresponde al vector(es) más largo(s) que son las variables que más separan las Clases.

La concentración de ortofosfatos disueltos en las lagunas costeras puede oscilar desde lo indetectable hasta 5 μM , sin embargo, pueden aumentar a valores cercanos a 10 μM como resultado de la complejidad local y la contaminación (De la Lanza-Espino, 1994). Así, altas concentraciones de ortofosfatos en sistemas costeros de BCS pondrían en riesgo la supervivencia de las especies que actualmente exhiben máximos de tolerancia de 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de fosfato en su distribución a nivel mundial; en consecuencia, las especies de macroalgas estudiadas para BCS, no sobrevivirían a condiciones con concentración de fosfatos mayor a 0.9 $\mu\text{mol l}^{-1}$ en promedio. Los ortofosfatos pueden retirarse del agua hasta en un 60% por adsorción en sedimentos (efecto amortiguador) (Hobbie *et al.*, 1975), lo que explica las bajas concentraciones de este nutriente en la columna de agua de mar.

Pocas especies de macroalgas toleran concentraciones de silicato mayores a 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Efectivamente, estas especies serán más tolerantes a mayores variaciones en la concentración de silicatos en el agua. Mientras que, especies que presentaron intervalos menores a 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$, se proponen aquí como las especies más sensibles.

La salinidad superficial en bahía de La Paz muestra un patrón estacional e inverso a la temperatura que responde a la presencia de diferentes masas de agua en la región. Por ejemplo, en mayo de 2001 se registró la presencia de Agua del Golfo de California con salinidad de 35.35 y esta disminuyó para julio (35.17) por la mayor influencia de Agua Superficial Ecuatorial combinada con Agua del Golfo de California, presentando un valor mínimo durante octubre (34.92) (Obeso-Nieblas *et al.*, 2007). La diferencia en la variación de la salinidad en 2001 en la bahía de La Paz fue de 0.43, lo que indica la presencia de diferentes masas de agua. Si solo aumentara el doble de lo normal, es decir 0.86 y

llega a 35.81, probablemente se conservarían 18 de las especies de las 71 filtradas, que se han registrado en estas concentraciones (Fig. 11).

La salinidad en el agua también cambia respecto a la profundidad (Flores-Verdugo *et al.*, 1993). Además, las mayores variaciones en la salinidad en el ambiente marino, también se presentan en la desembocadura de los grandes ríos, en zonas estuarinas. Probablemente, el que las macroalgas se desarrollen en las costas que recibe escorrentías, explique por qué más especies estudiadas toleran menores concentraciones de salinidad y otros compuestos en el agua que las especies, que toleran altas concentraciones. Es decir, más especies sobrevivirían si disminuyera la salinidad en el agua de mar, que las que sobrevivirían ante un aumento de la salinidad en sistemas costeros de BCS.

Como conclusión, la sensibilidad o tolerancia de las especies al cambio (aumento o disminución extraordinaria de compuestos en el agua) determina los cambios a nivel comunitario. Así, se puede aproximar cuantitativamente la tolerancia de cada especie a las concentraciones de un compuesto químico en el agua, como el intervalo de distribución estadística de la especie en la variable, misma que representa su distribución física en el planeta. Las variaciones naturales y por exceso en sistemas costeros en proceso de eutrofización producirán distinción en composición florística (taxocenosis). Así, se propone incluir especies aquí llamadas tolerantes a variación de concentraciones fisicoquímicas y/o nutrientes para conformar protocolos de referencia, que permitan comparar la distribución del contenido de minerales, con otras áreas del mundo, porque esto clasificará áreas donde se presenta contaminación (Tabla 2). Mientras que, las especies con intervalos estrechos pueden ser indicadores de la concentración del nutriente y/o fisicoquímico, en donde estas se presenten (Tabla 3).

Tabla 3. Especies sensibles a las variaciones de fisicoquímicos en el agua de mar

Especies sensibles	Temperatura < 1 °C	MOD < 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$	pH <0.01	Nitrato < 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$	Fosfato < 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$	Silicato < 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	X					
<i>Ceramium procumbens</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Sargassum lapazeanum</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Botryocladia neushulii</i>	X		X	X	X	X
<i>Chondria acrorhizophora</i>	X		X	X	X	X
<i>Pterocladia capillacea</i>	X					
<i>Cladophora hesperia</i>	X					
<i>Ceramium fimbriatum</i>	X		X			
<i>Colpomenia ramosa</i>	X					
<i>Gracilaria pachydermatica</i>	X					
<i>Liagora californica</i>		X		X	X	X
<i>Veleroa subulata</i>			X			
<i>Ceramium paniculatum</i>				X	X	
<i>Digenea simplex</i>				X		
<i>Prionitis cornea</i>				X	X	
<i>Gelidiella acerosa</i>				X		
<i>Amphiroa rigida</i>				X		
<i>Dictyota crenulata</i>				X		
<i>Hypnea johnstonii</i>				X		
<i>Veleroa subulata</i>					X	X
<i>Pterocladia capillacea</i>					X	X
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>					X	X
<i>Laurencia pacifica</i>					X	

La variación en la concentración de materia orgánica disuelta y silicatos influirá directamente en cambios en la taxocenosis de macroalgas, debido a los consecuentes cambios en el oxígeno disuelto y el pH en el agua, desde grandes grupos como clases. Las especies de algas pardas (Phaeophyceae) son más sensibles al cambio, porque requieren aguas con mayores concentraciones de nutrientes, bien oxigenadas y templadas para su supervivencia; por tanto, una disminución del promedio anual en el oxígeno en la columna de agua podría ocasionar, que los taxa de este grupo desaparecieran primero, mientras que, macroalgas verdes (Ulvophyceae) y rojas (Florideophyceae y Bangiophyceae) persistirían ante mayores condiciones de estrés.

Se proponen posibles taxocenosis por cambios en el estado de calidad de agua, como resultado de una prueba de relación entre variables estudiadas en un mapa de calor (Fig. 13); las variables pH, silicatos, materia orgánica disuelta y el oxígeno disuelto, conforman el grupo que proporciona mayor aporte a la agrupación de especies, por similitud del hábitat, (mayor variedad de tonalidades o gradiente) (Fig. 13), donde se distinguen cuatro asociaciones que indicarían condiciones específicas del agua. Se propone una clasificación de estados de sistemas costeros, que a partir de condiciones fisicoquímicas y de la concentración de nutrientes específicas, debería producir una taxocenosis de macroalgas dependiente de la condición: “buena, moderada, mala y muy mala”.

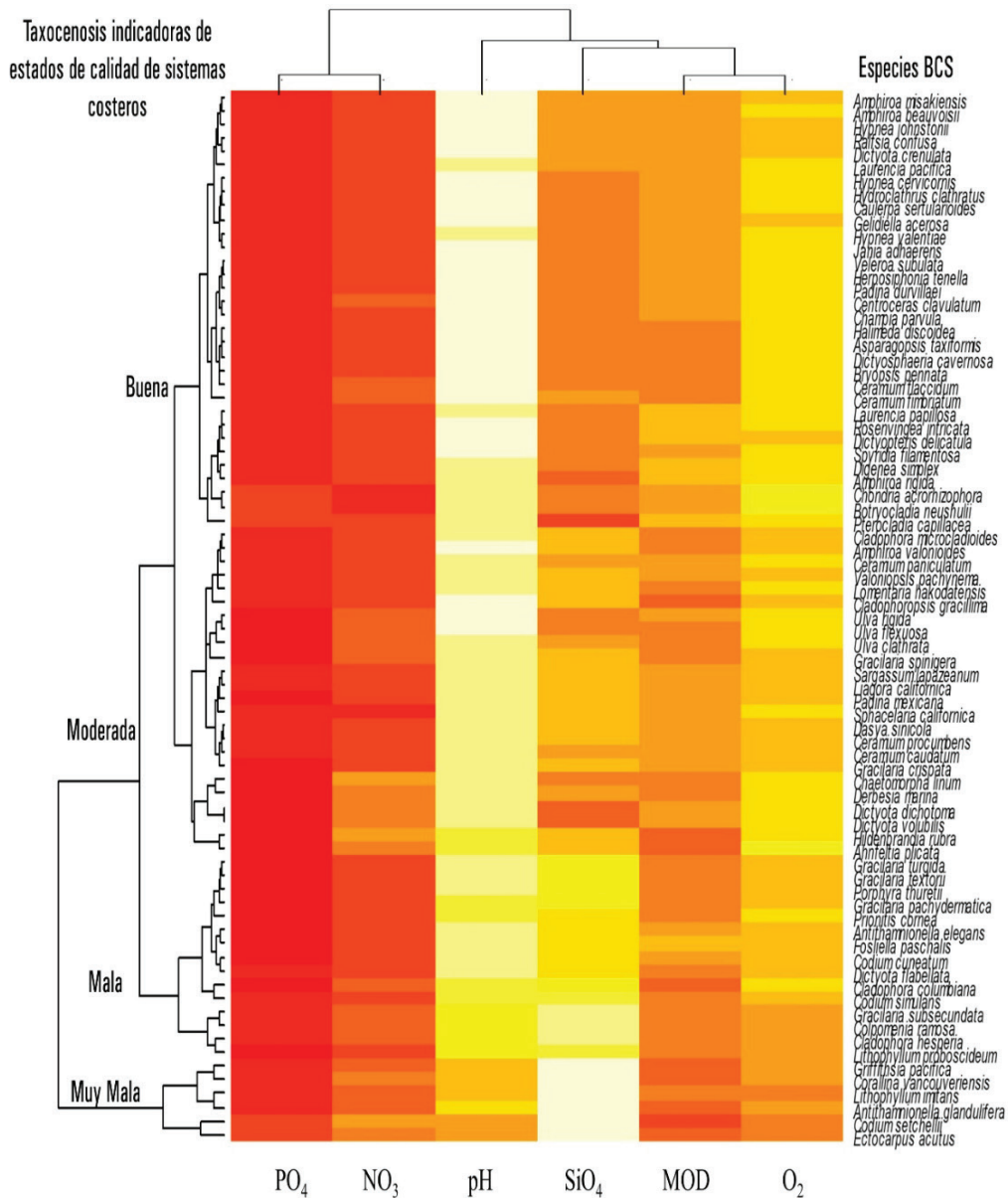


Figura 13. Mapa de calor que muestra las posibles taxocenosis de macroalgas de Baja California Sur, México, de acuerdo con el estado de calidad del agua. Los colores indican la intensidad de la relación o los valores de la variable representada, desde el blanco (máxima relación o valor más alto) pasando por el amarillo y naranja hasta el rojo intenso (mínimo valor). Las agrupaciones por similitud entre especies, discrimina en 4 posibles taxocenosis que indicarían condiciones específicas del agua.

Las especies sensibles *Dictyosphaeria cavernosa*, *Botryocladia neushulii*, *Chondria acrorhizophora*, *Ceramium fimbriatum*, *P. capillacea*, *Veleroa subulata*, *Digenea simplex*, *Gelidiella acerosa*, *Amphiroa rigida*, *Dictyota crenulata*, *Hypnea johnstonii* y *Laurencia pacifica* se proponen como indicadoras dentro de la asociación macroalgal con condiciones “buenas” de calidad de agua; requerirán pH básicos y menores concentraciones promedio de silicatos y materia orgánica disuelta en la columna de agua, así como, aguas oxigenadas y oligotróficas con bajas concentraciones de materia orgánica.

Se propone un estado de calidad con promedios de concentración intermedias o “moderadas” donde sobreviven probablemente la mayor parte de las especies, según la teoría del disturbio intermedio (Roxburgh *et al.*, 2004). Y las especies *Ceramium procumbens*, *Ceramium paniculatum*, *Sargassum lapazeanum* y *Liagora californica* serían indicadoras de este estado, que principalmente se ha enriquecido en materia orgánica disuelta y silicatos.

Un estado de calidad del agua “malo” por el contrario, implica altas concentraciones de silicatos y materia orgánica disuelta en el agua, al igual que pH más bajos y menores promedios de oxígeno, como se ha establecido para otros índices de estados tróficos (Vollenweider *et al.*, 1998). Las especies representativas serían *Cladophora hesperia*, *Colepomenia ramosa*, *Gracilaria pachydermatica*, *Grateloupia cornea*.

En los estados “muy malos” las condiciones descritas se intensifican, especialmente con el aumento en los silicatos en el agua y menores concentraciones en el promedio del oxígeno disuelto, lo que determinaría una taxocenosis conformada por pocas especies (Fig. 13) de las estudiadas y/o las más tolerantes a cambios fisicoquímicos del agua. En condiciones muy malas sobrevivirían pocas especies. En su revisión en campo, Cruz-Ayala (1996) también encontró que la Familia Corallinaceae se presentó con mayor frecuencia en todas las localidades, así como, el género *Codium*, tal y como fue asociado en este estudio en el mapa de calor, con datos satelitales y los datos de registros de presencia en el planeta.

Esta métrica teórica deberá ser probada en condiciones ambientales que suponen las condiciones aquí propuestas, para analizar la idoneidad del índice, así como su precisión. Otras formas de bioindicación incluyen la abundancia o cobertura y la presencia de especies oportunistas (Juanes *et al.*, 2008), este índice con macroalgas es una propuesta desde la asociación de especies y las especies sensibles características de cada estado de calidad.

AGRADECIMIENTOS

A David Siqueiros Beltrones, Mauricio Muñoz Ochoa, Iván Muriello Álvarez, Janette Murillo Jiménez y Enrique Nava Sánchez (CICIMAR-IPN) por sus valiosos aportes y recomendaciones a este escrito; a Ingrid Ardila Poveda por la corrección al texto; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca otorgada.

REFERENCIAS

BOTELLO, A., O. TOLEDO, G. DE LA LANZA-ESPINO & S. VILLANUEVA-FRAGOSO. 2014. The Pacific coast of Mexico *In*: Botello, A. F. Páez-Osuna, L. Méndez-Rodríguez, M. Betancur-Lozano, S. Álvarez-Borrego & R. Lara-Lara (eds.). *Pacífico Mexicano. Contaminación e impacto*

ambiental: diagnóstico y tendencias. UAC, UNAM-ICMYL, CIAD-Matzatlán, CIBNOR, CICESE, pp. 1-27.

- CRUZ-AYALA, M. 1996. Variación espaciotemporal de la ficoflora y su abundancia relativa en la Bahía de La Paz, B.C.S. Tesis de Maestría en Ciencias Pesqueras, CICIMAR, IPN, México. 108 p.
- DE LA LANZA-ESPINO, G. 1994. Química de las lagunas costeras y el litoral mexicano. *In*: De la Lanza-Espino, G. (ed.). *Lagunas costeras y el litoral mexicano*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, pp. 126-441.
- DE LA LANZA-ESPINO, G. 2000. Criterios generales para la elección de bioindicadores. *In*: De la Lanza-Espino, G., S. Hernández & J. Carbajal (eds.). *Organismos indicadores de la calidad del agua y la contaminación (Bioindicadores)*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp. 17-42.
- DE LA LANZA-ESPINO, G. 2014. *Programa de reservas de agua. Protocolo para el muestreo de calidad de agua en ríos endorreicos y exorreicos y en humedales para la aplicación de la Norma de Caudal Ecológico (NMX-AA-159-SCFI-2012)*. WWF, México. 36 p.
- DE LA LANZA-ESPINO, G., I. PENÍE-RODRÍGUEZ, S. CZITROM-BAUS & S. HERNÁNDEZ PULIDO. 2011. Química de las aguas costeras. *In*: De la Lanza Espino, G. & S. Hernández Pulido (eds.). *Ambiente, biología, sociedad, manejo y legislación de sistemas costeros mexicanos*. Plaza y Valdés, WWF, INERENA. pp. 123-140.
- DE LA LANZA-ESPINO, G. & F. GUTIÉRREZ-MENDIETA. 2017. Intervals of non-conservative parameters in aquatic coastal systems of Mexico. *Hydrobiológica* 27 (3): 369-390.
- FAJARDO, M. 1993. *Evaluación de biomasa y determinación de especies de los mantos del género Sargassum spp. C. Agardh (Fucales; Phaeophyta)* en la Bahía de la Paz, B.C.S. CICIMAR, La Paz. 78p.
- Feely, R. A., C. L. Sabine, J. M. Hernández-Ayón, D. Lanson & B. Hales. 2008. Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the continental shelf. *Science* 320: 1490-1492. DOI: 10.1126/science.1155676.
- FLORES-VERDUGO, F., F. GONZALES-FARIAS & U. ZARAGOZA-ARAUJO. 1993. Ecological parameters on the mangroves of semi-arid regions of México: important for ecosystem management. *In*: H. Lieth & A. Al Masoom (eds.). *Towards the rational use of high salinity tolerant plants*. Springer, Berlin, pp. 123-132.
- GARCÍA, H., R. LOCARNINI, T. BOYER, J. ANTONOV, O. BARANOVA, M. ZWENG, J. REAGAN & D. JOHNSON. 2013a. Vol. 4: Dissolved inorganic nutrients (phosphate, nitrate, silicate) *In*: Levitus, S. (ed.). *World Ocean Atlas*. NOAA Atlas NESDIS: 25. Disponible en línea en: <http://www.nodc.noaa.gov/OC5/indprod.html>.
- GARCÍA, H., R. LOCARNINI, T. BOYER, J. ANTONOV, A. MISHONOV, O. BARANOVA, M. ZWENG, J. REAGAN & D. JOHNSON. 2013b. Volume 3: dissolved oxygen, apparent oxygen utilization, and oxygen saturation *In*: Mishonov, A. (ed.). *World Ocean Atlas*. NOAA Atlas NESDIS 75: 27.
- GARCÍA-ROSELLO, E., C. GUISANDE, J. HEINE, P. PELAYO-VILLAMIL, A. MANJARRÉS-HERNÁNDEZ, L. GONZÁLES VILAS, J. GONZÁLES-DACOSRA, A. VAAMONDE & C. GRANADO-LORENCO. 2014. Using MODESTR to download, import and clean species distribution records. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 708-713. DOI:10.1111/2041-210X.12209.
- GBIF (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY). 2018. Descarga de Ocurrencias. Acceso vía [rgbif](http://www.gbif.org) 14 de abril de 2018. Disponible en línea en: <https://www.gbif.org>.

- GODÍNEZ, J. L. 2000. Algas. In: De la Lanza-Espino, G., S. Hernández-Pulido & L. Carvajal-Pérez (eds.). *Organismos indicadores de la calidad de agua y de la contaminación (bioindicadores)*. Comisión Nacional del Agua, Distrito Federal, pp.109-193.
- GUIRY, M. & G. GUIRY. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication., 102. Disponible en línea en: www.algaebase.org. (consultado el 25 marzo 2018).
- GUISANDE, C., A. BARREIRO, I. MANEIRO, A. VERGARA & A. VAAMONDE, 2006. *Tratamiento de datos*. Díaz de Santos Vigo, España. 356 p.
- GUISANDE, C., 2013. *ModestR Software User's Manual*, Vigo, España, pp. 1202-1207.
- GUISANDE, C., A. VAAMONDE & A. BARREIRO. 2016. *Package StatR*. Universidad de Vigo, Vigo. 351 p.
- HERNÁNDEZ-ALMARAZ, P., L. MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, T. ZENTENO-SAVÍN, F. GARCÍA-DOMÍNGUEZ, A. VÁZQUEZ-BOTELLO & E. SERVIERE-ZARAGOZA. 2014. Metal mobility and bioaccumulation differences at lower trophic levels in marine ecosystems dominated by *Sargassum* species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 94 (3): 435-442. DOI:10.1017/S0025315413001653.
- HERNÁNDEZ-ALMARAZ, P., L. MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, T. ZENTENO-SAVÍN, T. M. O'HARA, J. R. HARLEY & E. SERVIERE-ZARAGOZA. 2016. Concentrations of trace elements in sea urchins and macroalgae commonly present in *Sargassum* beds: implications for trophic transfer. *Ecological Research* 31 (6): 785-798. DOI:10.1007/s11284-016-1390-7
- HOBBIE, J., B. COPELAND & W. HARRISON. 1975. Sources and fates of nutrients of the Pamlico River Estuary In: Cronin, L. (ed.). *Estuarine Research*. North Carolina, pp. 287-302.
- ITIS (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM) 2018. 102. Disponible en línea en: <https://www.itis.gov/>. (consultado el 21 marzo 2018).
- JUANES, J., X. GUINDA, A. PUENTE & J. REVILLA. 2008. Macroalgae, a suitable indicator of the ecological status of coastal rocky communities in the NE Atlantic. *Ecol. Indic.* 8: 351-359. DOI:10.1016/j.ecoind.2007.04.005
- LARA-LARA, J., J. ARREOLA-LIZÁRRAGA, L. CALDERÓN-AGUILERA, V. F. CAMACHO-IBAR, G. DE LA LANZA-ESPINO, A. ESCOFET-GIANSONE, I. ESPEJEL-CARBAL, M. GUZMÁN-ARROYO, L. B. LADAH, M. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E. A. MELING-LÓPEZ, P. MORENO CASASOLA-BARCELÓ, H. REYES-BONILLA, E. RIOS-JARA & J. A. ZERTUCHE-GONZÁLEZ. 2008. Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales. In: CONABIO (ed.). *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México, pp. 109-134.
- LOCARNINI, R., A. MISHONOV, J. ANTONOV, T. BOYER, H. GARCÍA, O. BARANOVA, M. ZWENG, C. PAVAR, J. REAGAN, D. JOHNSON, M. HAMILTON & D. SEIDOV. 2013. World Ocean Atlas 2013, Volumen 1: Temperature. In: Levitus, S. (ed.). *NOAA Atlas NESDI 73*, Silver Spring, Mariland, pp. 40.
- OBESO-NIEBLAS, M., B. SHIRASAGO-GERMÁN, J. GAVIÑO-RODRÍGUEZ, H. OBESO-HUERTA, E. PÉREZ-LEZAMA & A. JIMÉNEZ-ILLIESCAS. 2007. Hidrografía en la Boca Norte de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas* 33 (3): 281-291. DOI:10.7773/cm.v33i3.1170.
- OKOLODKOV, Y., F. MERINO-VIRGILIO, J. AKÉ-CASTILLO, A. AGUILAR-TRUJILLO, S. ESPINOSA-MATÍAS & A. HERRERA-SILVEIRA. 2014. Seasonal changes in epi-phytic dinoflagellate of the Yucatan peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Botánica Mexicana* 107: 121-151.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N. & E. PEÑA-SALAMANCA. 2004. Alternativas de monitoreo de calidad de aguas: Algas como bioindicadores. *Acta Nova* 2 (4): 513-517.
- PÁEZ-OSUNA, F., M. OCHOA-IZAGUIRRE, H. BOJÓRQUEZ-LEYVA & I. MICHEL-REYNOSO. 2000. Macroalgae as biomonitors of heavy metal availability in coastal lagoons from the subtropical Pacific of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 846-851. DOI:10.1007/s001280000080
- QUINTERO-RENDÓN, L., E. AGUDELO, Y. QUINTANA-HERNÁNDEZ, S. CARDONA-GALLO & A. OSORIO-ARIAS. 2010. Determinación de indicadores para la calidad de agua, sedimentos y suelos marinos y costeros en puertos colombianos. Definition of indicators for marine and coastal water, sediments and soil quality in Colombian ports. *Gestión y Ambiente* 13 (3): 51-64.
- ROBLEDO, D. & Y. FRIELE-PELEGRÍN. 2014. Las algas marinas como bioindicadores de calidad ambiental y su uso en estudios ecotoxicológicos. In: Gonzáles, C., A. Vallarino, J. Pérez & A. Low (eds.). *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*. El Colegio Frontera del Sur (Ecosur); Instituto de Ecología y Cambio Climático (INECC). México, pp. 535-552.
- RIOSMENA, R., J. LÓPEZ LARA, MARÍA M. & J. LÓPEZ. 2014. Invasión de plantas marinas exóticas en el Pacífico Mexicano: Amenaza para el ambiente y la economía. *Bioma* 16 (2): 54-65.
- ROXBURGH, S., K. SHEA & B. WILSON. 2004. The intermediate disturbance hypothesis: patch dynamics and mechanisms of species coexistence. *Ecology* 85 (2): 359-371. DOI:10.1890/030266.
- RUBACH, H., J. AYÓN & M. BEIER, 2017. Aguas oceánicas subsuperficiales sin oxígeno, pero abundantes en carbono inorgánico y nutrientes, frente a las costas del Pacífico de México. *Elementos para Políticas Públicas* 1 (1): 25-34.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. & R. RIOSMENA RODRÍGUEZ. 1995. Macroalgas marinas de Baja California Sur. Parte 1: Bahía de La Paz y Bahía de La Ventana. GBIF Versión 1.3. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. DOI:10.15468/zcygh6.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D. A. 1998. Macroalgas marinas de Baja California Sur, Parte I: Bahía de la Paz y Bahía de la Ventana. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. P103. México D. F. 10 p.
- SIQUEIROS-BELTRONES, D., P. RAMOS RIVERA & S. CAREAGA-OLVERA. 2017. Macroalgas marinas de Baja California Sur Parte I: Bahía de la Paz y Bahía de la Ventana. GBIF, Versión 1.3. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad CONABIO. Occurrence dataset. Disponible en línea en: <https://www.gbif.org/dataset/3283bea4-1ca5-423e-bc2e-e907d0317522> (consultado el 20 marzo 2018).
- VOLLENWEIDER, R., F. GIOVANNARDI, G. MONTANARI & A. RINALDI. 1998. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the Adriatic Sea: Proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality. *Envirometrics* 9: 329-357.
- ZWENG, M. M., J. R. REAGAN, J. I. ANTONOV, A. V. MISHONOV, T. P. BOYER, H. E. GARCÍA, O. K. BARANOVA, D. R. JOHNSON, D. SEIDOV & M. M. BIDLLE. 2013. *World Ocean Atlas 2013, Volume 2: Salinity*. NOAA Atlas NESDIS 74. Disponible en línea en: <http://www.nodc.noaa.gov/OC5/indprod.html>.

Allometric growth and reduced pectoral fin regeneration rate in terrestrialized *Polypterus senegalus*

Crecimiento alométrico y disminución de la capacidad de regeneración de la aleta pectoral en *Polypterus senegalus* terrestriados

Rodrigo Cuervo-González^{1*}, Pablo San Martín del Angel¹ and Luis Covarrubias²

Recibido: 19 de agosto de 2019.

Aceptado: 02 de noviembre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

Background: *Polypterus* condense unique characteristics that astonished and confused naturalists since 1802 when Geoffroy St. Hilaire first described and named this fish. *Polypterus* was seen in that epoch as primitive amphibians or a link between fishes and amphibians. Polypteriformes have the ability to regenerate its pectoral fins with the accuracy only seen in urodel amphibians and have the capacity to breathe air using paired lungs. **Goals:** We aimed to evaluate how forced land-living condition (i.e., terrestrialization) could affect pectoral girdle bones shape and pectoral fin regeneration in *Polypterus senegalus*. **Methods:** *Polypterus* were reared in semi-terrestrial conditions for nine months and iterative amputations of pectoral fins were performed every two months. The bone elements of the shoulder girdle and pectoral fins were measured and compared between terrestrialized organisms and controls. **Results:** Terrestrialization produces notable morphological alterations, including general reduced body growth and big eyes, serial amputations under this condition decreases the number of radial bones of pectoral fins. **Conclusions:** We propose allometry and heterochrony as reliable concepts to explain the modifications generated by terrestrialization. Also, we suggest that anatomical alterations in early tetrapod ancestors were an unavoidable consequence of the influence of environment on general metabolic processes associated with growth.

Keywords: *Polypterus*, fin, regeneration, allometry, heterochrony

RESUMEN

Antecedentes: *Polypterus* condensa características únicas que sorprendieron y confundieron a los naturalistas desde que Geoffroy St. Hilaire lo describiera y nombrara por primera vez en 1802. En esa época *Polypterus* fue visto como un anfibio primitivo o como el eslabón entre peces y anfibios. Los Polypteriformes tienen la capacidad de regenerar las aletas pectorales con la precisión que solo se ve en los anfibios urodelos y tienen la capacidad de poder respirar aire utilizando un par de pulmones. **Objetivos:** Fue evaluar cómo una condición forzada de vida en tierra pudiera afectar a los huesos de la cintura escapular y la regeneración de la aleta pectoral de *Polypterus senegalus*. **Métodos:** Los *Polypterus* fueron mantenidos en condiciones semi-terrestres durante nueve meses y se realizaron amputaciones iterativas de las aletas pectorales cada dos meses. Los elementos óseos de la cintura escapular y aletas pectorales fueron medidos y comparados entre organismos terrestriados y controles. **Resultados:** La terrestriación produce alteraciones morfológicas notables, que incluyen reducción del tamaño corporal general y ojos más grandes, las amputaciones seriales en esta condición provocaron que el número de huesos radiales de las aletas pectorales se redujera. **Conclusiones:** Proponemos que los conceptos alometría y heterocronía pueden explicar las modificaciones generadas por la terrestriación. Así mismo, sugerimos que las alteraciones anatómicas en los ancestros de los tetrápodos fueron una consecuencia inevitable de la influencia del medio ambiente sobre los procesos metabólicos generales asociados con el crecimiento.

Palabras clave: *Polypterus*, aleta, regeneración, alometría, heterocronía

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, 92850. México

² Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210. México

***Corresponding author:**

Rodrigo Cuervo-González: e-mail: rodcuervo@uv.mx

To quote as:

Cuervo-González R., P. San Martín del Angel & L. Covarrubias. 2019. Allometric growth and reduced pectoral fin regeneration rate in terrestrialized *Polypterus senegalus*. *Hidrobiológica* 29 (3): 155-161.

INTRODUCTION

Polypterus share several morphological and developmental characteristics with lungfishes and extinct tetrapod-like fishes, but important exceptions are the absence of choana and robust pelvic bones. However, despite its frog-like development and larvae with external gills (Bartsch *et al.*, 1997), now it is clear that Polypteriformes are the most basal Actinopterygian fishes (Noack *et al.*, 1996). Another important characteristic is that *Polypterus* have the capacity to breathe air by spiracle-mediated aspiration using ventrally paired lungs and, therefore, potentially could live for a long time in a semiterrestrial environment (Graham *et al.*, 2014). Additionally, *Polypterus* has the ability to regenerate their lobed pectoral fins within 30 days post-amputation with remarkable accuracy (Cuervo *et al.*, 2012), a characteristic shared with African lungfishes (Conant, 1973), living urodele amphibians, and some extinct amphibians (Fröbisch *et al.*, 2015). Since endoskeleton regeneration has only been observed in living freshwater vertebrates (Fröbisch *et al.*, 2015), it is tempting to suggest that this capacity developed in tetrapods that colonized rivers and lakes distant from brackish and seawater.

Polypterus normally make use of their pectoral lobed fins for bracing, turning, moving forwards and backwards, or rising their anterior body when sitting at the bottom of a pond or river. *Polypterus senegalus* can take advantage of these abilities when forced to live on land (*i.e.*, terrestrialization), such that the use of pectoral fins and their “walking” performance improves in the long term (Standen *et al.*, 2014). Apparently, this experimental living condition promotes anatomical modifications in the pectoral girdle bones that have been related with anatomical changes seen in stem tetrapods (Standen *et al.*, 2014). Nonetheless, any anatomical modification observed needs to consider alternative interpretations since it is unlikely that *Polypterus* are equivalent to the tetrapod ancestors that attempted life on land. For example, *Eusthenopteron* was a strictly aquatic fish with lobed fins with lepidotrichia and the pectoral girdle attached to the skull. On the other hand, *Acanthostega* limbs lack lepidotrichia and the pectoral girdle is detached from the skull. It is remarkable that the scapulocoracoid bone in these tetrapod-like fishes had a glenoid cavity where the humerus head articulates forming an anatomical assembly entirely different from that of *Polypterus* (Hall, 2006; Cuervo *et al.*, 2012).

In the present work, we aimed to evaluate how “terrestrialization” could affect growth and pectoral fin regeneration. We show that terrestrialized *Polypterus* remained with a complexion and size similar to that of immature juvenile fishes with no clear external dimorphism of the anal fin, however, females developed mature gonads. Besides, terrestrialized *Polypterus* showed evident bigger and protruding eyes, but we did not observe significant alterations of pectoral girdle bones attributable to terrestrialization. Finally, the fin regeneration of fishes living on land occurred at a slower rate than of those living underwater resulting, through iterative amputation-regeneration cycles, in regenerates with a reduced number of radial bones.

Materials and methods

The rearing habitat were acrylic boxes (40x20 cm) with perforated floor, covered with a layer of pebbles and Java moss, and placed inside a tank of 90 gallons maintained at 28 °C with living aquatic plants and filtering system; the water level was minimal (a 2mm layer) and sprayed from above to maintain a humid environment (Fig. 1A). Commercially

obtained juvenile bichirs were used for the experiments. No more than five juvenile fishes were kept per box. The containers for control fishes were located in the same tank but 15 cm below the water level. Fishes were fed daily with commercial pelleted food *ad libitum* for 10 minutes. We noted that terrestrialized fishes eat as avidly as controls along the time of the experiments. After sixteen days of terrestrialization, both pectoral fins of one group of fishes were amputated at the base with a nail clipper as previously reported (Cuervo *et al.*, 2012). Then iterative amputations were performed at two-month intervals in control and terrestrialized fishes when complete regeneration is completed in both groups. To stain the endoskeleton, regenerated fins were amputated, fixed and dehydrated overnight (ON) in 100% ethanol, then incubated in acetone for 24 h and stained for 3 h at 37 °C + ON at room temperature in alcian blue and alizarin red in 70% ethanol with 5% acetic acid. Finally, they were rinsed in tap water before clearing in 1% KOH and 20% glycerol for 24 h and then cleared in 50% glycerol and finally stored in 80% glycerol. The same protocol was used for euthanized fishes to stain the pectoral girdle bones. We evaluated the size of pectoral girdle bones of eighteen juvenile *Polypterus* from another batch (size 6.2 ± 0.2 cm) raised in fully aquatic environment to compare with the terrestrialized. For this evaluation, we measured the longest and the broadest lines drawn on cleithrum, supracleithrum and clavicle bones (Fig. 3B, D). For X-ray images, the Xtreme Bruker equipment was used; for determinations, fishes were anesthetized by immersion in cold water containing a 0.1% tricaine solution. We declare that the experiments performed were approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, and the criteria used are in accordance with regulations used by the Universidad Veracruzana (NOM-062-Z001999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”, Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

RESULTS

Differential growth after terrestrialization

The start of the juvenile period in *Polypterus senegalus* is defined by the external color change (the grayling stage), which coincides with the beginning of air breathing through their lungs and external gill resorption (Bartsch *et al.*, 1997). Thus, we performed the terrestrialization experiments with a batch of thirty uniform juvenile fishes shortly after the grayling stage (4.8 ± 0.3 cm long). At this stage fishes are immature and the gender is not recognizable. Eighteen fishes forced to live on land for nine months (Fig. 1A) showed a notorious overall size reduction (amputated and non-amputated fishes; see below) of about 39% (Fig. 1A, inset graph) (mean 7.2 ± 0.3 cm with a range between 6.8 and 7.8 cm) when compared with water raised controls (mean 11.9 ± 0.9 cm with a range between 10.4 and 12.7 cm) (Fig. 1B), an outcome similar to that reported by Standen *et al.* (2014). The size of nine-months terrestrialized fishes was reached by controls within the first two months and terrestrialized fishes did not show significant growth from the seventh month onwards. Despite the smaller size of terrestrialized fishes, no evident skeletal abnormality was detected (Fig. 1C) and most internal organs appeared normal in comparison with water-raised fishes of similar size.

Externally, a differential growth effect by terrestrialization was evident in nine-months land-raised fishes. Control fishes raised in water

showed clear external sexual dimorphism, evidenced by the shape of the anal fin, a characteristic of Polypteriformes (Holden, 1971). In contrast, no marked sexual difference was externally observed in terrestrialized fishes (Fig. 1D) but, internally, six out of eight females developed grown oocytes (Fig. 1E). Otoliths were extracted and compared but did not show a noticeable difference in size and form (Fig. 1F). However, all (18/18) terrestrialized fishes developed protruding eyes with a diameter $21.8 \pm 1.04\%$ bigger and $16.4 \pm 1.29\%$ wider pupils as compared with control fishes of the same size and complexion (*i.e.*, juvenile fishes of another batch) (Fig. 1G).

Fin regeneration in terrestrialized fishes

It is known that highly regenerative species such as newts can regenerate normal limbs after repeated amputations although, occasionally,

some skeletal elements are missed (Spallanzani, 1768; Yun et al., 2015). Therefore, it is expected that *Polypterus* is able also to perform repeated fin regeneration cycles and, thus, this ability can be used as an approach to monitor the long-term growth effect due to terrestrialization. Thirteen fishes were amputated and five non-amputated land-raised fishes were used as controls. The fins of a group of eight fishes maintained in water were also amputated (water-raised control fishes). Serial amputations of these groups after complete regeneration were performed at intervals (*i.e.*, at least 8 weeks after amputation) and the number of radial bones in both pectoral fins was evaluated. Regenerated fins were well-formed with complete propterygium and metapterygium bones and the metapterygial edge did not appear to be affected by accidental ground friction. Interestingly, the number of radial bones in regenerates of terrestrialized fishes was reduced:

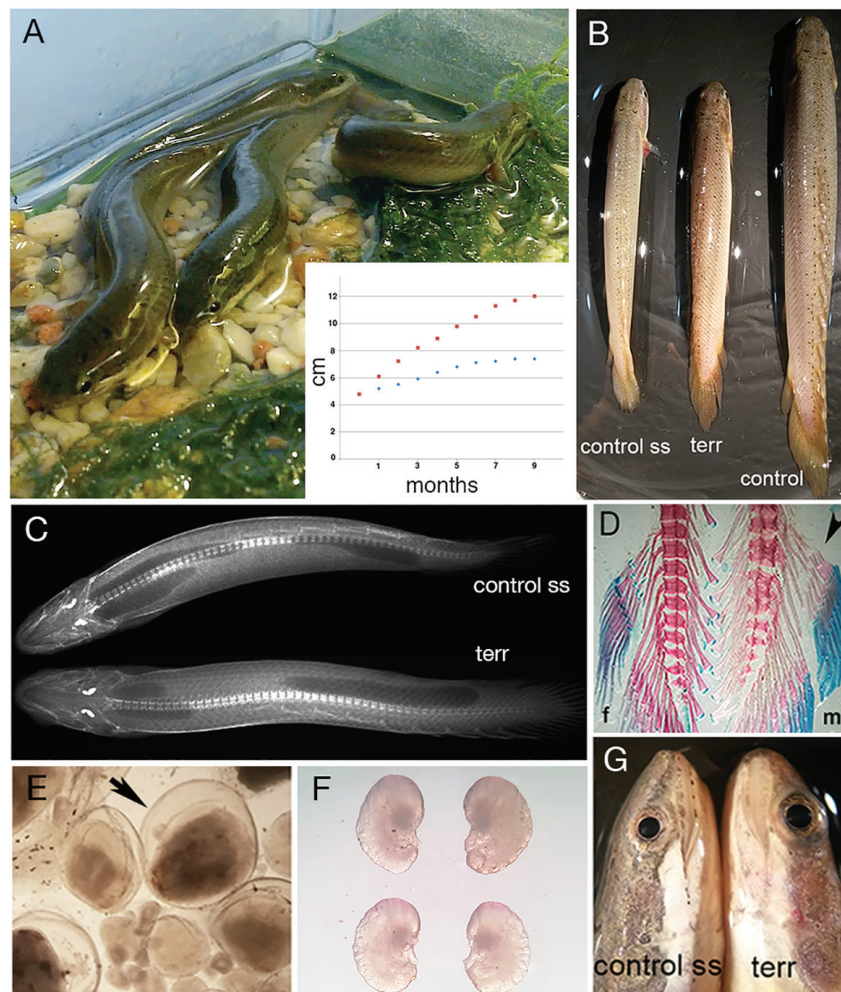


Figure 1. External growth abnormalities in terrestrialized *Polypterus* fishes. A, Terrestrialized *Polypterus* and diagram of growth progress. Red squares, control, blue squares, terrestrialized fishes. B, Comparative size of 9-months terrestrialized (terr) and two controls raised in water, one of the same age and batch (control) and one younger from another batch of the same size (control ss). C, Dorsal X-ray image of terrestrialized (lower) and control ss fishes (upper). No marked differences were observed. The internal dark zones evidenced well-developed lungs and the brighter spots in the head are the otoliths. D, Anal fin show no marked external sexual dimorphism between female (f) and male (m) fishes. Arrowhead points the anterior radial bones characteristic of males. E, Grown and immature oocytes; arrow points the chorion of a developing oocyte. F, Pair of otoliths of terrestrialized (lower) and control ss (upper) fishes. G, Eyes of terrestrialized (terr) fish compared with those of control of the same size (ss). Note the protruding and larger eye of a terrestrialized fish as compared with that of a control fish of the same size.

the average number of radial bones per fin before amputation was 13.1 (n=30 fins) and, after four consecutive amputations, this number in water-raised controls was 10.8 ± 1.2 radials (n=16 fins), whereas that in regenerated fins of terrestrialized fishes was 7.8 ± 2.3 radials (n=26 fins) (Fig. 2A). The reduction in the number of radials was gradual according to the number of amputations (Fig. 2B). The reduction in the number of radials was possibly due to a growth adaptation under land-living conditions. In agreement with a growth effect by this forced living condition, a marked extension of the time required for pectoral fin regeneration was observed. For example, in the last round of amputations, we observed that at the ninth day post-amputation all control regenerating fins were in the fin fold stage of regeneration. Whereas terrestrialized fins were at the stage at which the blastema is still forming (Fig. 2C), and complete regeneration and ossification of radials took around fifty days for terrestrialized fishes in comparison with the thirty days required for controls. Nonetheless, it should be noted that regenerated pectoral fins were reduced in size but this was not directly associated with the number of radials; for instance, fins with 6 radials were not half the size of fins with 12 radials (Fig. 2A). Therefore, independent of the reduced fin size, the loss of radials is likely originated from the slower growth rate under land living conditions at the early stages of regeneration, time at which bone elements are specified.

Morphological variability of *Polypterus* girdle bones

After eleven months of terrestrialization, a group of five amputated and five control fishes were euthanized and the morphology of cleithrum, supracleithrum, and clavicle (the pectoral girdle bones) was evaluated (Fig. 3A). Also, we evaluated the pectoral girdle bones of eighteen juvenile *Polypterus* from another batch (size 6.2 ± 0.2 cm), raised in a fully aquatic environment (Fig. 3B, D). No evident anatomical alterations were detected between groups (i.e., amputated vs. non-amputated, land-raised vs. water-raised; Fig. 3A). Instead, the simple evaluation approach used here was sufficient to note in some cases an evident morphological variability between left and right pectoral girdle bones of up to 15% in the broad lines of supracleithrum and posterior opercular chamber edge of cleithrum (Fig. 3C). Due to the intrinsic morphological variability, we could not associate the shape of girdle bones with the living conditions. In addition, the juvenile scapulacoracoid, the bone that connects the endoskeleton of the fin with the pectoral girdle, is the last bone to ossify in this assemblage and normally shows marked variability in the extent of ossification even within the same fish (Fig. 3E).

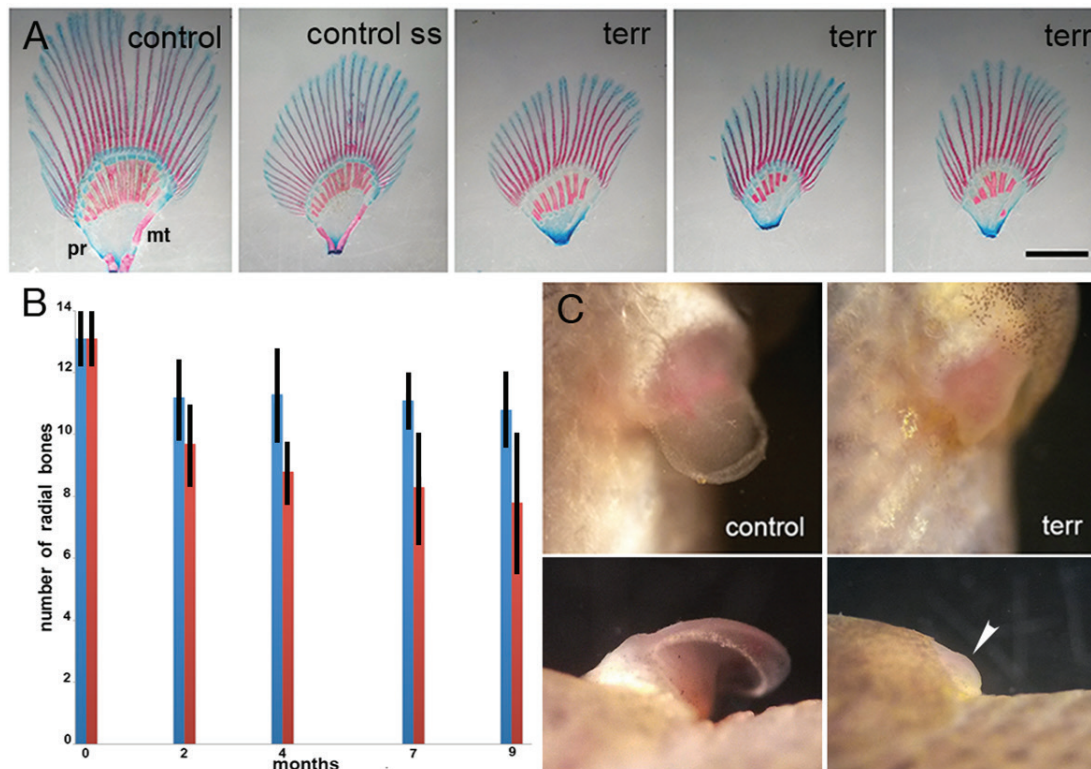


Figure 2. Fin regeneration in terrestrialized fishes. A. Alizarin red and alcian blue stained regenerated pectoral fins. Regenerated fins of water-raised fishes (control) were bigger than pectoral fins of terrestrialized fishes. Note the narrowed shape and the reduced number of radial bones in the fins of terrestrialized fishes, particularly evident when compared with a control of the same size (ss). Fins are placed in the same orientation for comparison. B. Number of radials formed in regenerated fins during the course of serial amputations along nine months. Amputations were done every 2 months; “0” represents the time of the first amputation. An initial reduction in the number of radials was observed in the first regenerate of either water or land-raised fishes, but during the succeeding regenerations events, only fins of the terrestrialized group showed a progressive reduction in the number of radials. C. Lateral (upper panels) and dorsal (lower panels) views of regenerating pectoral fins of water raised (control) and terrestrialized (terr) fishes at the fin fold stage of regeneration after nine days post amputation. Arrowhead point to the still forming blastema of a terrestrialized fish. mt, metapterygium. pr, propterygium.

DISCUSSION

It is known that high oxygen levels in the atmosphere occurred during the transition from water to land. The fossil record support a direct relationship among the increase in atmospheric O₂ concentration, maximum body size and radiation of species (Dahl, 2010). However, a small body size might have been advantageous to support the bodyweight of early vertebrates living out of water. The parsimonious scenario would be that dwarf tetrapod ancestors might have had the advantage to make an excursion in land and colonize swamps but, once adapted to land, the atmospheric O₂ concentration allowed them to rapidly gain size and weight. The small tetrapodomorph *Kenichthys* exemplified this possibility (Zhu & Ahlberg, 2004). The advantage of a reduction in body size has also been documented for the evolution of birds (Lee, 2014). In this context, in addition to the influence of overall reduced growth for life on land, favorable conditions for morphological modifications might have also played a role in the rapid adaptation and evolution of early tetrapods. The reproducible phenotype observed in *Polypterus* living on land supports this proposal. The recent report showing that a conditional training in a semiterrestrial habitat improved the “walking” performance of the mostly water-living *Polypterus* fish experimentally shows the struggles that a fish on land

might have suffered and that without doubt played a role in the selection for a terrestrial life (Standen *et al.*, 2014).

The anatomical changes observed in most tetrapodomorph fossils indicate that mesomeres and lepidotrichia bones were first modified (Coates, 1994). A reduction in the number of radial bones and the eventual loss of the dermal skeleton that rim the ancestral fin-limb occurred previously to the detachment of the pectoral girdle from the skull. In concordance, modifications in the apical ectodermal ridge-apical fold transition by iterative apical fold removal links lepidotrichia reduction with endoskeleton expansion in developing pectoral fins of zebrafish (Yano *et al.*, 2012). Later, scapulocoracoid growth occurred possibly as an essential event to support the upper body weight. Many authors agree that very few of the adaptations suffered by stem tetrapod are in fact adaptations for life on land; rather, most of them are aquatic specializations that just fortuitously allowed terrestrial life (Triques & Christoffersen, 2009). Following this view, the term *exaptation* has been proposed to define a character previously shaped by natural selection for a particular function coopted for a new function (Gould & Vrba, 1982).

Based in small changes in the shape of pectoral girdle bones determined in terrestrialized *Polypterus*, the view described above was recently challenged, and developmental plasticity (polyphenism) was

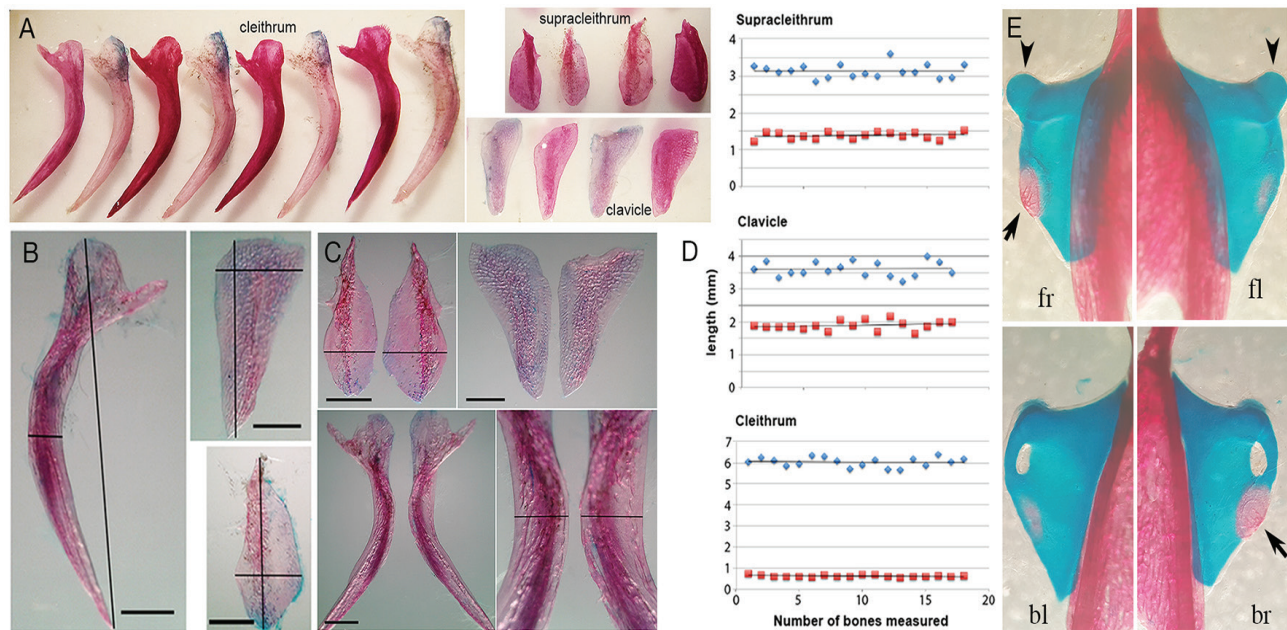


Figure 3. Comparative anatomy of pectoral girdle bones of water- and land-raised fishes. A, A comparison between cleithrum, clavicle or supracleithrum bones of non-amputated terrestrialized fishes (lighter alizarine red staining) and of controls of the same size (stronger alizarine red staining). B, Measurements done on pectoral girdle bones. Red and blue lines drawn are the maximum width and high, respectively, found in each sample. For cleithrum red line measure the medial zone of the posterior opercular chamber edge (scale bar, 1 mm). C, A comparison between left and right pectoral girdle bones of the same fish. Evident differences in shape and size were observed for each bone element (scale bar, 1 mm); in particular, note the significant difference in width of supracleithrum and at the middle opercular chamber edge of cleithrum. D, Estimation of girdle bone morphology variability. Morphology variability was estimated by measuring and comparing width (red squares) and high (blue rhombus) lines as indicated in B. E, Frontal (upper panels) and backward (lower panels) scapulocoracoid attached to cleithrum. Note the difference in ossification between right and left pectoral girdles of the same fish (arrow). The head bone where propterygium and metapterygium articulates is pointed with arrowhead. fr, frontal right; fl, frontal left; br, backward right; bl, backward left.

proposed as a macroevolution mechanism that facilitated the origin of tetrapod characters that allowed the terrestrial life (Standen *et al.*, 2014). Our observations show that outlines of bones that compose the pectoral girdle are intrinsically heterogeneous with a significant margin of variability even within the same fish (Fig. 3). The slight anatomical modifications reported attributable to developmental plasticity, as narrowed and 10.6 % longer clavicles, reduced supracleithrum and posterior opercular chamber edge (Standen *et al.*, 2014), fit within the margin of normal variability that we determined (Fig. 3C), and not necessarily arose as a consequence of the forced living conditions. Furthermore, a fundamental bone in tetrapod evolution, the scapulocoracoid (Fig. 3E, and 4), the bone that mediates the mechanical forces between the endoskeleton of the fin and pectoral girdle bones, was not considered in that work. In juvenile *Polypterus*, the scapulocoracoid is formed of cartilage and is the last bone ossify of the pectoral girdle assemble (Fig. 3E). It is noteworthy that the scapulocoracoid bone in tetrapods and tetrapod-like fishes had a socket to articulate the humerus head (the glenoid cavity) (Hall, 2006). In contrast, the opposite appears to occur in *Polypterus*, that is, the propterygium and metapterygium bones articulate with a convex head bone that protrudes from the scapulocoracoid (Fig. 3E) (Cuervo *et al.*, 2012). Therefore, training directed to optimize a particular biomechanical performance may be the result of the intrinsic and already existing physiological and morphological capabilities of *Polypterus* (Fig. 4) and not the expression of a polyphenism *per se*.

In contrast with girdle bones, we did observe the reduced size of pectoral fins after successive regeneration cycles in terrestrialized

Polypterus. In this context, it is interesting that the marked reduction in size observed in regenerates of axolotls after repeated limb amputations at the bud stage did not cause evident and reproducible morphological alterations but the reduction in the size of the complete limb (Yun *et al.*, 2015). Heterochrony has been defined in terms of shifts in the onset or cessation of a specific developmental process (Klingenberg, 1998). The delay in the formation of the fin fold and the extended time to attain a complete regeneration and ossification of radials fit that definition. In a broad sense, as stated by Gould (2000) heterochrony refers to a change in the relative timing of developmental events resulting in changes in size and shape. For this reason, allometric growth, causing the uneven scaling of body parts in relation to the whole body, is a process which origin could be related to heterochrony. Thus, the small fins regenerated as well as the big eyes, can fit the allometry definition.

We cannot discard that specific modifications such as big and protruding eyes and slender lobed fins with few radials might have resulted, by chance, in changes useful to colonize wetlands. Then, it is advisable to envision a complex experimental scenario combining terrestrialization with high oxygen levels, brackish water, high temperature, etc., in which *Polypterus* or other fishes used to study the swimming-to-walking transition as the catfish or lungfish (Johnels, 1957; King *et al.*, 2011) are forced to live, in order to evaluate the anatomical modifications and behavioral changes induced by the environment and get insights about the events that occurred in the short period of time when tetrapods prevailed on land.

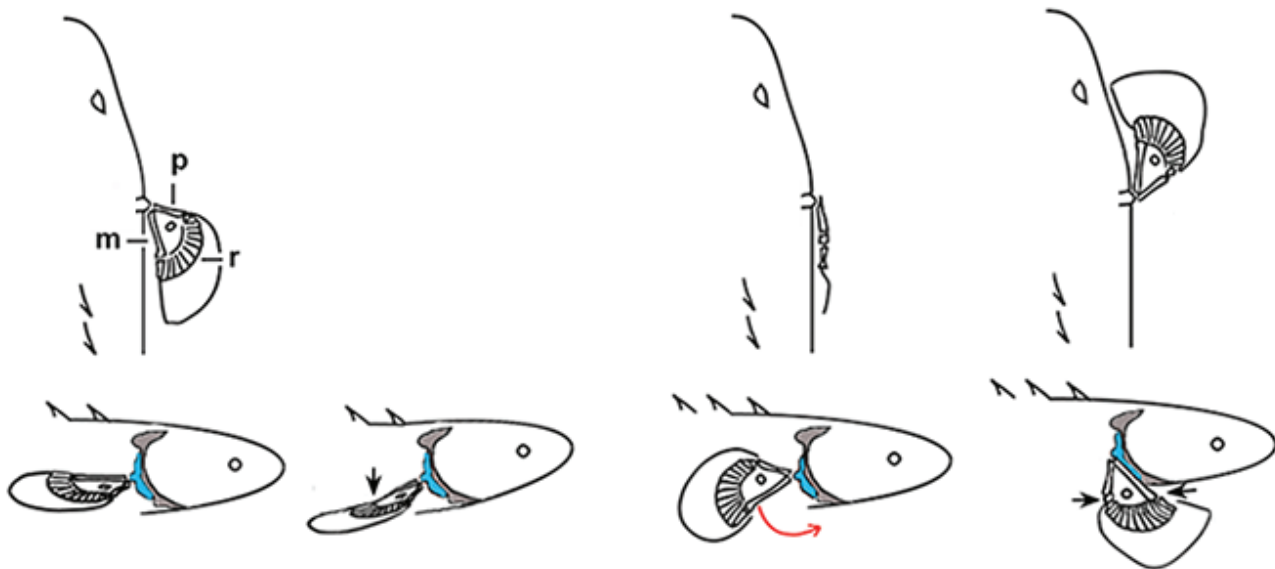


Figure 4. Schematized dorsal and lateral views of *Polypterus*. The location of radials, propterygium and metapterygium bones attached to scapulocoracoid (blue) in relation to the corresponding pectoral girdle bones (gray) are shown. In the tetrapod-like position, the pectoral fins have a wide range of movements, including forwarding movements (red arrow) and a slight flexion and extension at the “wrist” (black arrows), as occurs in tetrapods. The fin ventral side is used to rest or to move on the ground. p, propterygium; m, metapterygium; r, radials.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants 151757 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and IN209813 from PAPIIT-UNAM.

REFERENCES

- BARTSCH, P., S. GEMBALLA & T. PIOTROWSKI. 1997. The embryonic and larval development of *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829: its staging with reference to external and skeletal features, behaviour and locomotory habits. *Acta Zoologica* 78: 309-328. DOI: 10.1111/j.1463-6395.1997.tb01014.x
- COATES, M. I. 1994. The origin of vertebrate limbs. *Development Supplement*: 169-180.
- COATES, M. I., J. E. JEFFERY & M. RUT. 2002. Fins to limbs: what the fossils say. *Evolution and Development* 4: 390-401. DOI: 10.1073/pnas.1006619109
- CONANT, E. B. 1973. Regeneration in the African lungfish, *Protopterus*. 3. Regeneration during fasting and estivation. *Biological Bulletin* 144: 248-261. DOI: 10.2307/1540006
- CUERVO, R., R. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. CHIMAL-MONROY, H. MERCHANT-LARIOS & L. COVARRUBIAS. 2012. Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 3838-3843. DOI: 10.1073/pnas.1006619109
- DAHL, T. W., E. U. HAMMARLUND, A. D. ANBAR, D. P. G. BOND, B. C. GILL, G. W. GORDON, A. H. KNOLL, A. T. NIELSEN, N. H. SCHOVSBO & D. E. CANFIELD. 2010. Devonian rise in atmospheric oxygen correlated to the radiations of terrestrial plants and large predatory fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 17911-17915. DOI: 10.1073/pnas.1011287107
- FRÖBISCH, N. B., C. BICKELMANN, J. C. OLORI & F. WITZMANN. 2015. Deep-time evolution of regeneration and preaxial polarity in tetrapod limb development. *Nature* 527: 231-234. DOI: 10.1038/nature15397
- GOULD, S. J. & E. S. VRBA. 1982. Exaptation a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15. DOI: 10.1017/S0094837300004310
- GOULD, S. J. 2000. Of coiled oysters and big brains: how to rescue the terminology of heterochrony, now gone astray. *Evolution and Development* 2: 241-248. DOI: 10.1046/j.1525-142x.2000.00067.x
- GRAHAM, J. B., N. C. WEGNER, L. A. MILLER, C. J. JEW, N. C. LAI, R. M. BERQUIST, L. R. FRANK & J. A. LONG. 2014. Spiracular air breathing in polypterid fishes and its implications for aerial respiration in stem tetrapods. *Nature Communications* 5: 3022. DOI: 10.1038/ncomms4022
- HALL, B. K. 2006. *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*. University of Chicago Press. DOI: 10.1007/s10914-007-9049-3
- HOLDEN, M. J. 1971. Significance of sexual dimorphism of the anal fin of Polypteridae. *Nature* 232: 135-136. DOI: 10.1038/232135b0
- Johnels, A. G. 1957. The mode of terrestrial locomotion in Clarias. *Oikos* 8: 122-129. DOI: 10.2307/3564996
- KING, H. M., N. H. SHUBIN, M. I. COATES & M. E. HALE. 2011. Behavioral evidence for the evolution of walking and bounding before terrestriality in sarcopterygian fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 21146-21151. DOI: 10.1073/pnas.1118669109
- KLINGENBERG, C. P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73: 79-123.
- LEE, M. S. Y., A. CAU, D. NAISH & G. J. DYKE. 2014. Dinosaur evolution. Sustained miniaturization and anatomical innovation in the dinosaurian ancestors of birds. *Science* 345: 562-566. DOI: 10.1126/science.1252243
- NOACK, K., R. ZARDOYA & A. MEYER. 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order. *Genetics* 144: 1165-1180.
- SPALLANZANI, L. 1768. *Prodomo di un'opera da imprimersi sopra le riproduzioni animali*. In Modena: Nella Stamperia di Giovanni Montanari. 106p.
- STANDEN, E. M., T. Y. DU & H. C. E. LARSSON. 2014. Developmental plasticity and the origin of tetrapods. *Nature* 513: 54-58. DOI: 10.1038/nature13708
- TRIQUES, M. L. & M. L. CHRISTOFFERSEN. 2009. Exaptations in the conquest of land by Tetrapoda. *Gaia Scientia* 3: 69-74. DOI: 10.21707/gsv3i2.3984
- YANO, T., G. ABE, H. YOKOYAMA, K. KAWAKAMI & K. TAMURA. 2012. Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development. *Development* 139: 2916-2925. DOI: 10.1242/dev.075572
- YUN, M. H., H. DAVAAPIL & J. P. BROCKES. 2015. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife* 4: e05505. DOI: 10.7554/eLife.05505.015
- ZHU, M., & P. E. AHLBERG. 2004. The origin of the internal nostril of tetrapods. *Nature* 432: 94-97. DOI: 10.1038/nature02843

Intra-annual variation of chlorophyll-*a* and nutrients in a hydraulically perturbed river-floodplain system in the Grijalva River basin

Variación intra-anual de la clorofila-*a* y nutrientes en un sistema río-llanura de inundación hidráulicamente perturbado en la cuenca del río Grijalva

Allan K. Cruz-Ramírez¹, Miguel Ángel Salcedo², Alberto J. Sánchez², Juan de Dios Mendoza³, Everardo Barba⁴, Nicolás Álvarez-Pliego² and Rosa Florido²

Recibido: 09 de enero de 2017.

Aceptado: 24 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

¹ Doctorado en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 0.5 km carretera Villahermosa-Cárdenas, Villahermosa, Tabasco, 86150. México.

² Diagnóstico y Manejo de Humedales Tropicales, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 0.5 km carretera Villahermosa-Cárdenas, Villahermosa, Tabasco, 86150. México.

³ Recursos Hídricos y Edáficos, División Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Teapa Km 25, R/A, La Huasteca 2a Sección, Centro, Tabasco, 86290. México.

⁴ Manejo Sustentable de Cuencas y Zonas Costeras. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa. 15.5 km carretera Villahermosa-Reforma, Villahermosa, Tabasco, 86280. México.

*Corresponding author:

Alberto J. Sánchez: e-mail: alberthoj.sanchez@gmail.com

To quote as:

Cruz-Ramírez A. K., M. Á. Salcedo, A. J. Sánchez, J. de D. Mendoza, E. Barba, N. Álvarez-Pliego & R. Florido. 2019. Intra-annual variation of chlorophyll-*a* and nutrients in a hydraulically perturbed river-floodplain system in the Grijalva River basin. *Hidrobiológica* 29 (3): 163-170.

Background: The lateral connectivity in the Maluco river-floodplain system was partially reduced by the highway built on a natural barrier. **Goal:** To determine if the concentrations of chlorophyll-*a* (Chl-*a*) and nutrients contrast in different water levels (WL) during a hydrologic year in the Maluco river-floodplain system. **Methods:** The WL, Chl-*a*, and nutrients (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, and TP) were simultaneously measured six times in two sites during two years. The expected differences of Chl-*a* and nutrients concentrations, related to the intra-annual fluctuation of the WL, were tested through multivariate techniques. The hypothesis holds that there will be no intra-annual differences of Chl-*a* and nutrients due to the reduction of lateral interconnection by the physical effect of the embankment. **Results:** No variable was discarded during PCA. The intra-annual distribution of samples was similar according to the similarity profile routine. Furthermore: 1) more than 54% of the Chl-*a* and TP values indicated hypereutrophic conditions throughout the year, and 2) none of the values of WL surpassed the height of the bankfull (4.5 masl). The maximum concentrations of Chl-*a* were registered at the minimum WL values. **Conclusions:** The intra-annual similarity of Chl-*a* and inorganic nutrients can be linked to the disconnection between the floodplain and the Grijalva river since the bankfull was not overflowed throughout the sampling time. The intra-annual trend independent at the time of persistence of the high Chl-*a* and TP concentrations in the river-floodplain system opens up the opportunity to estimate the minimum input flow required to biogeochemical processes in a long-term study.

Key Words: Embankment, eutrophication, fragmentation, Grijalva river, hydraulic disconnection.

RESUMEN

Antecedentes: La interconexión lateral en el sistema río-llanura de inundación Maluco fue reducida parcialmente por una carretera construida sobre una barrera natural. **Objetivo:** Determinar si las concentraciones de clorofila-*a* (Cla-*a*) y nutrientes contrastan en diferentes niveles de agua (NA) durante un año hidrológico en el humedal fluvial. **Métodos:** El NA, Cla-*a* y nutrientes (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ y PT) se midieron simultáneamente seis veces en dos estaciones durante dos años. Las diferencias esperadas de las concentraciones de Cla-*a* y nutrientes, relacionadas a la fluctuación intra-anual del NA, fueron analizadas por medio de técnicas multivariadas. La hipótesis sostiene que no se detectarán diferencias intra-anales de Cla-*a* y nutrientes debido a la reducción de la interconexión lateral por el efecto físico del terraplén. **Resultados:** Ninguna variable fue descartada con el ACP. La distribución intra-anual de las muestras resultó similar según la rutina de perfiles de similitud. Coincidentemente: 1) más del 54% de los valores de Cla-*a* y PT indicaron condiciones hipereutróficas durante todo el año y 2) ninguno de los valores de WL sobrepasó la altura del terraplén (4.5 msnm). Además, las concentraciones máximas de Cla-*a* se registraron en los WL mínimos. **Conclusiones:** La similitud intra-anual de la Cla-*a* y los nutrientes inorgánicos se puede vincular a que la llanura de inundación estuvo desconectada del río Grijalva, ya que la inundación no sobrepasó la altura del terraplén durante todo el tiempo de muestreo. La tendencia intra-anual independiente al tiempo de la persistencia de las altas concentraciones de Cla-*a* y PT en el sistema río-llanura de inundación abre la oportunidad de estimar el caudal de entrada mínimo requerido para restaurar los procesos biogeoquímicos en un estudio a largo plazo.

Palabras Clave: Bordo, desconexión hidráulica, eutrofización, fragmentación, río Grijalva.

INTRODUCTION

In riverine wetlands, the intra-annual distribution patterns of the concentration of physicochemical variables in the water column differ mainly between the low and high water level conditions, whose surface hydraulic interconnection maintains its natural flow (Brinson, 1993; Junk & Wantzen, 2004; Thomaz *et al.*, 2007). In this way, the values of chlorophyll-*a* (Chl-*a*) and nutrients are influenced by the lateral exchange of water due to temporal flooding, residence times and inputs of organic matter by runoff (Tubatsi *et al.*, 2014; Fritz *et al.*, 2018). For example, the increase of algal biomass has been frequently recorded during the low water level (WL) condition (Brito *et al.*, 2014; Roach *et al.*, 2014; Cruz-Ramírez *et al.*, 2019). On the contrary, its decrement has been recorded in conditions of high WL (for example, Noe *et al.*, 2013) since its fluctuation has been linked to the flood pulse that allows the dispersion of the planktonic community in areas with seasonal inundation (Junk & Wantzen, 2004; Noe *et al.*, 2013). Moreover, the enrichment in nitrogen and phosphorus has been indistinctly mentioned as a dominant abiotic processes tied to the spatial-temporal variability in the WL of the river-floodplain systems (for example, Brito *et al.*, 2014; Tubatsi *et al.*, 2014; Cruz-Ramírez *et al.*, 2019).

However, the high variability of the concentrations of nutrients in short times regarding the inter-annual fluctuation of the WL can enhance the eutrophication (carbon, nitrogen, phosphorus), which in turn increase the phytoplankton biomass (Dodds, 2007; Cruz-Ramírez *et al.*, 2019). Additionally, wastewater discharges, diffuse input of agricultural nutrients, runoffs and hydraulic disconnection are other causes associated with the enhancement of nutrients in river-floodplain systems (Cetin 2009; Sharma *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012; Jeppesen *et al.*, 2015; Lázaro-Vázquez *et al.*, 2018).

Frequently, the hydraulic disconnection has been related to physical obstruction by infrastructure constructed for different purposes. The infrastructure built to store water or prevents floods as well as the urban sprawl has been the main anthropogenic causes that have impaired the natural variations in the WL in perturbed river-floodplain system (Poff *et al.*, 2007). For instance, the reduction of the flow referential values, as well as changes to water quality in rivers was associated with a South Africa impoundment (Mantel *et al.*, 2010). Moreover, the construction of roads and levees has caused hydraulic disconnection between the river and its flood area in USA (Coffin, 2007; Blanton & Marcus, 2009), which in turn has originated a decrement of the natural variation of the WL linked to the increment of the concentration of nutrients and eutrophication (Jeppesen *et al.*, 2015).

The Maluco river-floodplain system was temporally interconnected with the Grijalva River until the early 80's, when its hydraulic interconnection was drastically reduced from three to one storm drains placed under the highway, which was built on a natural barrier (Gil & Saenz, 1872). Since this time, the highway has worked as an embankment that has restricted the lateral connection, due to that the bankfull stage was heightened up to 4.5 m above the sea level. Although, the construction of channels and embankments has been the most common public policy to avoid inundations in the cities located in the floodplain of the Grijalva Basin (Sánchez *et al.*, 2015), there are no environmental data available on the Maluco river-floodplain system before the 80's to corroborate the magnitude of the awaited environmental impacts by the restriction of the hydraulic interconnection.

The reduction of lateral interconnection due to the physical effect of the embankment reduces the probability that the Grijalva River has overflowed above the bankfull stage, which opens the hypothesis that there will be no intra-annual differences of Chl-*a* and nutrients. To test the hypothesis, the concentrations of Chl-*a*, nitrogen and phosphate nutrients were measured at different WLs of a hydrological year over a 2-year period in the Maluco river-floodplain system.

METHODS AND MATERIALS

Study area. The Maluco river-floodplain system is located in the floodplain of the Grijalva Basin. The Grijalva River is originated 17.6 km upstream the study area, where the dammed Mezcalapa-Carrizal and the free-flowing Sierra-Pichucalco rivers merge. The Mezcalapa-Carrizal Rivers have four dams built in the mountains of the Grijalva Basin, which stored up to 26,081 mm³ at the ordinary high WL (Navarro & Toledo, 2008). Both rivers drain an average 17,364.17 mm³/y downriver (DOF, 2018). Whereas, the Sierra-Pichucalco Rivers drain an average 3,186.76 mm³/y (DOF, 2018) before merging to the Mezcalapa-Carrizal River. In the study area (1,580.4 ha) *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Pistia stratiotes* L., *Nymphaea ampla* (Salisb.) DC., *Thalia geniculata* L. and *Typha domingensis* Pers. are the recorded aquatic macrophytes. The adjacent lands of the lagoon are used for growing crops and raising livestock (Palma-López *et al.*, 2007). As was mentioned above, the lateral exchange of water in the Maluco river-floodplain system was restricted by a highway built in the early 80's.

The Maluco river-floodplain system is located 23 km downstream from the Metropolitan Area of Villahermosa city with a population of 755,425 inhabitants and 77 sewage discharge points. These 77 sites drain 282 Mm³/y into the Grijalva river and nearby wetlands, of which 18% have limited or no treatment (INEGI, 2011; 2012).

Sampling design. The Maluco river-floodplain system was sampled bimonthly during two hydrological years (2004 and 2005) to measure the intra-annual variation of average WL (Fig. 1). Two sites (18° 05' 24.49" N, 92° 45' 34.30" W and 18° 05' 22.47" N, 92° 45' 10.45" W) were simultaneously sampled in six sampling times (Fig. 2), which summed a total of 24 records per physicochemical or biological variable. On each occasion the WL (m) was measured by a depth sounder (PS-7). The maximum WL in the wetland (13 m) was referenced at 4.5 m above sea level (masl), which is equal to the altitude of the embankment. Water samples were also collected at the medium depth with a van Dorn bottle and stored at 4° C for laboratory analysis. Nitrite (NO₂⁻), nitrate (NO₃⁻), ammonium (NH₄⁺) and total phosphorus (TP) concentrations in mgL⁻¹ were determined according to APHA (1998) procedures; whereas, Chl-*a* (µg⁻¹) analyses were done immediately following the recommendations of SCOR-UNESCO (1966).

Data analysis. The intra-annual variation of the physicochemical variables (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, TP and, Chl-*a*) among the six sampling times was analyzed through a Principal Components Analysis (PCA). The PCA was based on a correlation matrix, and the dissimilarities were calculated based in the Euclidean distance after standardization of the five original variables (Legendre & Legendre, 2003). Additionally, the principal components (PC) with eigenvalues >1 (Kaiser-Guttman criterion) and significant variation (Bartlett; p<0.05) were selected (Legendre & Legendre, 2003). Then, the variables with absolute values in the eigenvectors greater than |0.4| and by having significant contributions

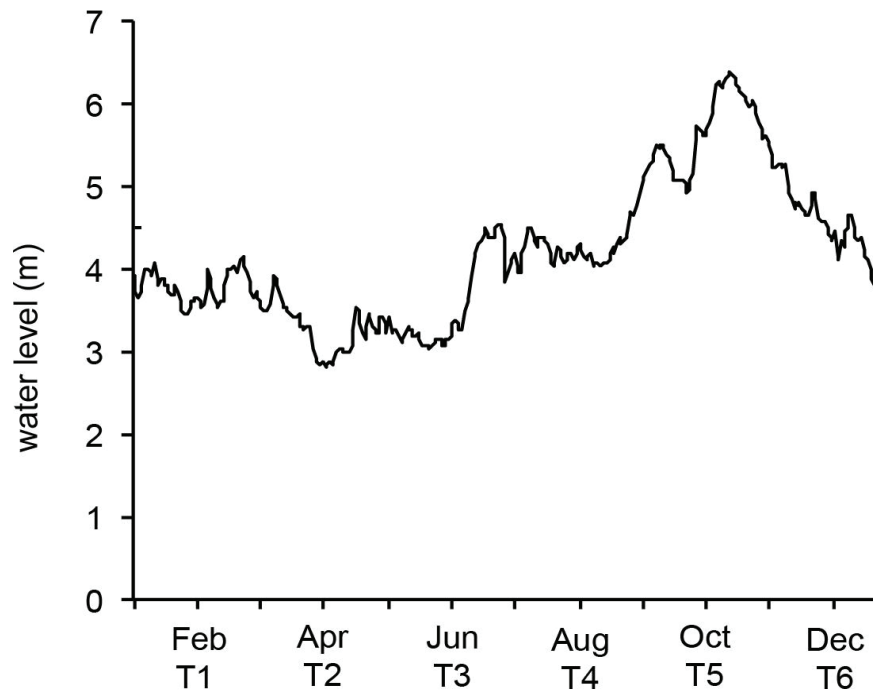


Figure 1. Intra-annual variation of average water level of Grijalva River from 1995 until 1999 in the 30083 hydrometric station in the Grijalva River. Black line= water level, T= sampling times. Data source: CONAGUA (2012).

were considered in the selected PC's (Weilhoefer *et al.*, 2008). These analyses were carried out with the JMP v10 Software (SAS Institute, 2012). Before the PCA calculation, the correlation coefficients ($>|0.3|$) and the determinant of the correlation matrix (0.325) were used to find the collinearity among the five variables analyzed. The multicollinearity was reviewed by means of Bartlett's test of sphericity ($p=0.011$) and the Kaiser-Meyer-Olkin test (0.523), since the variables showed a medium degree of inter-correlation (Tabachnick & Fidell 2014). The last four analyses were carried out through the IBM SPSS Statistics software v24 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Finally, the similarity profile routine (SIMPROF) was used to determine the possible significant differences among the groups. The SIMPROF was applied with a significant level of $p<0.05$ (Clarke *et al.*, 2008) through the program PRIMER v6.1.6 (Clarke & Gorley 2006). The interpretation of the variables selected was complemented by the calculation of the mean, standard deviation and error of each sampling time (four data by sampling time).

RESULTS

No variable was discarded during PCA. The PC1 (eigenvalue= 2.101) explained 42% of the significantly variation in the riverine wetland (Bartlett; $p=0.006$). In this first axis (PC1), Chl-*a* (0.567), NH_4^+ (0.502), and NO_3^- (0.497) were positively associated, while NO_2^- (-0.402) was negatively associated. Whereas, the PC2 (eigenvalue=1.265) described 25.3 % of the variation, but it was not significant (Bartlett; $p=0.15$). This second axis showed a positive relationship with NH_4^+ (0.463) and negative with TP (-0.738).

The analysis of the distribution of samples indicated an intra-annual similarity (SIMPROF; $p=0.149$) since 100% of samples were grouped (Fig. 3). The second and third sampling times presented the highest concentrations of Chl-*a*, NH_4^+ , and NO_3^- . Indeed, in the CP1, the low percentage of the explained variation was associated with the minimal dispersion of the samples with the time.

It stands out that 54% of the total of Chl-*a* records exceeded $25 \mu\text{gL}^{-1}$, up to a maximum concentration of $208 \mu\text{gL}^{-1}$ (Fig. 4). However, their concentrations showed a tendency to be higher during the first three sampling times (Fig. 4). Likewise, 66.7 % of the total TP concentrations were greater than or equal to 0.1 mgL^{-1} , although the two maximum concentrations ($> 1 \text{ mgL}^{-1}$) were measured in the fifth sampling time (Fig. 4). The 25% of NH_4^+ concentrations were greater than or equal 1 mgL^{-1} , while only the 4.2% of the NO_3^- values exceeded this value (Supplement 1). NH_4^+ values greater than 1 mgL^{-1} were quantified in four of the six sampling times (2, 3, 5 and 6). Instead, NO_3^- concentrations only surpassed 1 mgL^{-1} in the second sampling (Supplement 1). Finally, none of the NO_2^- values exceeded 1 mgL^{-1} , and they recorded similarity among the six times (Supplement 1).

The maximum values of WL were lower than the overflow level of the bankfull stage, which was estimated at 13 m (Supplement 1). Although higher concentrations of Chl-*a*, and TP were recorded throughout the study time, the highest values of Chl-*a*, NO_3^- and NH_4^+ coincided with the minimum values of WL, quantified in the 2 and 3 sampling times (Fig 4).

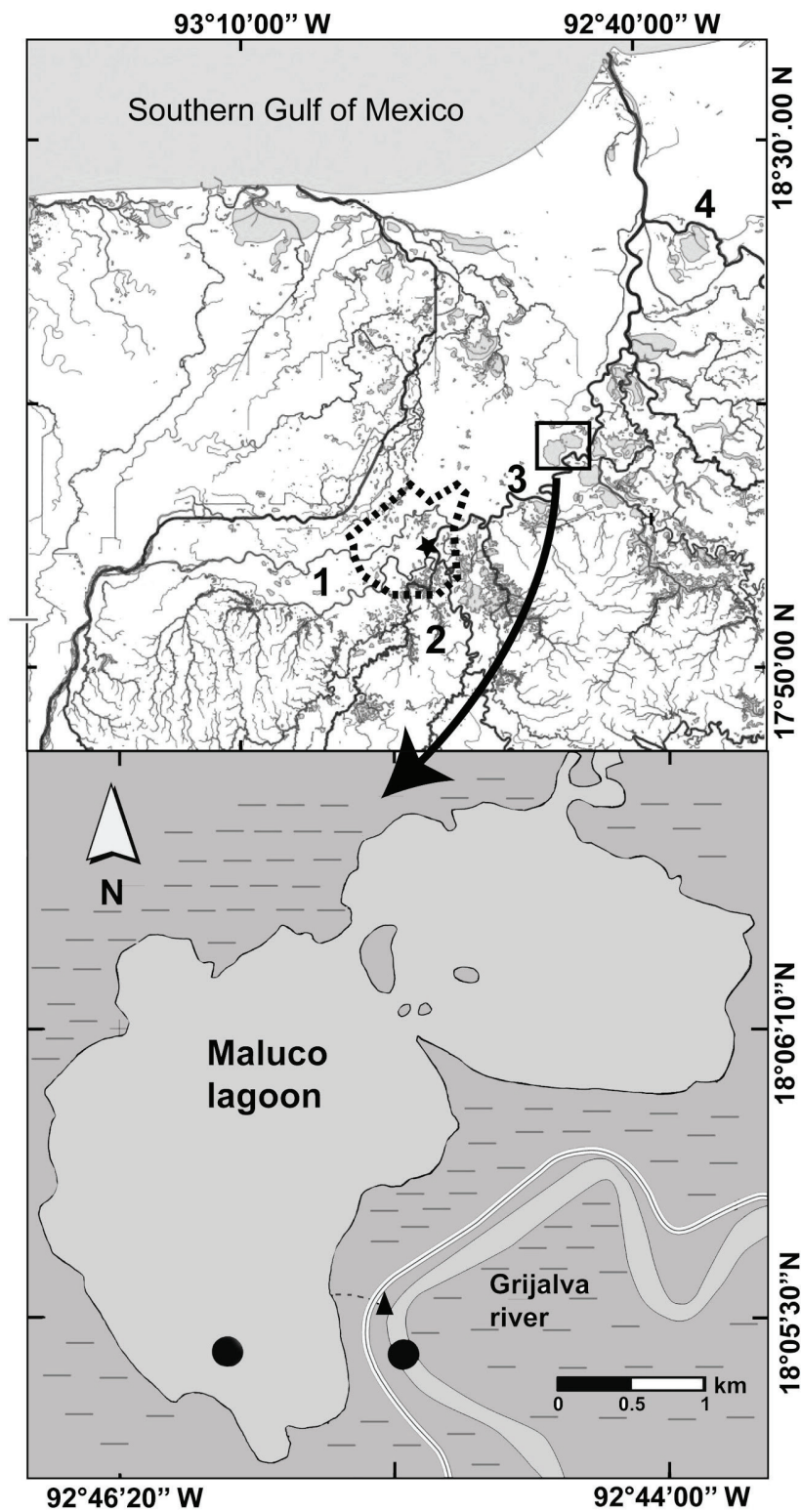


Figure 2. Location of study area. Embankment= , floodplain= , Metropolitan Area of Villahermosa= , hydrometric station= black star, sampling sites in the river-floodplain system= black circle. Map modified from http://antares.inegi.org.mx/analisis/red_hidro/SIATL/# (INEGI, 2013).

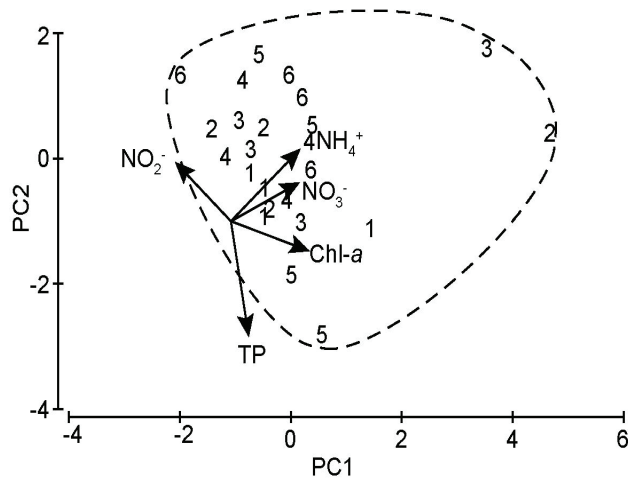


Figure 3. PCA bi-plot of the first two components synthesizing the data of the Chlorophyll-*a* (Chl-*a*), Nitrite (NO_2^-), Nitrate (NO_3^-), Ammonium (NH_4^+) and total Phosphorus (TP) at the Maluco river-floodplain system. The samples are classified by intra-annual sampling times (1-6). Dashed line=group.

DISCUSSION

The lack of the intra-annual variation of physicochemical and biological water variables in the Maluco river-floodplain system has also been reported for other hydraulic altered river-floodplain systems (Jeppesen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019). In the study area, the maximum concentrations of Chl-*a* occurred during the first three times, but all their values surpassed the hypereutrophic reference value ($\geq 25 \mu\text{gL}^{-1}$), according to OECD (1982), throughout the hydrological year (Supplement 1). Also, the nitrogen nutrients levels were below 1 mgL^{-1} throughout the six times sampled (Supplement 1) which is the reference inorganic enrichment value (Wilde *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015). Therefore, the intra-annual similarity among the concentrations of Chl-*a*, nutrients and water level can be related to two years of hydraulic disconnection between the Grijalva river and the Maluco floodplain due to the fact that maximum WL measured values ($\leq 12 \text{ m}$) promoted the persistence of the hypereutrophic conditions, since the overflow of the bankfull would begin when the Grijalva river reaches 13 m of WL. Likewise, the persistence in time of the hypereutrophic conditions (Chl-*a* and TP) in the Maluco river-floodplain system agree with other results in hydraulically altered river-floodplain systems (Pinilla, 2010; Reckendorfer *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019), or with different interannual times of hydraulic connection (McKinney & Charpentier, 2009). Instead, the variation of Chl-*a* and nutrients in non-perturbed river-floodplain systems differed significantly in relation to WL, mainly between low and high water level (Brito *et al.*, 2014; Tubatsi *et al.*, 2014; Roach *et al.*, 2014; Cruz-Ramírez *et al.*, 2019). Indeed, the maintenance of the water connectivity conditions, natural flow cycles, and flood pulses is indispensable to keep the biogeochemical processes that maintain the ecological functions and services provided by the river-floodplain systems (Junk & Wantzen, 2004; Marton *et al.*, 2015).

In the Maluco river-floodplain system, the highest values of TP in time could be better explained by the wide fluctuation of its inputs throughout the rivers, as has been registered for others riverine ecosystems (Jarvie *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2016). In the case of the Gri-

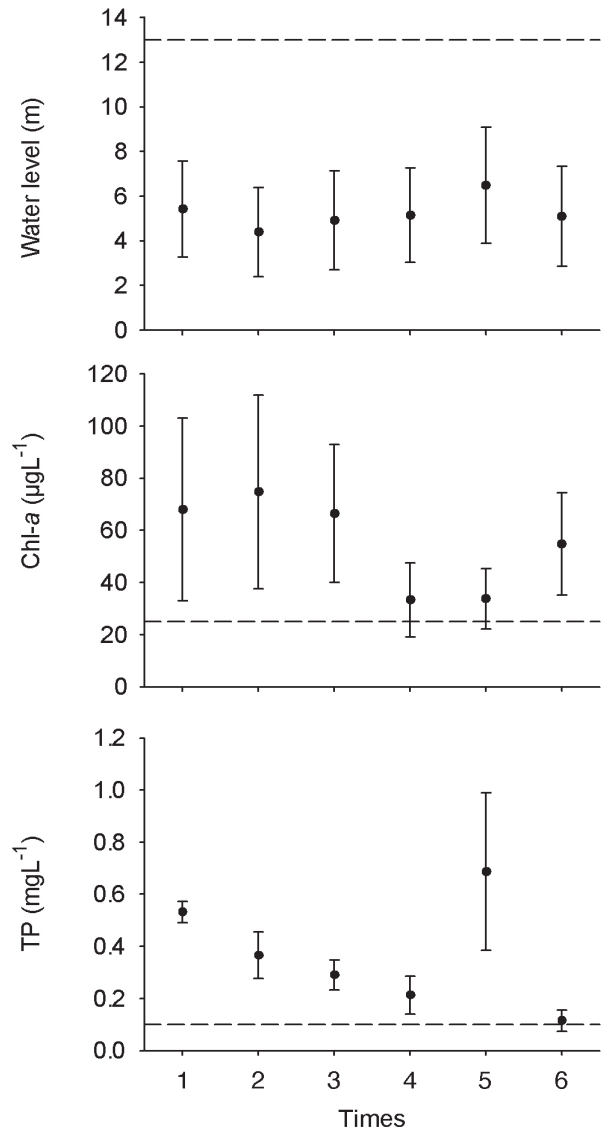


Figure 4. Mean and standard error of water level (WL), Chlorophyll-*a* (Chl-*a*), total Phosphorus (TP) in the Maluco river-floodplain system. Dashed lines are the limit to define a condition: bankfull stage = 13 m, hypereutrophic condition of Chl-*a* = $25 \mu\text{gL}^{-1}$ and TP = 0.1 mgL^{-1} (OECD, 1982).

jalva floodplain, the TP concentrations increased significantly during the high water level in sites surrounded by extensive suburban areas (Lázaro-Vázquez *et al.*, 2018). They related the increment of TP to the wastewater discharges, which were mainly caused by the expansion of agricultural areas and growth of human populations.

The restriction of the hydraulic connectivity by the construction of embankments and roads has also been linked to eutrophication processes (Coffin, 2007; Reckendorfer *et al.*, 2013). In this sense, the river-floodplain system in this study kept a hypereutrophic condition independent of the time since all Chl-*a* and TP concentrations were greater than or equal to $25 \mu\text{gL}^{-1}$ and 0.1 mgL^{-1} , respectively. Both concentrations correspond to hypereutrophic conditions according to OECD (1982).

The additional input of wastewater without treatment intensifies the hypereutrophic processes in aquatic ecosystems isolated hydraulically (Jeppesen *et al.*, 2015). In hydraulically perturbed river-floodplain systems, the reduction of the natural fluctuation in the water levels, combined with a probable low rate nutrient assimilation by primary producers, contributes to exacerbate the eutrophication (Pinilla 2010; Reckendorfer *et al.*, 2013; Jeppesen *et al.*, 2015; Salk *et al.*, 2018). Therefore, the almost permanent hypereutrophic conditions registered in the Maluco river-floodplain system can be linked to the combined effect of the hydraulic disconnection, inputs of wastewater without treatment and shallowness of the ecosystem. However, this rationale will need to be demonstrated for the study area.

In conclusion, the current WL fluctuation in the Maluco river-floodplain system is insufficient to allow the often-recorded intra-annual variation between physicochemical variables and water levels in inter-connected river-floodplain systems. The condition of hydraulic isolation helps to explain the intra-annual similarity of Chl-*a* and nutrients, the maximum WL values in the study area were lesser than the height (4.5 masl or 13 m) of the bankfull stage, and the persistence of hypereutrophic conditions linked to the Chl-*a* and TP enhancement. This persistence of time-independent hypereutrophic conditions may be a hypothesis to be tested by estimating the minimum input flow of water needed to restore the biogeochemical processes in the Maluco river-floodplain system.

ACKNOWLEDGMENTS

To Peter B. Bayley for their helpful comments to improve the manuscript. The data come from the project S.G.P.A.-DGIRA-DIA01027/03 funded by Gobierno del Estado de Tabasco and CONAGUA.

REFERENCES

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC. 1220 p.
- BLANTON, P. & W. A. MARCUS. 2009. Railroads, roads and lateral disconnection in the river landscapes of the continental United States. *Geomorphology* 112: 212-227. DOI: 10.1016/j.geomorph.2009.06.008
- BRINSON, M. M. 1993. *A hydrogeomorphic classification for wetland*. U.S. Army Corps of Engineers Waterways Experiment Station. Technical Report WRP-DE-4. U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station. Vicksburg, MS. 101 p.
- BRITO, J. G., L. F. ALVES & H. M. V. ESPIRITO SANTO. 2014. Seasonal and spatial variations in limnological conditions of a floodplain lake (lake Catalão) connected to both the Solimões and Negro Rivers, Central Amazonia. *Acta Amazonica* 44 (1): 121-133. DOI: 10.1590/S0044-59672014000100012
- CETIN, M. 2009. A satellite based assessment of the impact of urban expansion around a lagoon. *International Journal of Environmental Science and Technology* 6 (4): 579-590.
- CLARKE, K.R. & R.N. GORLEY. 2006 PRIMER v6: User manual/tutorial, Plymouth UK. 190 p.
- CLARKE, K. R., P. J. SOMERFIELD & R. N. GORLEY. 2008. Testing of null hypotheses in exploratory community analyses: similarity profiles and biota-environment linkage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366:56-69. DOI: 10.1016/j.jembe.2008.07.009
- COFFIN, A. W. 2007. From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. *Journal of Transport Geography* 15: 396-406. DOI: 10.1016/j.jtrangeo.2006.11.006
- CONAGUA (COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA). 2012. *Banco Nacional de Datos de Aguas Superficiales*. Comisión Nacional del Agua. Available online at: <https://app.conagua.gob.mx/bandas/> (downloaded May 14, 2018)
- CRUZ-RAMÍREZ, A. K., M. Á. SALCEDO, A. J. SÁNCHEZ, E. BARBA-MACÍAS & J. D. MENDOZA-PALACIOS. 2019. Relationship among physicochemical conditions, chlorophyll-*a* concentration, and water level in a tropical river-floodplain system. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 3869-3876. DOI: 10.1007/s13762-018-2127-7
- DE WILDE, M., S. PUJALON, F. VALLIER & G. BORNETTE. 2015. Physico-chemical consequences of water-level decreases in wetlands. *Wetlands* 35: 683-694. <https://doi.org/10.1007/s13157-015-0658-y>
- DODDS, W. K. 2007. Trophic state, eutrophication and nutrient criteria in streams. *Trends in Ecology and Evolution* 22(12): 669-676. DOI: 10.1016/j.tree.2007.07.010
- DOF (DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN). 2018. Acuerdo por el que se dan a conocer los resultados del estudio técnico de las aguas nacionales superficiales en las cuencas hidrológicas Lagartero, Yahahuita, Zacuapala, Papizaca, Presa La Concordia, Selegua, San Miguel, La Concordia, Aguacatenco, Aguzarca, San Pedro, Grande o Salinas, Presa La Angostura, Hondo, Tuxtla Gutiérrez, Suchiapa, Santo Domingo, Presa Chicoasén, Chicoasén, Encajonado, Cintalapa, Soyatenco, Alto Grijalva, De La Venta, Chapopote, Presa Nezahualcóyotl, Tzim-bac, Zayula, Presa Peñitas, Paredón, Platanar, Mezcalapa, El Carrizal, Tabasquillo, Cunduacán, Samaría, Caxcuchapa, Basca, Yashijá, Shumulá, Puxcatán, Chacté, De los Plátanos, Tulijá, Macuxpana, Almendro, Chilapa, Tacotalpa, Chilapilla, De la Sierra, Pichucalco, Viejo Mezcalapa, Azul, Tzaconeja, Perlas, Comitán, Margaritas, Jatate, Ixcán, Chajul, Lacanjá, San Pedro, Laguna Miramar, Euseba, Caliente, Seco, Santo Domingo, Lacantún, San Pedro, Chixoy, Chocaljah, Chacamax, Usumacinta, Grijalva, Palizada, San Pedro y San Pablo, Laguna del Este, Laguna de Términos, Mamatel, Cumpan y Laguna del Pom y Atasta, pertenecientes a la Región Hidrológica número 30 Grijalva-Usumacinta. 2018, 10 de abril. *Edición Matutina. Tercera sección, Poder Ejecutivo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*. México. Available online at: <http://www.dof.gob.mx/index.php?year=2018&month=04&day=10> (downloaded January 10, 2011)
- FRITZ K. M., K. A. SCHOFIELD, L. C. ALEXANDER, M. G. McMANUS, H. E. GOLDEN, C. R. LANE, W. G. KEPNER, S. D. LEDUC, J. E. DEMEESTER & A. I. POLLARD. 2018. Physical and chemical connectivity of streams and riparian wetlands to downstream waters: A synthesis. *Journal of the American Water Resources Association* 54(2): 323-345. DOI: 10.1111/1752-1688.12632

- GIL Y SAENZ, M. 1872. *Compendio histórico, geográfico y estadístico del Estado de Tabasco*. Tipografía de José M. Abalos, Tabasco. 252 p. Also available at: <http://bibliotecadigital.tabasco.gob.mx/items/show/19473>
- GUAN, Q., L. WANG, F. WANG, B. PAN, N. SONG, F. LI & M. LU. 2016. Phosphorus in the catchment of high sediment load river: A case of the Yellow River, China. *Science of The Total Environment* 572: 660-670. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.125
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA). 2011. *Anuario estadístico de Tabasco 2011*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Gobierno del Estado de Tabasco. Tabasco. Available online at: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee11/estatal/tab/default.htm> (downloaded July 4, 2012).
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA). 2012. *Delimitación de las Zonas Metropolitanas de México 2010*. Secretaria de Desarrollo Social. Consejo Nacional de Población. México. 216 p.
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA). 2013. Simulador de Flujos de Agua de Cuencas Hidrográficas versión: 3.2. Available online at: http://antares.inegi.org.mx/analisis/red_hidro/siatl/# (downloaded June 18, 2018)
- JARVIE, H. P., M. D. JÜRGENS, R. J. WILLIAMS, C. NEAL, J. J. L. DAVIES, C. BARRETT & J. WHITE. 2005. Role of riverbed sediments as sources and sinks of phosphorus across two major eutrophic UK river basins: The Hampshire Avon and Herefordshire Wye. *Journal of Hydrology* 304: 51-74. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2004.10.002
- JEPPESEN, E., S. BRUCET, L. NASELLI-FLORES, E. PAPASTERGIADOU, K. STEFANIDIS, T. NÖGES, P. NÖGES, J. L. ATTAYDE, T. ZOHARY, J. COPPENS, T. BUCAK, R. F. MENEZES, F. R. S. FREITAS, M. KERNAN, M. SØNDERGAARD & M. BEKLIÖ-LU. 2015. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. *Hydrobiologia* 750: 201-227. DOI: 10.1007/s10750-014-2169-x
- JUNK, W. J. & K. M. WANTZEN. 2004. The flood pulse concept: New aspects, approaches, and applications-an update. *In: Welcomme, R. L. & T. Petr (eds.). Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries, Vol. 2*. Food and Agriculture Organization & Mekong River Commission. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok. RAP Publication 2004/16. pp. 117-149.
- LÁZARO-VÁZQUEZ, A., M. M. CASTILLO, A. JARQUÍN-SÁNCHEZ, L. CARRILLO & K. A. CAPPIS. 2018. Temporal changes in the hydrology and nutrient concentrations of a large tropical river: Anthropogenic influence in the Lower Grijalva River, Mexico. *River Research and Applications* 34: 649-660. DOI: 10.1002/rra.3301
- LEGENDRE, P. & L. LEGENDRE. 2003. *Numerical Ecology*. 2nd ed. Elsevier Science. Amsterdam. 853 p.
- LI, Y., Q. ZHANG, Y. CAI, Z. TAN, H. WU, X. LIU & J. YAO. 2019. Hydrodynamic investigation of surface hydrological connectivity and its effects on the water quality of seasonal lakes: Insights from a complex floodplain setting (Poyang Lake, China). *Science of the Total Environment* 660: 245-259. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.015
- MANTEL, S. K., D. A. HUGHES & N. W. J. MULLER. 2010. Ecological impacts of small dams on South African rivers Part 1: drivers of change - water quantity and quality. *Water SA* 36(3): 351-360.
- McKINNEY, R. A. & M. A., CHARPENTIER. 2009. Extent, properties, and landscape setting of geographically isolated wetlands in urban southern New England watersheds. *Wetlands Ecology and Management* 17(4): 331-344. DOI: 10.1007/s11273-008-9110-x
- MARTON, J. M., I. F. CREED, D. B. LEWIS, C. R. LANE, N. B. BASU, J. C. MATTHEW, & B. C. CRAFT. 2015. Geographically isolated wetlands are important biogeochemical reactors on the landscape. *BioScience* 65(4): 408-418. DOI: 10.1093/biosci/biv009
- NAVARRO, J. M. & H. TOLEDO. 2008. Transformación de la cuenca del río Grijalva. *Revista Noticias AMIP* 4(16): 11-22.
- NOE, G. B., C. R. HUPP & N. B. RYBICKI. 2013. Hydrogeomorphology influences soil nitrogen and phosphorus mineralization in floodplain wetlands. *Ecosystems* 16: 75-94. DOI: 10.1007/s10021-012-9597-0
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). 1982. *Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. 154 p.
- PALMA-LÓPEZ, D. J., J. CISNEROS, E. MORENO & J.A. RINCÓN-RAMÍREZ. 2007. *Suelos de Tabasco: su uso y manejo sustentable*. Colegio de postgraduados - ISPROTAB - Fundación Produce Tabasco, Tabasco. 199 p.
- PINILLA G. 2010. An index of limnological conditions for urban wetlands of Bogotá city, Colombia. *Ecological Indicators* 10: 848-856. DOI: 10.1016/j.ecolind.2010.01.006
- POFF, N. L., J. D. OLDEN, D. M. MERRITT & D. M. PEPIN. 2007. Homogenization of regional river dynamics by dams and global biodiversity implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(14): 5732-5737. DOI: 10.1073/pnas.0609812104
- RECKENDORFER, W., A. FUNK, C. GSCHÖPF, T. HEIN & F. SCHIEMER. 2013. Aquatic ecosystem functions of an isolated floodplain and their implications for flood retention and management. *Journal of Applied Ecology* 50: 119-128. DOI: 10.1111/1365-2664.12029
- ROACH, K. A., K. O. WINEMILLER & S. E. DAVIS III. 2014. Autochthonous production in shallow littoral zones of five floodplain rivers: effects of flow, turbidity and nutrients. *Freshwater Biology* 59: 1278-1293. DOI: 10.1111/fwb.12347
- SALK K. R., G. S. BULLERJAHN, R. M. L. MCKAY, J.D. CHAFFIN & N. E. OSTROM. 2018. Nitrogen cycling in Sandusky, Bay Lake Erie: oscillations between strong and weak export and implications for harmful algal blooms. *Biogeosciences* 15: 2891-2907 DOI: 10.5194/bg-15-2891-2018
- SÁNCHEZ, A. J., M. A. SALCEDO, A. A. MACOSSAY-CÓRTEZ, Y. FERÍA-DÍAZ, L. VÁZQUEZ, N. OVANDO & L. ROSADO. 2012. Calidad ambiental de la laguna urbana La Pólvora en la cuenca del Río Grijalva. *Tecnología y Ciencias del Agua* 3(3): 143-152.
- SÁNCHEZ, A. J., M. A. SALCEDO, R. FLORIDO, J. D. MENDOZA, V. RUIZ-CARRERA & N. ÁLVAREZ-PLIEGO. 2015. Ciclos de inundación y conservación de servicios ambientales en la cuenca baja de los ríos Grijalva-Usumacinta. *ContactoS* 97: 5-14

- SAS INSTITUTE. 2012. *JMP Statistics and Graphics Guide. V 10*. SAS Institute Inc, North Carolina
- SCOR-UNESCO. 1966. *Determination of photosynthetic pigments in seawater*. Monographs on Oceanographic Methodology. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris. 69 p.
- SHARMA, M. P., A. KUMAR & S. RAJVANSHI. 2010. Assessment of Trophic State of Lakes: A Case of Mansi Ganga Lake in India. *Hydro Nepal* 6: 65-72. DOI: 10.3126/hn.v6i0.4198
- TABACHNICK, B. & L. FIDELL. 2014. *Using multivariate statistics*. 6th ed. Pearson Education. United Kingdom. 1056 p.
- THOMAZ, S. M., L. M. BINI & R. L. BOZELLI. 2007. Floods increase similarity among aquatic habitats in rivers-floodplain systems. *Hydrobiologia* 579: 1-13. DOI: 10.1007/s10750-006-0285-y
- TUBATSI, G., M. C. BONYONGO & M. GONDWE. 2014. Water quality dynamics in the Boro-Thamalakane-Boteti river system, northern Botswana. *African Journal of Aquatic Science* 39(4): 351-360. DOI: 10.2989/16085914.2014.960791
- WEILHOFER, CH. L., P. YANGDONG & S. EPPARD 2008. The effects of river floodwaters on floodplain wetland water quality and diatom assemblages. *Wetlands* 28(2): 473-486. DOI: 10.1672/07-114.1
- ZHU, Q. D., J. H. SUN, G. F. HUA, J. H. WANG & H. WANG. 2015. Runoff characteristics and non-point source pollution analysis in the Taihu Lake Basin: a case study of the town of Xueyan, China. *Environmental Science and Pollution Research* 22(19): 15029-15036. DOI:10.1007/s11356-015-4709-y

Caracterización y mejoramiento de la harina de *Cannavalia ensiformis* como alimento balanceado para *Oreochromis niloticus*

Characterization and improvement of *Cannavalia ensiformis* meal as balanced feed for *Oreochromis niloticus*

Fanny Janet de la Cruz-Alvarado¹, Carlos Alfonso Álvarez-González^{1*}, Héctor Nolasco-Soria², Rafael Martínez-García^{1*}, José Manuel Piña-Gutiérrez¹, Bartolo Concha-Frías¹, Carlos Alfonso Frías-Quintana³ y Emyr Peña^{1,4}

Recibido: 01 de febrero de 2019.

Aceptado: 16 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

RESUMEN

Antecedentes. La leguminosa *Cannavalia ensiformis* es una excelente fuente de energía, proteína, vitaminas y minerales para ser utilizada en la alimentación animal; sin embargo, contiene factores antinutricionales (FAN), que limitan su utilización en la alimentación de peces. **Objetivo.** En este estudio se evaluaron 7 harinas obtenidas de los procesos de hidratación, extracción ácida, decorticado, cocción, germinado, autoclave y desgrasado de las semillas de *C. ensiformis* como medios de eliminación de FAN. **Métodos.** La calidad nutricional de las harinas fueron corroborados con análisis químicos proximales y digestibilidad *in vitro*, determinando el grado de hidrólisis (GH, %) de las harinas de *C. ensiformis* obtenidas mediante pH STAT, se calculó la liberación de aminoácidos totales (AALT, $\mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando extractos multienzimáticos de estómago e intestino de juveniles de *O. niloticus*. **Resultados.** Los valores de GH ácido/alcalino para la harina de *C. ensiformis* cocida fue de $0.76 \pm 0.01\%$ / $6.04 \pm 0.37\%$, siendo significativamente mayor con respecto a las otras harinas. Los valores de AALT ácido/alcalino ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de esta harina cocida (0.02 ± 0.006 / 0.40 ± 0.02) fueron significativamente mayores en la fase alcalina en relación a las otros tratamientos. **Conclusión.** Se detectó que la harina cocida de *C. ensiformis*, permite ser utilizada como fuente de proteína en dietas para *Oreochromis niloticus*.

Palabras clave: *Cannavalia ensiformis*, digestibilidad *in vitro*, harinas procesadas, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Background. The legume *Cannavalia ensiformis* is an excellent source of energy, protein, vitamins and minerals to be used in animal production; however, it contains antinutritional factors (ANF), which limit its use for fishes. **Goals.** In this study 7 flours obtained from the processes of hydration, acid extraction, decorticating, cooking, germination, autoclaving and degreasing of the seeds of *C. ensiformis* were evaluated as means of elimination of ANF. **Methods.** The nutritional values of the meals were corroborated with proximal chemical analysis and *in vitro* digestibility, determining the degree of hydrolysis (GH%) of the flours of *C. ensiformis* obtained by pH STAT, the release of total amino acids (TAAL, $\mu\text{g mL}^{-1}$) was calculated, using multienzymatic extracts of stomach and intestine of *O. niloticus* juveniles. **Results.** The acidic/alkaline GH values for cooked *C. ensiformis* flour were $0.76 \pm 0.01\%$ / $6.04 \pm 0.37\%$, being significantly higher with respect to the other flours. The values of acidic/alkaline TAAL ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of this cooked flour (0.02 ± 0.006 / 0.40 ± 0.02) were significantly higher in the alkaline phase in relation to the other treatments. **Conclusion.** We detected that cooked meal of *C. ensiformis*, allow to be used as a source of protein in diets for *Oreochromis niloticus*.

Keywords: *Cannavalia ensiformis*, *in vitro* digestibility, *Oreochromis niloticus*, processed flours.

¹ Laboratorio de Acuicultura Tropical, DA-CBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 86139. México.

² Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23090. México.

³ División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Nacajuca-Jalpa de Méndez R/a Rivera Alta, Jalpa de Méndez, Tabasco, 86200. México.

⁴ Cátedras, CONACYT

*Corresponding author:

Carlos Alfonso Álvarez-González: e-mail: alvarez_alfonso@hotmail.com, Rafael Martínez-García: e-mail: biologomartinez@hotmail.com

To quote as:

De la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria R. Martínez-García, J. M. Piña-Gutiérrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana & E. Peña. 2019. Characterization and improvement of *Cannavalia ensiformis* meal as balanced feed for *Oreochromis niloticus*. *Hidrobiológica* 29 (3): 171-179.

INTRODUCCIÓN

Cannavalia ensiformis, L. DC. es una leguminosa que destaca por su contenido nutrimental (Sandoval *et al.* 2001), la cual es sumamente resistente a la sequía e inmune a pesticidas (FAO, 2012), el género *Cannavalia* está compuesto por 48 especies, que son originarios de las regiones tropicales donde están ampliamente distribuidas (Fagbenro *et al.* 2007). Su potencial nutricional ha sido bien estudiado en organismos monogástricos, aves de corral (Wyss & Bicjel, 1988; Udedibie, 1990; Udedibie & Nkwocha, 1990) y peces (Martínez-Palacios *et al.* 1988; Akinbiyi, 1992; Abdo De la Parra *et al.* 1998; Osuigwe *et al.* 2002; Fagbenro *et al.* 2007). *C. ensiformis* es una fuente potencial de energía, proteínas, vitaminas y minerales; sin embargo, este enorme potencial nutritivo se ve reducido por factores antinutricionales (FAN), que limitan su utilización en la elaboración de dietas para peces (Martínez-Palacios *et al.* 1988; Abdo de la Parra *et al.* 1998; Osuigwe *et al.* 2002; Fagbenro *et al.* 2007; Akande *et al.* 2010). Para la utilización de esta leguminosa como ingrediente para la alimentación animal se han estudiado diversos procesos de eliminación de FAN, para mejorar su digestibilidad. Asimismo, se han desarrollado métodos para medir la digestibilidad de la proteína contenida en el alimento, como es el método "in vitro" de pH-STAT el cual permite un estudio detallado del proceso de hidrólisis de la proteína durante la digestión a través de la cuantificación de los aminoácidos y péptidos liberados (Dimes & Haard, 1994; Oña *et al.* 2003; Moyano *et al.* 2014), permitiendo evaluar la digestibilidad y selectividad de los ingredientes dietarios (Tacon, 1995; Alarcón *et al.* 2002) que pueden utilizarse en el cultivo de peces. Se han realizados estudios de digestibilidad *in vitro* en especies de peces como *Paralabrax maculatofasciatus*, *Steindachner, 1868*, *Atractosteus spatula*, *Lacepède, 1803*, *Chirostoma estor*, *Jordan, 1880*, *Centropomus undecimalis*, *Bloch, 1792*, *Atractosteus tropicus*, *Gill, 1863* y *Cichlasoma urophthalmus*, Günther, 1862, entre otros (Álvarez-González, 2003; Aguilera *et al.* 2005; Ávalos-Sánchez, 2006; Concha-Frías, 2008; Frías-Quintana *et al.* 2010; Cuenca-Soria *et al.* 2013), que han permitido crear o mejorar sus formulaciones alimenticias. Este estudio se diseñó para evaluar la eliminación de FAN mediante los procesos de hidratación, extracción ácida, decortado, cocción, germinado, autoclave y desgrasado de las semillas de *C. ensiformis*, utilizando análisis químicos proximales y digestibilidad *in vitro* de las harinas obtenidas de estos procesos, con la finalidad de sustituir parcialmente la harina de pasta de soya en dietas de *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se dividió en dos etapas: la primera comprendió la elaboración de las harinas de las semillas de *C. ensiformis* a través de 7 diferentes procesos de eliminación de FAN y la segunda consistió en la determinación de la digestibilidad *in vitro* mediante pH STAT de las harinas obtenidas previamente utilizando extractos enzimáticos digestivos de juveniles de *O. niloticus*.

Etapas 1: Elaboración de las harinas de las semillas de *C. ensiformis*. Las semillas de *C. ensiformis* fueron obtenidas del rancho el Recreo en Teapa, Tabasco, México, cosechadas manualmente y empaquetadas en bolsas de polietileno con capacidad de 10 Kg; para lo cual no se utilizó ningún tratamiento de conservación. Este estudio de procesamiento y análisis proximales fueron realizados en el Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, del Centro de Investi-

gaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, B.C.S. Para los procesos de hidratación, extracción con ácido, decortado, cocido y autoclavado se utilizaron 200 g de semillas de *C. ensiformis* para cada tratamiento. Todos los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

Hidratación. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas con un litro de agua destilada, en agitación constante durante 36 h, con recambio total de agua destilada cada 12 h.

Extracción con ácido. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas en un litro de agua destilada durante 24 h, con un recambio total de agua destilada a las 12 h, finalmente fueron colocadas en una solución de HCl 20 mM por 12 h, todo este proceso se realizó con agitación constante.

Decortado. Las semillas fueron trituradas con un molino mecánico (molino café Braun KSM 2), posteriormente se eliminó la corteza de la semilla y el decortado se almacenó en un recipiente con sellado hermético (Bautista, 2009), para la posterior preparación de la harina.

Cocción. Las semillas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y fueron hidratadas con un litro de agua destilada, durante 12 h a temperatura ambiente, luego se procedió a decantar y lavar con agua destilada. Posteriormente, fueron cocidas a ebullición durante 30 minutos utilizando una relación frijol: agua de 1:5 (Anduaga-Cota *et al.* 2002).

Germinado. Se seleccionaron 100 semillas (SCE), previamente desinfectadas con cloro al 10% por 3 minutos y lavadas en 3 tiempos de un minuto con agua destilada estéril, luego fueron colocadas en papel toalla húmeda dentro de una bolsa plástica, este proceso se realizó en una cámara UV para evitar contaminación por gérmenes. Posteriormente se trasladaron a una incubadora (Binder, modelo BD53-UL) en completa oscuridad por 27°C y 50% de humedad relativa, durante 6 días, las semillas fueron humedecidas con agua destilada estéril cada 24 horas.

Autoclavado. Las semillas fueron colocadas en un colador y sumergidas para hidratación en agua destilada por 3 minutos, seguidamente se retiró el colador y se decantó el agua; las semillas se colocaron en bolsas y expuestas en la autoclave a 121°C 15 lb por pulg², por 30 minutos.

Desgrasado. Se pesaron 2 kg de semillas y se realizó una molienda en un molino industrial (marca Pulvex. S.A. de C.V.), se tamizaron a 500 micras para homogenizar el tamaño de las partículas, acto seguido se pesaron 200 g de harina y fue introducida en un reactor de vidrio de un litro y se agregaron 400 mililitros de éter de petróleo con agitación a 120 RPM en un agitador industrial (MAXQ 3000) durante 2 h. La mezcla se filtró en un dispositivo de succión con la ayuda de una bomba de vacío.

Al final de los ensayos de hidratación, extracción con ácido, cocido, autoclavado, germinado y desgrasado, las muestras fueron lavadas con agua destilada, decantadas y secadas en una estufa (VWR, modelo 1680) a temperatura de 70 °C por 24 h y molidas en un pulverizador PULVEX 200, México, D. F. Posteriormente las harinas se tamizaron a 500 micras y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis según Rivas (2006).

Análisis químico proximal a las harinas procesadas de *C. ensiformis*. Se aplicaron los métodos de la AOAC (1990) para las determinaciones de: a) humedad, determinación por diferencia de peso a 70°C por 24 h; b) proteína cruda, cuantificando la concentración de nitrógeno

con el Método de DUMAS (Equipo Leco FP-528); c) extracto etéreo, usando el método de Soxtec-Avanti, TECATOR; d) fibra cruda, Método de hidrólisis sucesiva (ácido / base) y e) cenizas, determinación por diferencia de peso, previa calcinación a 500° C por 24 h. Se calculó el extracto libre de nitrógeno, por diferencia de 100% con las determinaciones anteriores.

Etapa 2: Digestibilidad in vitro. Los juveniles fueron obtenidos de un lote de reproductores de tilapia del área de reproducción del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las larvas, fueron alimentadas con una dieta comercial hormonada para tilapia con 52% de proteína y 14% de lípidos (El pedregal Silver Cup®, México, Estado de México, Toluca) con una dosis de 60 mg de 17 α -metiltestosterona (MT) Kg de alimento⁻¹, por un periodo de 28 días. Una vez concluido el periodo de masculinización, se les suministró una dieta para tilapia con 45% de proteína y 5% de lípidos (El pedregal Silver Cup®). Los juveniles fueron mantenidos en un sistema de recirculación de agua, durante un periodo de dos semanas adicionales antes de su procesamiento. Los parámetros de la calidad del agua fueron medidos diariamente, se mantuvieron a 29 \pm 1 °C de temperatura, para el oxígeno disuelto (6.3 \pm 0.5 mg l⁻¹) se utilizó un oxímetro YSI 55 (con 138 precisión de 0.1 °C y 0.01 mg l⁻¹, California, USA) y para el pH (7.1 \pm 0.2) se utilizó un potenciómetro (Hanna Instruments, HI 98311, Rhode Island, USA).

Obtención de extractos multienzimáticos. Para estos ensayos se sacrificaron un total de 35 juveniles con una longitud promedio de 21 \pm 3 cm y un peso promedio de 177.25 \pm 4.5 g, que previamente fueron dejados en inanición por un periodo de 48 horas antes de ser sacrificados y pesados antes y después de la evisceración, posteriormente se le extrajo el estómago y el intestino por separado, los cuales fueron triturados con un homogenizador de tejidos (ULTRA TURRAX® IKA T18 Basic). Los extractos del estómago se prepararon en agua destilada ajustando el pH a 3.55 con ácido clorhídrico (0,1 M) y para los extractos del intestino el agua destilada fue ajustada con hidróxido de sodio (0,1 M) a pH de 7.95 a 4 °C. Se utilizó una relación 5:1 (5 ml de agua destilada por g de tejido). La mezcla obtenida fue colocada en tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugada a 12 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue extraído y se les ajustó el pH requerido para cada extracto, luego fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior análisis.

Actividad específica de enzimas estomacales e intestinales. Con el fin de conocer la cantidad de unidades de proteasa ácida en el extracto estomacal, se utilizó el método de Anson (1938), con las siguientes modificaciones: a 1 ml de hemoglobina (1 %) en tampón 0,1 M glicina - HCl a pH 2 y se le añadieron 5 μ l de extracto enzimático de estómago de *O. niloticus*. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 37 °C y la reacción se detuvo por adición de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Después se dejó reposar la mezcla de reacción (15 a 30 minutos), se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. En el sobrenadante, se midió la cantidad de equivalentes de tirosina liberados (ABS_{280nm}) mediante un espectrofotómetro uv/visible. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ g de tirosina por minuto. Para determinar el coeficiente de extinción molar de la tirosina, se realizó un recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (0 a 300 μ g ml⁻¹). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para determinar la actividad de las proteasas intestinales se utilizó el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984), usando como

sustrato caseína al 1% en tampón 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ a pH 9. Se agregó 0,5 ml de caseína, más 0,5 ml de tampón Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM, pH 9 y 10 μ l de extracto enzimático del intestino y se incubó por 10 minutos, la reacción se detuvo con 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos y se determinó la cantidad de equivalentes de tirosina liberados según el protocolo descrito en el apartado anterior.

Evaluación de la digestibilidad in vitro ácida y alcalina en pH Stat.

Un total de 7 harinas de *C. ensiformis* como ingredientes proteínicos de origen vegetal (Tabla 1) fueron expuestas a degradación enzimática en un sistema pH Stat Titrande (Metrohm 902 Suiza), de acuerdo a Saunders *et al.* (1972), modificado por Dimes & Haard (1994), para evaluar su grado de hidrólisis (GH, %). Los ensayos de digestión ácida se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de reacción. Cada ingrediente de prueba se resuspendió en agua destilada a una concentración de 8 mg de proteína mL⁻¹ en un vaso de 20 mL, ajustando el pH a 3.5 con HCl 0.1 N para proteasas ácidas, a esta mezcla se le agregaron 189 μ l (10 U mL⁻¹ de mezcla de reacción) de la preparación enzimática a pH 3 manteniendo la mezcla de reacción en agitación continua (500 rpm) a 37 °C durante 15 minutos. Se utilizó a la hemoglobina como ingrediente de referencia. De la misma forma se realizó la digestión alcalina, para lo cual se ajustó el pH a 7.9 con NaOH 0.1N y se le agregaron 263 μ l (100 U mL⁻¹ de mezcla de reacción) de extracto enzimático a pH 8 manteniendo en agitación continua (500 RPM) a 37 °C durante 45 minutos y se utilizó caseína como ingrediente de referencia. Se tomaron muestras de 20 μ l del vaso de reacción: en la fase ácida cada 100 s hasta los 900 s y en la fase alcalina cada 250 s hasta los 2 700 s y conservadas a -20 °C para determinar los aminoácidos libres totales (AALT). La unidad de tiempo previa a la adición de extracto multienzimático, fue definida como el tiempo cero. A partir del gasto de HCl (Fase ácida) y de NaOH (Fase alcalina) se determinó (GH), el cual se expresa como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}). Donde el valor de (h) = [consumo de base en ml (Vb)] x [normalidad de la base (Nb)] x [1 x (constante de disociación de los grupos α -NH₂ y α -COOH respectivamente)⁻¹] x [1 x (masa de proteína en la mezcla de reacción)⁻¹]. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis de aminoácidos libres totales (AALT). Las muestras pre-hidrolizadas (20 μ l) del vaso de reacción, se fijaron con 20 μ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12% y fueron analizadas mediante la técnica de *o*-phtaldialdehído (OPA), de acuerdo con Church *et al.* (1983), que consiste en la unión de la parte amino terminal de los aminoácidos con el reactivo OPA. La solución de OPA está compuesta de 50 ml de tetraborato sódico 0,1 M; 5 mL de SDS al 20 %; 80mg de *o*-phtaldialdehído (disueltos en 1 mL de metanol) y 0,2 mL de β -mercaptoetanol, aforando con agua destilada hasta 100 mL de volumen final. Las muestras prehidrolizadas que fueron mezcladas con TCA se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos. Se tomaron 10 μ l del sobrenadante y se añadieron directamente a 1 mL del reactivo OPA, mezclado brevemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 340 nm y se comparó con un estándar elaborado con l-leucina (0.5 mg mL⁻¹) concentraciones crecientes de 0 a 20 μ g ml⁻¹ para la determinación de la cantidad de aminoácidos libres totales en las muestras. Los resultados se expresan como μ g de equivalentes de l-leucina liberados por cada μ g de proteína. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Tabla 1. Composición proximal (%) de harinas de *Cannavalia ensiformis*, L. DC, utilizando diferentes métodos de procesamiento.

Parámetros	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
Harina Desgrasado	5.13 ± 0.21	32.57 ± 0.21	0.48 ± 0.08	11.31 ± 0.05	4.16 ± 0.09	51.47	4178.29 ± 6.76
Harina E. ácido	6.61 ± 0.20	32.41 ± 0.16	1.93 ± 0.03	9.78 ± 0.10	3.33 ± 0.08	52.54	4224.84 ± 5.06
Harina Autoclavado	7.40 ± 0.23	31.59 ± 0.22	2.07 ± 0.06	10.05 ± 0.05	4.10 ± 0.05	52.19	4243.29 ± 1.50
Harina Cocción	9.07 ± 0.08	32.37 ± 0.27	1.98 ± 0.10	9.91 ± 0.06	3.28 ± 0.03	52.46	4305.83 ± 3.20
Harina Decorticado	11.23 ± 0.10	39.38 ± 0.14	2.17 ± 0.03	0.80 ± 0.00	4.15 ± 0.03	53.51	4330.05 ± 7.59
Harina Hidratación	6.46 ± 0.28	32.26 ± 0.17	2.13 ± 0.10	10.71 ± 0.21	3.31 ± 0.11	51.59	4275.90 ± 2.68
Harina Germinado	12.41 ± 0.29	34.39 ± 0.14	1.95 ± 0.05	9.72 ± 0.26	4.31 ± 0.04	49.63	4154.91 ± 1.00
Harina sin Tratamiento	10.18 ± 0.10	32.87 ± 0.16	2.08 ± 0.06	8.22 ± 0.15	4.04 ± 0.03	52.79	4200.69 ± 2.49

Valores promedio ± desviación estándar de 3 réplicas por muestra. Resultados expresados en base seca, excepto humedad.

Análisis estadístico. Se corroboró la normalidad y homoscedasticidad para los valores de GH y liberación de aminoácidos totales, por lo que se aplicó un análisis de varianza de una vía y pruebas posteriores de Tukey para determinar las diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un valor de significancia de ($P < 0.05$). Así mismo para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA V7.

RESULTADOS

Análisis químico proximal. El análisis proximal de las harinas procesadas de las semillas de *C. ensiformis* se muestra en la Tabla 1.

Actividad específica de extractos multienzimáticos de estómago e intestino. Los ensayos de proteasas ácidas y alcalinas, revelaron que los juveniles de *O. niloticus*, tienen una mayor actividad de proteasas en el intestino en relación a la actividad enzimática presentada en la sección estomacal del tracto digestivo (Tabla 2). Ambos valores de actividad específica se tomaron como base para calcular el volumen de extracto multienzimático, tanto en el proceso de hidrólisis ácida, como en la alcalina.

Digestibilidad *in vitro* de las harinas de *C. ensiformis* como ingredientes proteínicos. Para la hidrólisis ácida se utilizaron los extractos enzimáticos estomacales de *O. niloticus* y fueron expuestos a las diferentes harinas procesadas de *C. ensiformis* mediante la técnica del pH STAT, tomando como base la hemoglobina, donde sus valores fueron considerados como el 100 % del grado de hidrólisis (GH, %). Todas las harinas mostraron valores de GH menores al 100 %, siendo la harina cocida la que presenta mayor valor de GH con respecto al resto de los tratamientos. Por otro lado, el tratamiento con ácido alcanzó el valor más bajo (Fig. 1a).

En la fase alcalina las harinas fueron expuestas a extractos multienzimáticos intestinales, utilizando los valores de la caseína como el

100 % de GH. Los resultados mostraron que la harina cocida tiene el mayor valor de GH con respecto al resto de los tratamientos, siendo el tratamiento con ácido quien mostró el valor más bajo (Fig. 1b).

En la Tabla 3, se muestran los valores de GH para cada fase (ácida y alcalina) y el valor del GH total, así mismo el porcentaje de digestibilidad alcanzado por cada una de las harinas analizadas, donde la suma del GH de la hemoglobina y la caseína, se tomaron como control y fue considerada como el 100% de la digestibilidad. Aquí podemos observar que el tratamiento por cocción presenta un GH total mayor y por encima del 50 % de digestibilidad con respecto a los demás tratamientos.

Determinación de aminoácidos libres totales mediante la técnica de OPA. En la fase ácida, el tratamiento por germinado mostró los mayores valores de AALT ($0.28 \pm 0.006 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguidos del decorticado ($0.12 \pm 0.022 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2a), estos valores fueron mayores a los mostrados por la hemoglobina ($0.09 \pm 0.009 \mu\text{g mL}^{-1}$), los tratamientos de cocido ($0.02 \pm 0.006 \mu\text{g mL}^{-1}$) y por autoclave ($0.03 \pm 0.012 \mu\text{g mL}^{-1}$) presentaron los valores más bajos de AALT (Tabla 4).

En la fase alcalina el tratamiento por cocción presentó valores significativamente altos ($0.40 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2b), siendo el tratamiento por desgrasado que mostró el valor más bajo de AALT ($0.08 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabla 5), en donde la caseína presentó valores de $0.53 \pm 0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$.

DISCUSIÓN

En este estudio se aplicaron de forma independiente 7 diferentes procesos para la eliminación de FAN en semillas de *C. ensiformis*. A cada una de las harinas obtenidas de estos procesos se les evaluó el GH y los AALT. Los análisis proximales muestran que la harina cocida presenta un contenido de proteínas y grasas similares a la harina sin tratamiento. Según Okomoda *et al.* (2016), el tratamiento térmico de hasta 40 min no afecta significativamente el contenido de proteína y grasa de *C. en-*

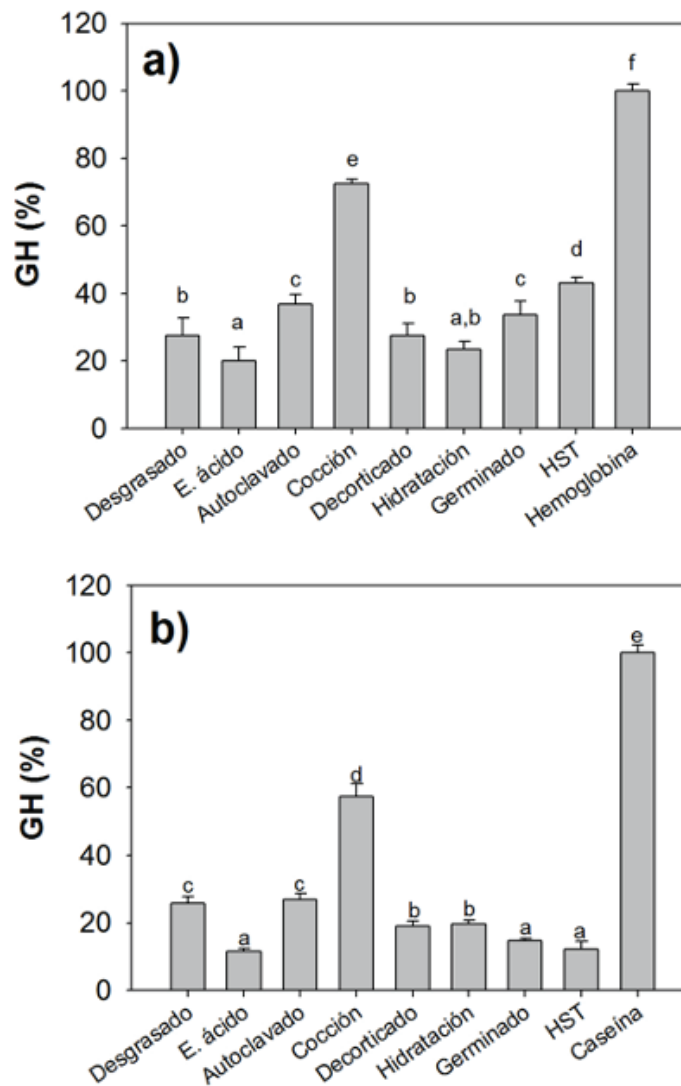


Figura 1. Valores de GH (% \pm DE) de los ingredientes proteínicos de las harinas de *Cannavalia ensiformis*: a) fase ácida, como ingrediente de referencia la hemoglobina y b) fase alcalina, como ingrediente de referencia la caseína.

siformis, pero a partir de 30 min disminuyen los contenidos de lectinas, saponinas e inhibidores de tripsina, no así la canavalina, similar a lo reportado por Tiamiyu *et al.* (2016), mediante el proceso de tostado de semillas de esta especie. Sin embargo, Ndidi *et al.* (2014) reportaron pérdidas de proteína cruda y grasa en hervidos y asados de semillas *Sphenostylis stenocarpa*, Hochst. ex A. Rich. Harms; mientras Audu & Aremu (2011), encontraron pérdidas de grasas por tratamiento térmico, pero no significativamente en proteínas de haba procesada (*Phaseolus vulgaris* L.), lo que indica que el efecto térmico depende de la composición bioquímica de las semillas y la especie a tratar, afectando no solo a los FAN sino también a los nutrientes, aunque en *C. ensiformis* solo afectó a los FAN.

Todas las harinas analizadas presentaron valores menores al 100% de digestibilidad en la fase ácida y alcalina con respecto al control. La

harina cocida mostró el valor más alto (58.73 %) de digestibilidad en relación al resto de los tratamientos, datos similares son reportados por Concha-Frías (2008), para pasta de soya y gluten de trigo en *C. undecimalis*. Asimismo, se ha observado que *C. ensiformis* presenta GH menores a otras harinas vegetales (Cuenca *et al.* 2013), esto puede deberse a que esta especie contenga mayor cantidad de FAN que las especies analizadas por este autor, los cuales inhiben el crecimiento de los peces (Moyano *et al.* 1998; Alarcón *et al.* 2001; Francis *et al.* 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2003; Oña *et al.* 2005), al disminuir la biodisponibilidad de los nutrientes mediante la inhibición de la actividad enzimática. De Oña *et al.* (2003), mencionan que las diferencias en los valores de hidrólisis entre las distintas proteínas, podrían estar relacionadas a sus perfiles aminoacídicos y a las características de sus estructuras terciarias.

Tabla 2. Actividad de enzimas proteolíticas del estómago (proteasas ácidas) e intestino (proteasas alcalinas) de *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758.

Actividad Proteolítica	Unidades ml ⁻¹	Unidades g Tejido fresco ⁻¹	Unidades juveniles ⁻¹
Ácida	52.78±5.38	263.9±26.91	2111.2±215.27
Alcalina	380.02±15.26	1900.1±76.28	1215.6±48.80

Se incluye la desviación estándar.

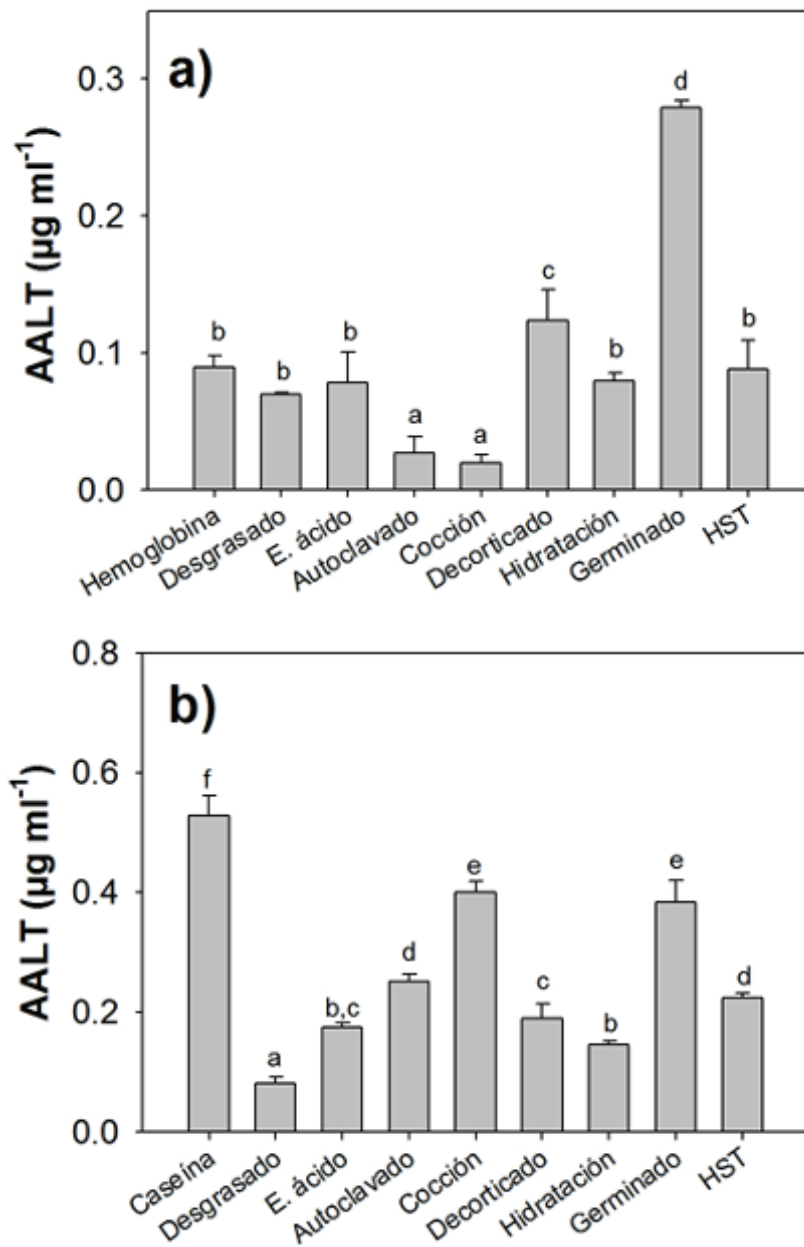


Figura 2. Valores de AALT ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DE}$) de los ingredientes proteínicos de las harinas de *Cannavalia ensiformis*: a) fase ácida, como ingrediente de referencia la hemoglobina y b) fase alcalina, como ingrediente de referencia la caseína.

Tabla 3. Valores finales de los grados de hidrólisis (GH) fase ácida, fase alcalina, GH total y digestibilidad relativa (%) de los ingredientes proteínicos de las harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (hemoglobina y caseína).

Ingrediente	GH Ácido	GH Alcalino	GH Total	Digestibilidad (%)
Harina Desgrasado	0.29 ± 0.06	2.97 ± 0.25	3.26	28.11
Harina E. ácido	0.21 ± 0.05	1.23 ± 0.07	1.44	12.40
Harina Autoclavado	0.39 ± 0.03	2.84 ± 0.12	3.23	27.89
Harina Cocción	0.76 ± 0.01	6.04 ± 0.37	6.80	58.73
Harina Decorticado	0.29 ± 0.04	2.00 ± 0.18	2.29	19.74
Harina Hidratación	0.25 ± 0.02	2.08 ± 0.05	2.33	20.10
Harina Germinado	0.35 ± 0.04	1.55 ± 0.11	1.90	16.43
Harina sin Tratamiento	0.45 ± 0.03	1.29 ± 0.20	1.74	15.05
Hemoglobina/Caseína	1.05 ± 0.02	10.53 ± 0.24	11.58	100.00

Se incluye el % y la desviación estándar.

En el análisis de AALT, en la fase ácida, los mejores valores se obtuvieron en los tratamientos de germinado y decorticado, mientras que en la fase alcalina fue el tratamiento por cocción, seguido del germinado con respecto a los demás tratamientos. En este sentido, se considera que las enzimas intestinales tienen una mayor actividad proteolítica que las enzimas gástricas para *O. niloticus*, lo cual es normal si consideramos que la tilapia no posee un estómago bien desarrollado (Pérez-Muñoz & Sáenz-Ramos, 2015), datos similares reportaron Chong *et al.* (2002) en el cíclido azul (*Symphysodon aequifasciata, Pellegrin,*

1904), lo anterior se vio reflejado en el proceso de hidrólisis de los diferentes tratamientos de *C. ensiformis*, debido a que la fase alcalina mostró valores mayores de hidrólisis que los presentados por la fase ácida del estómago, indicando que en el estómago de *O. niloticus* se lleva a cabo la iniciación de la hidrólisis proteica pero que es en el intestino donde ocurre la mayor parte de la degradación y por ende una mayor cantidad de aminoácidos libres que son absorbidos al torrente sanguíneo por los enterocitos de las paredes intestinales (Moyano *et al.* 1998; Concha-Frías, 2008).

Tabla 4. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (AALT) fase ácida de los ingredientes proteínicos de harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (hemoglobina).

Ingrediente	AALT (µg ml ⁻¹)	AALT (%)
Hemoglobina	0.09 ± 0.009	100.00
Harina Desgrasado	0.07 ± 0.001	77.70
Harina E. ácido	0.08 ± 0.023	86.99
Harina Autoclavado	0.03 ± 0.012	30.11
Harina Cocción	0.02 ± 0.006	21.93
Harina Decorticado	0.12 ± 0.022	138.29
Harina Hidratación	0.08 ± 0.006	88.48
Harina Germinado	0.28 ± 0.006	311.15
Harina sin Tratamiento	0.09 ± 0.021	98.14

Se incluye el % y la desviación estándar.

Tabla 5. Valores finales de la liberación de aminoácidos totales (AALT) fase alcalina de los ingredientes proteínicos de harinas de Cannavalia ensiformis, L. DC. e ingrediente de referencia (caseína).

Ingrediente	AALT (µg ml ⁻¹)	AALT (%)
Caseína	0.53 ± 0.03	100.00
Harina Desgrasado	0.08 ± 0.01	15.45
Harina E. ácido	0.17 ± 0.01	32.98
Harina Autoclavado	0.25 ± 0.01	47.48
Harina Cocción	0.40 ± 0.02	75.85
Harina Decorticado	0.19 ± 0.02	35.94
Harina Hidratación	0.15 ± 0.01	27.68
Harina Germinado	0.38 ± 0.04	72.57
Harina sin Tratamiento	0.23 ± 0.01	42.56

Se incluye el % y la desviación estándar.

La harina con mayor digestibilidad *in vitro* y valores de AALT en fase alcalina fue la harina cocida de *C. ensiformis* con respecto al resto de harinas. En este aspecto, los estudios realizados indican que las proteasas alcalinas durante el proceso de hidrólisis proteínica en *O. niloticus* son las que llevan a cabo la mayor cantidad de hidrólisis y apoya que el intestino es el órgano donde se absorbe la mayor cantidad de aminoácidos liberados en el proceso. Por su parte, los valores GH y AALT para la harina de cocido, nos indican que es posible realizar una sustitución parcial de pasta de soya por *C. ensiformis* en dietas para *O. niloticus*.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Organización de Estados Americanos (OEA), por el apoyo mediante la beca otorgada durante la realización de esta investigación y a Patricia Hinojosa por su apoyo técnico en el procesamiento de la *Canavalia*, así como al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), donde se me permitió realizar mi estancia de investigación. Al proyecto denominado "Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Ambientales para su permanencia en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT" Clave: TAB-2014-C29-245836" por el apoyo para la realización de la estancia de investigación.

REFERENCIAS

- ABDO DE LA PARRA, M. I., C. A. MARTÍNEZ-PALACIOS, I. E. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, B. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. A. OLVERA, M. L. VÁSQUEZ & C. CHÁVEZ-SÁNCHEZ. 1998. Advances in the use of the bean *Canavalia maritima* as a possible source of protein in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: Grizel, H. & P. and P. Kestemont (eds.). *Abstracts of the International Conference - Aquaculture Europe '98. European Aquaculture Society, Special Publication No. 26*. Oostende, Belgium. pp. 2-3.
- AGUILERA, G. C., R. MENDOZA, G., MÁRQUEZ & I. IRACHETA. 2005. *Alligator gar (Atractosteus spatula) larval development and early conditioning to artificial diets*. Memories of Aquaculture America New Orleans, Louisiana, E.U.A. 6 p.
- AKANDE, K. E. & E. F. FABIYI. 2010. Effect of Processing Methods on Some Antinutritional Factors in Legume Seeds for Poultry Feeding International. *Journal of Poultry Science* 9 (10): 996-1001.
- AKINBIYI, A. 1992. The use of thermally-processed jack bean (*Canavalia ensiformis*) in Nile tilapia diets. M.Sc. Thesis, University of Ibadan, Nigeria. 122 p.
- ALARCÓN, F. J., F. L. GARCÍA-CARREÑO & M. A. N. DEL TORO. 2001. Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 179-18. DOI: 10.1023/A:1014079919461
- ALARCÓN, F. J., F. J. MOYANO & M. DÍAZ. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-STAT system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 697-704. DOI: 10.1002/jsfa.1100
- ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenosa *Paralichthys oblongifasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis Doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 p.
- ANDUAGA-COTA, R., A. G. COTA-GASTÉLUM, M. R. FALCÓN-VILLA, G. YÁNEZ-FARIAS & M. J. BARRÓN-HOYOS. 2002. Medición de dureza en frijol cocido con una celda de extrusión por alambres: propuesta de una celda de menor tamaño. *Memorias del IV Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología*. Hermosillo, Sonora. 25-34.
- ANSON, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22: 79-89. DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC INTERNATIONAL. 1990. *Official Method of Analysis*. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1094 p.
- AUDU, S. S. & M. O. AREMU. 2011. Effect of processing on chemical composition of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Pakistan Journal of Nutrition* 10(11): 1069-1075.
- ÁVALOS-SÁNCHEZ, A. M. 2006. *Digestibilidad in vitro* de dietas con diferentes combinaciones de gigantes diseñadas para larvas y juveniles de pescado blanco del lago de Patzcuaro *Chirostoma estor* (Jordan, 1879). Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. Morelia Michoacán, México. 52 p.
- BAUTISTA, G. A. 2009. Obtención de subproductos a base de semilla de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) sometidos a diferentes procesos tecnológicos con potencial aplicación en alimentos para acuicultura. Tesis de Licenciatura, Tecnológico de estudios superiores de Huixquilucan. La Paz, Baja California Sur, México. 88 p.
- CHONG, A., R. HASHIM & A. BIN ALI. 2002. Inhibition of protease activities in *Discus Symphysodon* spp. By three plant meals. *Aquaculture International* 10: 433-441.
- CHURCH, F. C., H. E. SWAISGOOD, D. H. PORTER & G. CATIGNANI. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66: 1219-1227.
- CONCHA-FRÍAS, B. 2008. Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias del Mar, UCN. Coquimbo, Chile. 130 p.
- CUENCA-SORIA, C. A., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, J. L. ORTIZ-GALINDO, R. GUERRERO-ZARATE, M. A. PERERA-GARCÍA, R. E., HERNÁNDEZ-GÓMEZ & H. NOLASCO-SORIA. 2013. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Revista Universidad y Ciencia* 29 (3): 263-275.
- DIMES, L. E. & N. F. HAARD. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 108 A (2-3): 349-362.
- FAGBENRO, O. A., E. O. ADEPARUSI & W. A. JIMOH. 2007. Evaluation and Nutrient quality of detoxified Jackbean (*Canavalia ensiformis*) seeds, cooked in distilled water or trona solution, as a substitute for soybean meal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, diets. *Journal of Applied Aquaculture* 19(2): 83-100.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2012. Grassland species index. *Canavalia ensiformis*. Disponible en línea en: <http://www.fao.org/>

- ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/DAT (consultado 12 de septiembre de 2017) A/PFO00012.HTM
- FRANCIS, G., H. P. S. MAKKAR & K. BECKER. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199 (3-4): 197-227.
- FRÍAS-QUINTANA, C. A., C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ & G. MÁRQUEZ-COUTRIER. 2010. Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia* 26(2): 265-282.
- KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal General Physiology* 30: 291-310.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A., R. GALVÁN-CRUZ, M. A. OLVERA-NOVOA & C. CHÁVEZ-MARTÍNEZ. 1988. The use of jack bean (*Cannavalia ensiformis* Leguminosae) meal as a partial substitute for fish in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Cichlidae). *Aquaculture* 68: 165-175.
- MOYANO, F. J., F. J. ALARCÓN & M. DÍAZ. 1998. Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of *in vitro* digestibility assays. *Comparative Biochemistry and Physiology* 5: 135-143.
- MOYANO, F. J., M. A. SAÉNZ DE RODRIGÁNEZ, M. DÍAZ & A. G. J. TACON. 2014. Application of *in vitro* digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture* 6:1-20. DOI:10.11/raq.12065
- NDIDI, U. S., C. U. NDIDI, A. O. ALIYU, M. F. G. BILLY & O. OKPE. 2014. Proximate, Antinutrients and Mineral Composition of Raw and Processed (Boiled and Roasted) *Sphenostylis lisstenocarpa* Seeds from Southern Kaduna, Northwest Nigeria. *ISRN nutrition*.
- OKOMODA, V. T., L. O. TIAMIYU & S. G. UMA. 2016. Effects of hydrothermal processing on nutritional value of *Canavalia ensiformis* and its utilization by *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *Aquaculture Reports* 3: 214-219.
- OÑA C., F. J. ALARCÓN, M. DÍAZ & E. ABELLÁN. 2003. Estudio comparativo de la degradación *in vitro* de proteínas por las proteasas estomacales de Denton (*Dentex dentex*), Pargo (*Pagrus Pagrus*) y el híbrido Dentex x Pagrus. *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA)*: 540-549.
- OÑA, C., F. J. ALARCÓN, M. DÍAZ & E. ABELLÁN. 2005. Efecto de los inhibidores presentes en harinas vegetales sobre las proteasas intestinales de dos espáridos y su híbrido. *X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España* 232-233.
- OSUIGWE, D. I., A. I. OBIKEZIE & J. O. OGUNJI. 2002. Preliminary evaluation of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) seed meal as a substitute for fishmeal in diets for *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *International Journal of Agriculture and Rural Development* 9 (1): 7-11.
- PÉREZ-MUÑOZ, M. M. & M. S. SAENZ-RAMOS. 2015. Crecimiento de las tilapias *Oreochromis niloticus* en cultivo Monosexual y ambos sexos, en sistemas de producción semi-intensivos. Tesis para optar el título de Ingeniero Acuicola, Universidad Autónoma de Nicaragua. Nicaragua. 93 p.
- PÉREZ, J. J., G. A. WICKI, F. J. MOYANO & F. J. ALARCÓN. 2003. Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*). *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA)*: 442-453.
- RIVAS, V. M. 2006. Valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L.Walp) para camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México. 131 p.
- SANDOVAL-CASTRO, C. A. & F. HERRERA-GÓMEZ. 2001. Cambios en la población de protozoarios ruminales por efecto de la inclusión de *Canavalia ensiformis* a la dieta de bovinos. *Rev Biomed* 12:166-171.
- SAUNDERS, R. M., M. A. CONNER, A. N. BOOTH, E.M. BICKOFF & G. O. KOHLER. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *Journal Nutrition* 103: 530-535.
- TACON, A. G. J. 1995. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. *Journal of Applied Ichthyology* 11: 205-214.
- TIAMIYU, L. O., V. T. OKOMODA & P. O. AKPA. 2016. Nutritional profile of toasted *Canavalia ensiformis* seed and its potential as partially replacement for soybean in the diet of *Clarias gariepinus*. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 20(2): 12-17.
- UDEDIBIE, A. B. I. 1990. Nutritional evaluation of jackbean (*Canavalia ensiformis*) for poultry industry in Nigeria. *AMBIO* 19:361-365.
- UDEDIBIE, A. B. I. & C. O. NKWOCHA. 1990. Comparative study of jack bean (*C. ensiformis*) and sword bean (*C. gladiata*) as protein supplements for young broiler chicks. *Agriculture Journal* 24:7-14.
- WALTER, H. E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In Bergmeyer, H.J. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V. Verlag Chemie. Weinham, pp. 270-277.
- WYSS, U. & H. BICJEL. 1988. Ripe beans of *Canavalia ensiformis* (jackbean) as feed ingredient for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology* 20: 325- 326.

Effect of cadmium on the concentration and expression of TNF- α protein in sea urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778)

Efecto del cadmio sobre la concentración y expresión de la proteína TNF- α en el erizo marino *Diadema setosum* (Leske, 1778)

Dominggus Rumahlatu^{1*}, Aloysius Duran-Corebima², Mohamad Amin² and Fatchur Rohman²

Recibido: 11 de marzo de 2019.

Aceptado: 03 de noviembre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

Background: Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal present in seawater, and can damage DNA, producing lipid peroxidation, and protein inactivation. **Goals:** This research aimed to investigate the effect of Cd on the concentration and expression of TNF- α protein in *the Diadema setosum*. **Methods:** This study was conducted for 4 weeks in the laboratory of Marine Conservation LIPI Ambon. Experimental Cd concentrations were 0.0, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, and 12.0 $\mu\text{g/L}$. The experiment was conducted in 6 tanks (100 x 60 x 70 cm^3) each one with 7 individuals of *D. setosum* as 7 biological replicates. The examination of activation and concentration of TNF- α was performed with immunohistochemical techniques as well as indirect ELISA and western blotting at the Laboratory of Medical Physiology of Brawijaya University. The data related to TNF- α protein concentrations were analyzed by one way ANOVA and a Duncan test ($p < 0.05$). **Results:** The results showed that Cd treatment significantly increased the levels of TNF- α protein. There is a linear relationship between Cd concentration and TNF- α protein levels. The level of the TNF- α protein at the concentration of 12 $\mu\text{g/L}$ Cd was the highest. **Conclusions:** The results of this research on the concentration and presence of TNF- α protein indicate that this approach could be implemented as a biomonitoring model of the exposure to Cd at the molecular level using *D. setosum* as bioindicator species in marine waters.

Keywords: heavy metal cadmium, *Diadema setosum*, TNF- α protein, biomonitoring

RESUMEN

Antecedentes: El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico presente en el agua de mar y puede dañar el ADN, produciendo peroxidación de lípidos e inactivación de proteínas. **Objetivos:** Este trabajo tuvo como objetivo investigar el efecto del Cd sobre la concentración y expresión de la proteína TNF- α en *Diadema setosum*. **Métodos:** Este estudio se realizó durante 4 semanas en el laboratorio de Conservación Marina LIPI Ambon. Las concentraciones experimentales de Cd fueron 0.0, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0 y 12.0 $\mu\text{g/L}$. El experimento se realizó en 6 tanques (100 x 60 x 70 cm^3) cada uno con 7 individuos de *D. setosum*, así como 7 réplicas biológicas. El examen de activación y concentración de TNF- α se realizó con técnicas inmunohistoquímicas, así como ELISA indirecto y western blot en el Laboratorio de Fisiología Médica de la Universidad Brawijaya. Los datos relacionados con las concentraciones de proteína TNF- α se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba de Duncan ($p < 0.05$). **Resultados:** Los resultados mostraron que el tratamiento con Cd aumentó significativamente los niveles de proteína TNF- α . Existe una relación lineal entre la concentración de Cd y los niveles de proteína TNF- α . El nivel de la proteína TNF- α con la concentración de 12 $\mu\text{g/L}$ de Cd fue el más alto. **Conclusiones:** Los resultados de esta investigación sobre la concentración y presencia de proteína TNF- α indican que este enfoque podría implementarse como un modelo de biomonitorio de la exposición al Cd a nivel molecular utilizando *D. setosum* como especie bioindicadora en aguas marinas.

Palabras clave: cadmio de metales pesados, *Diadema setosum*, proteína TNF- α , biomonitorio

¹ Study Program of Biology Education, Faculty of Teacher Training and Education, Pattimura University. Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon, 97233. Indonesia.

² Department of Biology, Faculty of Mathematics and Science, State University of Malang. Jl. Semarang 5 Malang, 65145. Indonesia.

***Corresponding author:**

Dominggus Rumahlatu: e-mail: dominggus_amq@yahoo.co.id

To quote as:

Rumahlatu D., A. Duran-Corebima, M. Amin & F. Rohman. 2019. Effect of cadmium on the concentration and expression of TNF- α protein in sea urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778). *Hidrobiológica* 29 (3): 181-188.

INTRODUCTION

The heavy metal cadmium (Cd) is a pollutant from the industrial activities (WHO, 2007; Ashraf, 2005), and is known to be harmful to aquatic organisms (Chiarelli & Roccheri, 2012; Liu *et al.*, 2012; Arai *et al.*, 2012; Wei, 2013). Recently, there are many reports of the effects of Cd on various organs from different animals. The studies conducted over the past two decades show that cadmium can damage DNA, producing lipid peroxidation, and protein inactivation (Valko *et al.*, 2005). Sary & Mohammad (2012) reported the accumulation of cadmium in fish *Acanthopagrus pilate* and *Platycephalus indicus* caused slow growth and health problems for humans.

Studies about monitoring the exposure to heavy metals at the molecular level in various aquatic animals have been performed to see the effects of heavy metals have been reported by several researchers. The bioassay with embryo-cytotoxicity techniques by Dermeche *et al.* (2012) has found *Paracentrotus lividus* is very sensitive to Cd. For this, *P. lividus* is recommended as bioindicator species of the marine environment. Indicators of stress on freshwater invertebrates were also reported by Molnar & Fong (2012) with the Neutral Red Retention-Lysosomal Destabilization Assay. Liu *et al.* (2012) reported with a random amplified polymorphic DNA (RAPD) test that *Arabidopsis thaliana* exposed to Cd presented genetic changes. Besides, Wei (2013) research with FTIR spectra techniques applied on gonads of sea urchins *Strongylocentrotus nudus* exposed to Cd, found the occurrence of stress at the molecular level with damage to lipids and proteins. Sea urchin embryos are very sensitive to environmental stress, and Cd constitutes an inductor from modulator factors, like protein kinases and phosphatases, caspases, heat shock proteins, metallothioneins, transcription factors, reactive oxygen species, apoptosis and autophagy (Chiarelli & Roccheri, 2012; Chatterjee *et al.*, 2014).

Related with the utilization of various protein molecules to see the responses elicited by heavy metals, Jung & Lee (2012) reported that Heat Shock Proteins (HSPs) plays a role in the process of homeostasis under stress conditions. HSPs act as molecular chaperones in living organisms, where the expression of HSP27, HSP70, and HSP90A-1 have been recommended as a molecular marker to monitor the toxicity of heavy metals in the aquatic environment. Protein molecules that have been used as a stress response markers for Cd (P41087, P4825, P2746, P2811) have shown strong correlation with Cd located in the locus in maintaining the integrity of the Ref-1 and hOGG1 genomes or responses as a result of cellular activation due to oxidative stress (Liu *et al.*, 2012). Additionally, Rumahlatu *et al.* (2012) used methalotionine protein (MT) a molecular marker to see the damage to the spines, shells, gonads, and intestines accumulated with Cd. Previously, Shimoda *et al.* (2003) found that MT protein expression was related to resistance to apoptosis in cardiomyocytes so that MT protein was used as a marker of failure to treat tumor cell apoptosis. The use of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) protein to see the repair mechanisms in the health sector has also been reported. TNF- α plays a role in the pathogenesis of diabetes mellitus type 2 and can reduce obesity with the increased levels of cytokines (Swaroop *et al.*, 2012). Interestingly, TNF- α is a pro-inflammatory cytokine which has a biological effect, and expressions of TNF- α can mediate the effects of stress from the hypotension of arteries, coagulation of blood vessels, and hypoglycemia (López-Bojórquez *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2012).

Previous research reviews (Jung & Lee, 2012; Liu *et al.*, 2012; Shimoda *et al.*, 2003; Rumahlatu *et al.*, 2012) have investigated more on the response of biological molecules of HSP and MT proteins as molecular markers caused by exposure to heavy metals. However, there have not been many types of research on the molecular response of *Diadema setosum* as a result of the exposure to Cd using TNF- α . Therefore, the purpose of this study was to investigate the molecular response in the form of activation, expression, and concentrations of TNF- α *D. setosum* caused by the exposure to Cd in basin treatment.

MATERIALS AND METHODS

One-year-old *Diadema setosum* specimens were treated on 6 basins in the laboratory of Research Center for Deep Sea, The Indonesian Institute of Sciences Ambon. A total of 42 individuals of *D. setosum* with the same characteristics body weight and diameter of 90 g and 15 cm, respectively were used for this study. The exposure experiments were conducted in 7 basin aquaria (100 x 60 x 70 cm³) with 1 control basin and 5 basins for the experimental concentrations of CdCl₂.

The experimental concentrations were 0.0, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, and 12.0 mg/L of Cd. Each basin treatment was filled with 200 L seawater, which was changed once a week with electric-aerator air circulation. Each basin was applied one level of Cd concentration treatment, and each basin was inhabited by seven specimens of *D. setosum* as individual replicates. The sea urchin was fed with seagrass every morning by binding the seagrass on the boulder and placed in the treatment basin and spreading the seagrass on the surface of the water of the treatment basin.

After 4 weeks of the treatment, surgery on the 42 individuals was performed to take the liver which was transferred into a sample pot for further examination activation of TNF- α protein, the concentration measurements of TNF- α protein in the Laboratory of Medical Physiology, Brawijaya University, Malang.

Examination of TNF- α protein Activation. The Examination of TNF- α protein activation in the liver of *D. setosum* was performed by using immunohistochemical methods. Livers were prepared through the stages of tissue fixation, embedding, and sample sectioned. Tissue slides were activated by soaking with xylene twice, 15 minutes each. Then, the slide was incubated in a series of ethanol series 100% I, 100% II, 95%, 90%, 80%, and 70%, each solution for 5 minutes. Then it was incubated again in the water for 5 minutes. The provided slides were soaked into the H₂O₂ 0.3% for 30 minutes at room temperature.

The incubation time was 10-30 minutes for frozen sections, and 5-10 minutes for frozen tissue arrays. Then the slides were rinsed with water followed by 1 x PBS (Sigma Aldrich) (pH 7.4) once, then tissue sections were circled with Pap Pen. The samples were incubated with 1% of PBS serum [Mix 1x 3.5 ml of PBS, pH 7.4 as much as 1 drop (*ca.* 35 μ l/drop) normal serum in the tube for 30 minutes at room temperature. Those slides were incubated with PBS which was diluted with the antibody in a humid chamber for 1 hour at room temperature, then rinsed with 1xPBS 3 times in 5 minutes. After that, slides were incubated with a Biotin-labeled secondary antibody for 30 minutes at room temperature. The slides were rinsed with 1xPBS 3 times for 5 minutes. Then, the detection solution was added to the tissue sections and it was incubated at room temperature for 30 minutes. The slides were rinsed

with 1XPBS for 3 times, each for 5 minutes. The slides were dripped with DAB liquid (Diamino-benzidine tetrahydrochloride). After that, the cells were dripped with counterstains with hematoxylin for 10 minutes. Cells were washed with flowing water and then with distilled water for 10 minutes. Cells were left at room temperature. The tissue was placed on an object glass and dripped with Entellan®. After that, the liver cells undergoing activation of TNF- α protein were observed using a photonic microscope (Olympus) with slide blot shooting at a 400x magnification field of view.

Measurement of TNF- α Protein Concentration. The measurement of TNF- α protein concentration used an ELISA method (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Lequin, 2005). Sample preparation was carried out by softening the liver organ of *D. setosum* through the thawing step. The ELISA reader was performed by making an ELISA plate plan and coating buffer based on the sample code and location of the sample. After that, Coating Antigen was performed with the levels 1:40 diluted with coating buffer and incubated at a temperature of 4°C overnight. The next day the plate was washed with a solution of 0.2% PBS Tween as much as 100 μ l and repeated 6 times. After that, 100 μ l of primary antibody anti-TNF- α (1: 400) was added into assay buffer. Then, the ELISA plate was incubated at room temperature for 2 hours while being shaken with ELISA plate shaker.

In the next stage, the plate was washed with a solution of PBS Tween 0.2% as much as 200 μ l for 6 times, and then 100 μ l secondary antibody IgG biotin anti-rabbit (1:800) was added into assay buffer and incubated at room temperature for 1 hour while being shaken. After that, the plate was washed again with PBS Tween 0.2% 6 times. Next, 100 μ l SAHRP solutions (1:800) were added to the assay buffer and incubated at room temperature for 1 hour while being shaken. Then, the solution was washed with PBS Tween 0.2% 200 μ l for 6 times. After that, each was added 100 μ l of good substrate sure blue TMB microwell, incubated for 20-30 minutes in a dark room. At this stage, if their reaction occurs between the antigen and the antibody, the solution would turn blue. The solution that was previously blue would turn yellow. The sample was analyze by using an ELISA reader at a wavelength of 450 nm., and the levels of TNF- α protein of each sample would be observed eventually.

Examination of the Expression of TNF- α Protein. The examination of the expression of TNF- α protein used the western blotting method (Young & Hongbao, 2010). The examination of TNF- α protein expression was preceded by the examination of SDS-PAGE, namely by performing electrophoresis on the samples of protein standard broad range (Bio-lab). The gel, the results of SDS PAGE, was soaked in 100 mL deionized water (pH 7.0) for 5 minutes. Then the gel, NC membrane, and sponge were soaked in transfer buffer for 5 minutes. Furthermore, it was arranged sequentially in each well: black able, sponge, two sheets of filter paper, gel, NC membrane, 3 pieces of filter paper, sponge, and white able. Then it was put into the chamber, electrified from the negative to the positive pole (100 volts, 120 minutes). Furthermore, the NC membrane was rinsed with deionizing 3 times, and immersed in blocking buffer (5% BSA), and incubated at 4°C overnight. NC membrane was washed with TBS 0.2% Tween 3 times for 5 minutes and added antibodies in TBS BSA 1%. It was incubated for 2 hours and shaken. After that, the gel was washed with TBS-Tween 0.2% 3 times for 5 minutes. Then IgG biotin anti-rabbit was added in TBS, incubated for 1 hour and

shaken. It was washed again with TBS-Tween 0.2% for 3 times for 5 minutes, and SAHRP was added in TBS, incubated for 1 hour and shaken. After that, it was washed with TBS-Tween 0.2% 3 times for 5 minutes. After that, the TMB substrate was added to the membrane for 15-30 minutes until the ribbon on the membrane emerged. Stop the reaction with distilled water.

Data analysis. The data were analyzed descriptively to describe the activation, concentration, and expression of TNF- α protein and to determine the effect of the concentration of heavy metals Cd on the concentrations of TNF- α protein. Inferential statistical analysis one-way ANOVA followed by Duncan test ($p < 0.05$) was performed to determine whether there were statistical differences between the mean concentrations of TNF- α protein in *D. setosum*.

RESULTS

Activation of TNF- α Protein *Diadema setosum* due to heavy metal exposure. The results of the immunohistochemical assay on the liver tissue of *D. setosum* using rabbit anti-TNF- α antibodies (Fig. 1) show that TNF- α activated cells were brown, while the cells that are not activated TNF- α were blue. The cells undergoing the activation of TNF- α protein seem to spread and form clusters of cells. This brown cell morphology reflects the activation of TNF- α protein that occupies the cytoplasm and the nucleus of *D. setosum* liver cells. It can be seen that the higher the concentration of Cd exposure can affect liver cells so that the cell is brown. This brown color shows the activation of TNF- α protein. This means that the concentration of heavy metal Cd tends to increase the activation of TNF- α protein.

Concentration and Expression of TNF- α Protein *Diadema setosum* due to heavy metal exposure. The concentration of TNF- α protein by ELISA reader (Table 1) measurement showed an increase in concentration with the increasing exposure to heavy metals Cd. It can be seen that the levels of TNF- α protein concentrations increase from low to high, that is, in basin 1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6. On the other hand, the results of the analysis of variance (Table 2) indicate that the concentrations of Cd show a significant influence on the concentration of TNF- α protein in the liver of *D. setosum*, with the value of $F = 7.961$ and $p = 0.000$. In addition, the results of Duncan test with $\alpha = 0.01$ (Table 3) show that there is a significant difference in the concentrations of heavy metals Cd of 0.0 (control), 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, and 12.0 μ g/L Cd on the concentration of TNF- α protein in the liver of *D. setosum*.

Table 1. The mean concentrations of TNF- α protein in 6 treatment basins of the concentration of Heavy Metal Cd

Heavy metals Cd concentration at 6 treatment basins (μ g/L)	The mean concentrations of TNF- α protein (ng/ml)	
	Mean	Standard deviation
0.00 (Control)	152.60	24.50
1.0	167.83	19.73
3.0	212.36	65.45
6.0	227.60	72.51
9.0	239.74	55.06
12.0	297.71	37.83

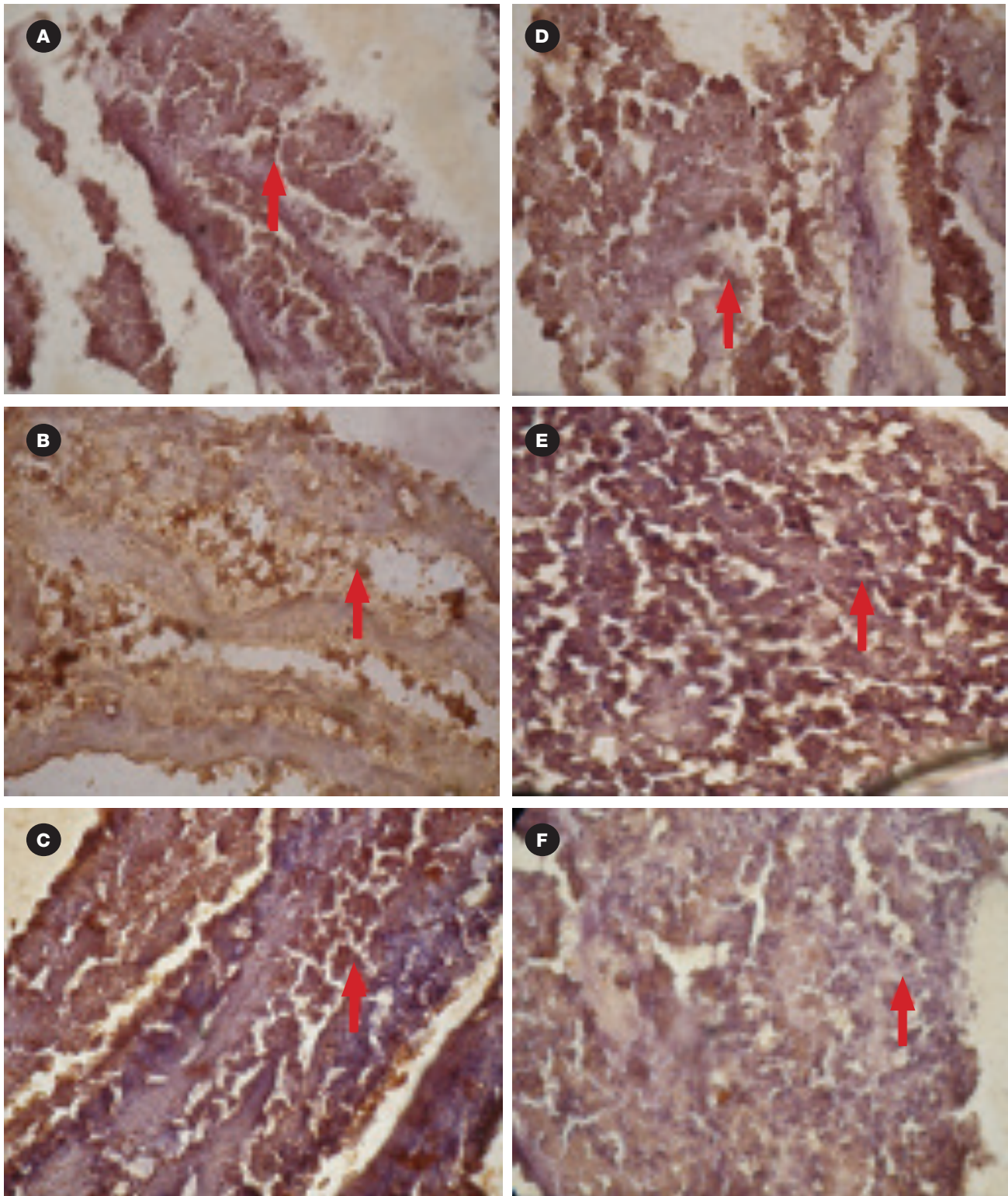


Figure 1. The results of immunohistochemical smearing using rabbit anti-TNF- α antibody in liver tissues of *Diadema setosum*. Observations with Olympus microscope slides for shooting four dots with 400x magnification zoom. Image with Notation: A) control; B) concentration of 1.0 $\mu\text{g/L}$ Cd; C) the concentration of 3.0 $\mu\text{g/L}$ Cd; D) concentration 6.0 $\mu\text{g/L}$ Cd; E) concentration of 9.0 $\mu\text{g/L}$ Cd; and F) concentration of 12.0 $\mu\text{g/L}$ Cd. The arrows show the liver cells where the TNF- protein is activated the brown signal.

Table 2. The results of ANOVA, effect of heavy metal Cd concentration on the TNF- α protein concentration in the liver of *D. setosum*

Source variance		Sum of squares	df	Mean square	Value F	Sig. (P-value)
Concentration TNF- α protein	Between Groups	96096.826	5	19219.365	7,691	.000
	Within groups	89964.584	36	2499.016		
	Total	186061.410	41			

The observed differences in the group of Cd concentration levels showed the effect of the exposure of Cd concentration levels on the concentrations of TNF- α protein in the liver of *D. setosum*. The concentration of Cd significantly increases the concentrations of TNF- α protein. This shows that the higher the concentration of Cd exposed can increase the concentration of TNF- α protein of the *D. setosum*. On the other hand, the expression of TNF- α protein based on the results of western blotting test (Figure 2) revealed that the TNF- α protein was colored by the rabbit anti-TNF- α antibody with the molecular weight of 33.57 kDa if the protein tape is the TNF- α protein. Figure 2 also showed increased expression with higher exposure to the concentration of heavy metals Cd.

Table 3. Duncan test results of the ANOVA there is a significant effect of the concentration of heavy metals Cd on the concentration of TNF- α protein in the liver of *Diadema setosum*

Concentration of heavy metals Cd	The mean concentrations of TNF- α protein in liver of <i>D. setosum</i>	Notation Duncan
0.00 (control)	1.52595E2	a
1.0	1.67833E2	a b
3.0	2.12357E2	a b
6.0	2.27595E2	a b c
9.0	2.39738E2	b c
12.0	2.97714E2	c

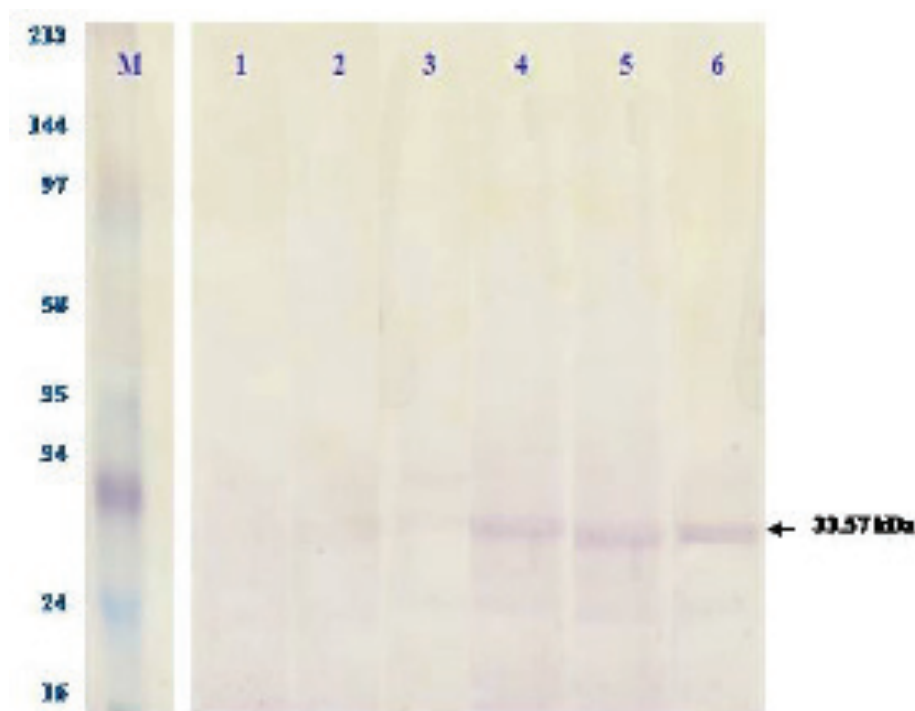


Figure 2. TNF- α protein expression by western blotting test on the liver of *Diadema setosum* at 6 treatment basins of heavy metal Cd concentration. The gel results of electrophoresis SDS-PAGE were performed western blotting test, that is, by incubating it with monoclonal antibody rabbit anti-TNF- α as a primary antibody and secondary rabbit anti IgG biotin. Shown in the top row of the concentration levels at 6 treatment basins, the purplish-brown tape is TNF- α protein marked with arrows. M: marker, 1 to 6: Cd concentration at 6 treatment basins.

DISCUSSION

The concentration of Cd which became higher caused changes in cell tissue, and it was related to the protective strategy of *D. setosum* to combat stress due to the accumulation of Cd. This is evidenced by the growing activation of TNF- α protein of *D. setosum* with the higher concentrations of heavy metals Cd. It has been shown that the induction of Cd can trigger histopathological changes and cause disturbances in the lipid composition so that the macrophages will release TNF and increases oxidative stress in the liver organ (Faix *et al.*, 2005; Smiri *et al.*, 2010). Besides, cadmium can lead to osteoporosis, and it is generally deposited in the liver, kidney and damage the functioning of the brain, lungs (Ohta *et al.*, 2000; Johri *et al.*, 2010; Jaishankar *et al.*, 2014).

In the present study, we found a remarkable increase in the TNF- α levels in the *D. setosum* tissue of the liver after Cd exposure. Quantitatively, the ELISA test (Table 1) shows that the concentrations of TNF- α protein increase along with the increasing exposure to the concentration of Cd. Semi quantitatively, the western blotting test (Fig. 2) shows that the expression of TNF- α protein increases along with the increasing exposure of the concentration of Cd. This means that the higher the concentration of TNF- α protein effected the thicker the tape showing the expression of the protein. The concentration of the TNF- α protein at the concentration (of 12 $\mu\text{g/L}$ Cd) treatment was the highest, which was almost 5 times compared to the controls, with the highest level of expression. The description of the expression of TNF- α protein based on western blotting is following each concentration of the TNF- α protein recorded, and consistent with these findings is that the metals may affect the expression of TNF- α and, hence, disturb the cell metabolism of organisms (Marth *et al.*, 2001). On the other hand, Cd exposure also significantly elevated the level of TNF- α in the intestine of microbiota (Liu *et al.*, 2014). This means that Cd addition has an anti-proliferative and anti-inflammatory effect when associated with TNF- α stimulation. According to Goetz *et al.* (2004) and Min *et al.* (1998), TNF- α is involved in a variety of cellular activities as cell proliferation, differentiation, and cell death. In addition, the results of the analysis of variance (Table 2) showed that the concentrations of heavy metals Cd had a very significant effect ($p < 0.05$) on the concentration of TNF- α protein in the liver organ of *D. setosum*, which is consistent with this finding is that lead metal causes a significant increase in the levels of TNF- α and caspase-3 in the liver when compared to controls ($p < 0.05$) (Ponce-Canchihamán *et al.*, 2010). On the other hand, Cd exposure significantly increased plasma TNF- α and IL-6 levels in mice ($p < 0.001$) compared to normal mice (Alghasham *et al.*, 2013). Besides, the increased oxidative stress causes interference with the permeability of the mitochondrial membrane, causing the cytochrome-c release from mitochondria to the cytoplasm so that it binds to Apaf-1, and activates the cascade, which causes cell death (Chu, 2013; Gulbins *et al.*, 2003; Reed, 2000).

The concentration and expression of TNF- α protein as a molecular response was caused by the accumulation of heavy metal Cd. Kersshaw & Flier (2004) explained that TNF- α is a cytokine produced by macrophage cells and if the levels within the cell increase, they can be associated with the mechanism to suppress the oxidation process in the liver.

The exposure to Cd increases the production of TNF- α , and it is associated with the molecular response in the form of activation, expression, and concentrations of TNF- α *D. setosum* which caused by

the exposure to Cd. Abbas *et al.*, (2000) described that when the cells undergoing severe infection, TNF- α is produced in large quantities and can cause a pathological state. The results in the form of concentration and expression of TNF- α protein are a biomolecular response due to the exposure to heavy metals Cd. The response is a defensive mechanism against oxidative stress caused by exposure to heavy metals Cd.

The results of the study revealed that the higher the concentration of heavy metals Cd exposed can increase the macrophage cells produce TNF- α so that the concentration and expression of TNF- α protein in the cell. The increased TNF- α triggers the formation of NO (nitric oxide) by activating iNOS to convert L-arginine into 2 NO molecules and causes oxidative stress (Gulbins *et al.*, 2000; Machida *et al.*, 2006). This proves that the concentration and expression of TNF- α protein can be molecular markers of oxidative stress caused by the exposure to heavy metals Cd on *D. setosum* can be used as biomonitoring species of heavy metals Cd in the waters.

CONCLUSION

Biomolecular response in the form of activation, concentration, and the expression of TNF- α protein in the liver of *D. setosum* due to the exposure to heavy metals Cd showed that concentration of TNF- α protein increased when the concentration of heavy metals Cd exposed increased. The occurrence of the increased expression with higher exposure to the concentrations of heavy metals Cd was characterized by the thicker tape of TNF- α protein based on the results of western blotting test. The research results on the concentration and expression of TNF- α protein could serve as a biomonitoring model of the exposure to heavy metals Cd at the molecular level using *D. setosum* as biomonitoring species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank the Head laboratory of Research Center for Deep Sea, The Indonesian Institute of Sciences Ambon with staff, to the Head of the Laboratory of Physiology of the Medicine Faculty, Brawijaya University and the staffs who have provided the facilities for the author to conduct this research until the final stages of writing this article. The author also thanks to the Directorate General of Higher Education which has provided BPPS to the author to finish the Doctoral Program (S3) Biology Education at the Graduate Program, State University of Malang year 2010/2011, and to the reviewer who has corrected this article.

REFERENCES

- ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN & S. PILLAI. 2000. *Inmunología Celular y Molecular*. Filadelfia: Elsevier Saunders. 608 p. DOI: 10.1016 / B978-1-4160-3123-9.50020-6
- ALGHASHAM, A., T. A. SALEM & A. R. M. MEKI. 2013. Effect of cadmium-polluted water on plasma levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and oxidative status biomarkers in rats: protective effect of curcumin. *Food and Chemical Toxicology* 59: 160-164. DOI: 10.1016/J.FCT.2013.05.059
- ARAI, T., F. RAHMAN, N. CHINO & A. ISMAIL. 2012. Heavy metal concentrations in a tropical EEL *Anguilla bicolor bicolor* in Peninsular Ma-

- aysia, Malaysia. *Malaysian Applied Biology* 41 (1): 43-46. DOI: 10.1111/J.1095-8649.2011.03154.X
- ASHRAF, W. 2005. Accumulation of heavy metals in kidney and heart tissues of *Epinephelus microdon* fish from the Arabian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment* 101 (1-3): 311-316. DOI: 10.1007/s10661-005-0298-4
- CAVALCANTI, Y. V. N., M. C. A. BRELAZ, J. K. DE ANDRADE LEMOINE NEVES, J. C. FERRAZ & V. R. A. PEREIRA. 2012. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulmonary Medicine* 745483: 1-10. DOI: 10.1155/2012/745483
- CHATTERJEE, S., S. SARKAR & S. BHATTACHARYA. 2014. Toxic Metals and Autophagy. *Chemical Research in Toxicology* 27 (11): 1887-1900. DOI: 10.1021/tx500264s
- CHIARELLI, R. & M. C. ROCCHERI. 2012. Heavy Metals and Metalloids as Autophagy Inducing Agents: Focus on Cadmium and Arsenic. *Cells* 1: 597-616. DOI: 10.3390/cells1030597
- CHU, W. M. 2013. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters* 328 (2): 222-225. DOI:10.1016/j.canlet.2012.10.014
- DERMECHE, S., F. CHAHROUR & Z. BOUTIBA. 2012. Evaluation of the toxicity of metal pollutants on embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata Echinoidea). *Biodiversity Journal* 3 (3): 165-172.
- FAIX, S., Z. FAIXOVA, K. BOLDIZAROVA & P. JAVORSKY. 2005. The effect of long-term high heavy metal intake on lipid peroxidation of gastrointestinal tissue in sheep. *Veterinární medicína* 50 (9): 401-405.
- GOETZ, F.W., J.V. PLANAS & S. MAC KENZIE. 2004. Tumor necrosis factors. *Developmental & Comparative Immunology* 28 (5): 487-97. DOI: 10.1016/j.dci.2003.09.008
- GULBINS, E., S. DRESCHERS & J. BOCK. 2003. Role of mitochondria in apoptosis. *Experimental Physiology* 88: 85-90. DOI: 10.1113/EPH8802503
- GULBINS, E., A. JEKLE, K. FERLINZ, H. GRASSME & F. LANG. 2000. Physiology of apoptosis. *American Journal Physiology Renal Physiology* 279: 605-615. DOI: 10.1152/AJPRENAL.2000.279.4.F605
- JAISHANKAR, M., T. TSETEN, N. ANBALAGAN, B. B. MATHEW & K. N. BEEREGOWDA. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7 (2): 60-72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009
- JOHRI, N., G. JACQUILLET & R. UNWIN. 2010. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biology of Metals* 23 (5): 783-792. DOI: 10.1007/s10534-010-9328-y
- JUNG, M. Y. & Y. M. LEE. 2012. Expression profiles of heat shock protein gene families in the monogonont Rotifer *Brachionus koreanus* - Exposed to copper and cadmium. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 4 (4): 235-242. DOI 10.1007/s13530-012-0141-6
- KERSSHAW, E. E. & J. S. FLIER. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 2548-2556. DOI: 10.1210/jc.2004-0395
- LEQUIN, R. M. 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51 (12): 2415-2418. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532
- LIU, Y., Y. LI, K. LIU & J. SHEN. 2014. Exposing to Cadmium Stress Cause Profound Toxic Effect on Microbiota of the Mice Intestinal Tract. *PLoS ONE* 9(2): e85323. DOI:10.1371/journal.pone.0085323
- LIU, W., L. SUN, M. ZHONG, Q. ZHOU, Z. GONG, P. LI, P. TAI & X. LI. 2012. Cadmium-induced DNA damage and mutations in Arabidopsis plantlet shoots identified by DNA fingerprinting. *Chemosphere* 89: 1048-1055. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.068
- LÓPEZ-BOJÓRQUEZ, L. N., A. Z. DEHESA & G. REYES-TERÁN. 2004. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research* 35 (6): 465-479. DOI: 10.1016/j.arcmed.2004.07.006
- MACHIDA, K., K. T. H. CHENG, C. K. LAI, K. S. JENG, V. M. H. SUNG & M. M. C. LAI. 2006. Hepatitis C Virus Triggers Mitochondrial Permeability Transition with Production of Reactive Oxygen Species, Leading to DNA Damage and STAT3 Activation. *Journal of Virology* 80 (14): 7199-7207. DOI: 10.1128/JVI.00321-06
- MARTH, E., S. JELOVCAN, B. KLEINHAPPL, A. GUTSCHI & S. BARTH. 2001. The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 14 (4): 375-386.
- MIN, Y. G., C. S. RHEE & S. H. KWON. 1998. Effects of IL-1 α , TNF- α , and TGF- α on Proliferation of Human Nasal Epithelial Cells in Vitro. *American Journal of Rhinology and Allergy* 12 (4): 279-82. DOI:10.2500/105065898781390064
- MOLNAR, N. & P. P. FONG. 2012. Toxic Effects of Copper, Cadmium, and Methoxychlor Shown by Neutral Red Retention Assay in Two Species of Freshwater Molluscs. *Environmental Pollution & Toxicology Journal* 3: 65-71. DOI: 10.2174/1876397901203010065
- OHTA, H., Y. YAMAUCHI, M. NAKAKITA, H. TANAKA, S. ASAMI, Y. SEKI & H. YOSHIKAWA. 2000. Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Industrial Health* 38 (4): 339-355. DOI: 10.2486/indhealth.38.339
- PONCE-CANCHIHUAMÁN, J. C., O. PÉREZ-MÉNDEZ, R. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. V. TORRES-DURÁN & M. A. JUÁREZ-OROPEZA. 2010. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in Health and Disease* 9 (35): 1-7. DOI: 10.1186/1476-511X-9-35
- REED, J. C. 2000. Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* 157 (5): 1415-1430. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7
- RUMAHLATU, D., A. D. COREBIMA, M. AMIN & F. ROHMAN. 2012. Kadmium dan Efeknya terhadap Ekspresi Protein Metallothionein pada *Deadema setosum* (Echinoidea; Echinodermata) [Cadmium and its effect on the expression of Metallothionein protein in *Deadema setosum* (Echinoidea; Echinodermata)]. *Jurnal Penelitian Perikanan* 1 (1): 26-35.

- SARY, A. A. & M. MOHAMMAD. 2012. Comparison of mercury and cadmium toxicity in fish species from marine water. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 7 (1): 14-18.
- SHIMODA, R., W. W. ACHANZAR, W. QU, T. NAGAMINE, H. TAKAGI, M. MORI & M. P. WAALKES. 2003. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicological Sciences* 73: 394-300. DOI: 10.1093/toxsci/kfg095
- SMIRI, M., A. CHADUI & E. E. FERJANI. 2010. Interaction between heavy metals and thiol-linked redox reactions in germination. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13 (18): 877-883. DOI: 10.3923/pjbs.2010.877.883
- SWAROOP, J. J., D. RAJAJESWARI & J. N. NAIDU. 2012. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The Indian Journal of Medical Research* 135: 127-130. DOI: 10.4103/0971-5916.93435
- VALKO, M., H. MORRIS & M. T. D. CRONIN. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161-1200. DOI: 10.2174/0929867053764635
- WEI, Z. 2013. Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Study Cadmium-Induced Changes in *Strongylocentrotus nudus* gonad. *Life Science Journal* 10 (1): 269-276. DOI: 10.1155/2015/570190
- WHO. 2007. *Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution*. Publications: WHO Regional Office for Europe Scherfigsvej 8 DK-2100 Copenhagen O, Denmark. 129 p.
- YOUNG, J. & M. HONGBAO. 2010. Practical Technique of Western Blotting. *The Journal of American Science* 4 (2): 1-3.

Reproductive biology of *Pterois volitans* in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba

Biología reproductiva de *Pterois volitans* en la Reserva de la Biosfera Baconao, sur de Cuba

Yoendry A. Paz-Rodríguez^{1,2}, Marcial T. Villalejo-Fuerte², Ernesto A. Chávez², Jorge A. Tamayo-Fonseca¹, Axel Campo-Castro¹ & Nurenskaya Vélez-Arellano³

Recibido: 27 de agosto de 2019.

Aceptado: 08 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

Background: *Pterois volitans* Linnaeus 1758 is an invasive exotic species established in the Atlantic and Caribbean, threatening the native marine biodiversity. It has led to reduced recruitment and biomass of small reef fish of ecological interest, altering the fish community structure by reducing the number of herbivores. In Cuba, it was first reported in 2007. **Goals:** This research aims to characterize the reproductive biology of *P. volitans* in the western part of the Baconao Biosphere Reserve, in southern Cuba. **Methods:** Sampling was carried out monthly from April 2012 to May 2013 (n = 535 fish). Total length (L_T , cm), total mass (M_T , g), and weight of the liver, gonads, and abdominal fat were recorded for each individual. To analyze spawning, the gonadosomatic (I_G) and hepatosomatic indices (I_H) were determined. **Results:** Mean size and weight of adults were 26.8 cm and 290.9 g, respectively. The size structure revealed that females are dominant in lengths of 22-31 cm, whereas males dominate from 31 cm onwards. The sex ratio was 1:1. I_G showed seasonal spawning peaks between March and May 2013. No significant differences were observed amongst monthly means, but I_H monthly means and monthly rates of abdominal fat showed significant differences. The size at first maturity was 30.07 cm in males and 26.2 cm in females. **Conclusions:** The results of this study suggest that the lionfish *P. volitans* shows an asynchronous reproductive cycle characterized by high gonadal index values during the breeding season and an inverse trend of I_H and I_F , suggesting that the liver and body fat store nutrients for use in reproduction.

Key words: gonadosomatic index, invasive exotic species, size of first maturity, protected areas, sex ratio.

RESUMEN

Antecedentes: *Pterois volitans* Linnaeus 1758 es una especie exótica invasora establecida en el Atlántico y el Caribe que amenaza la biodiversidad marina nativa. En consecuencia, su presencia ha reducido el reclutamiento y la biomasa de los peces pequeños del arrecife de interés ecológico, alterando la estructura de la comunidad al reducir el número de herbívoros. En Cuba, se informó de su presencia por primera vez en 2007. **Objetivos:** Esta investigación tiene como objetivo caracterizar la biología reproductiva de *P. volitans* en la zona occidental de la Reserva de la Biosfera Baconao, costa sur oriental de Cuba. **Métodos:** El muestreo se realizó mensualmente de abril de 2012 a mayo de 2013 (n = 535 peces). A cada pez capturado se le registró la longitud total (L_T , cm), peso total (M_T , g), peso del hígado (g), gónadas (g) y grasa abdominal (g). Para analizar la época de desove, se determinaron los índices gonádico-somático (I_G) y hepático-somático (I_H). **Resultados:** La talla promedio fue 26.8 cm con un peso medio de 290.9 g. La estructura poblacional, revela que las hembras son dominantes en longitudes que van desde 22-31 cm y los machos a partir de los 31 cm. La proporción de sexos fue de 1:1. EL I_G mostró picos estacionales de desove, entre (marzo y junio), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las medias mensuales, pero sí entre las medias mensuales del I_H y el índice de grasa abdominal. La talla de primera madurez se determinó en los machos de 30 cm y en las hembras de 26.2 cm. **Conclusiones:** Los resultados de este estudio indican que el pez León *P. volitans* tiene un ciclo reproductivo asincrónico, con altos valores del índice gonadosomático durante el periodo reproductivo y con una tendencia inversa con el I_H y el I_F , lo que sugiere que el hígado y la grasa del cuerpo contienen nutrientes que se utilizan durante el periodo reproductivo.

Palabras claves: índice gonadosomático, especies exóticas invasoras, talla de primera madurez área protegidas, proporción de sexos.

¹ Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad. Museo de Historia Natural "Tomas Romay". José A. Saco 601, Santiago de Cuba, 90100. Cuba.

² Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av. IPN s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, El Conchalito. La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

³ Centro Regional de Investigaciones Acuicolas Pesqueras, Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. La Paz, Km 1 Carretera Pichilingue s/n Col. Esterito, La Paz, Baja California Sur, 23020. México.

*Corresponding author:

Marcial T. Villalejo-Fuerte: e-mail: mvillale@ipn.mx

To quote as:

Paz-Rodríguez Y. A., M. T. Villalejo-Fuerte, E. A. Chávez, J. A. Tamayo-Fonseca, A. Campo-Castro & N. Vélez-Arellano. 2019. Reproductive biology of *Pterois volitans* in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba. *Hidrobiológica* 29 (3): 189-196.

INTRODUCTION

The invasion of lionfish *Pterois volitans* Linnaeus, 1758 and *P. miles* (Bennett, 1828) in the northwest Atlantic and the Caribbean is one of the fastest invasions of marine fish recorded in history (Morris *et al.*, 2008). These species are considered as established in these seas (Morris *et al.*, 2009; Schofield, 2009; Schofield, 2010).

Lionfish are a major concern for managers of marine protected areas, governments, and local communities, and their impacts as predators affect the reef fauna, particularly the fish community (Albins & Hixon, 2008). *P. volitans* is far more abundant than *P. miles*; therefore, current research is focused on the former species. It has been determined that the lionfish is able to cause a 79% reduction in the recruitment of forage fish (Whitfield *et al.*, 2007), which play a key role contributing to maintain the equilibrium in the algae-coral relationship. Meanwhile, Green *et al.* (2012a) reported biomass reductions in 65% of 42 species of small reef fish. Other authors have also documented the predatory impact of this species on the reef (Green & Côté, 2009; Brown *et al.*, 2009; Santander-Monsalvo *et al.*, 2012). From the economic viewpoint, impacts of lionfish are expected on fisheries and in the reduction of reef fish that are major attractions for tourism, thus deserving evaluation.

The first confirmed record of lionfish in Atlantic waters occurred in Florida, where a specimen was collected in October 1985 (Morris & Akins, 2009). Since 1992, lionfish were observed in Palm Beach, Boca Raton, and Miami, Florida; since 2000, they were recorded in North Carolina, South Carolina, Georgia, and Bermuda (Whitfield *et al.*, 2002; Hare & Whitfield, 2003; USGS, 2004; Reef, 2008). The species continued to expand rapidly in the Atlantic and the Caribbean (Schofield, 2009) as well as in the Gulf of Mexico (Brown & Ruiz-Carus, 2006; Aguilar-Perera *et al.*, 2012; Santander-Monsalvo *et al.*, 2012).

In Cuba, lionfish were first reported in 2007 off the coast of Santiago de Cuba, near the Aquarium of Baconao (Chevalier *et al.*, 2008), and rapidly colonized the rest of the coast, to the extent that since 2010, it was considered as a well-established species in the country.

The seasonality of lionfish reproduction throughout its natural range is unknown (Morris *et al.*, 2008). Ruiz-Carus *et al.* (2006) stated that this species may have been breeding in Florida during the first months of the year; their rapid colonization of other areas led to suspect that reproduction may occur throughout the year under suitable conditions (Morris *et al.*, 2009).

Therefore, this study was designed to fulfill the scarce information on the breeding process of lionfish in Cuba and the need to address recommendations to control their populations aiming to minimize their impacts on local reefs. Specific goals were to determine (1) seasonality of spawning, and (2) minimum recruitment size at first reproduction. With these results, we expect to provide data that will support the development of proposals to address lionfish management in the Baconao Biosphere Reserve.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The selection of the study area followed criteria based on the monitoring protocol for the study of lionfish in Cuba (Acuario Nacional de Cuba, 2011). A site encompassing 10 km of coastline in the eastern sector of the Baconao Biosphere Reserve was selected (Fig.

1), including the Siboney-Jutici Ecological Reserve, one of the five core conservation areas of this biosphere reserve. As sampling biotope (1 km scale), spur and groove sites of coral reef were selected at a 0.1 km scale, considering access to the coast.

This area is characterized by a coast of tectonic origin, with no platform, but with abundant submarine terraces, where coral reef grows at short distance from the coastline (100-200 m in some areas). The surface sea current runs from east-to-west with a maximum speed of 50 cm·s⁻¹. Salinity is stable, with values slightly above 36 ppt (Ionin *et al.*, 1977). Sea surface temperature fluctuates around 27.6°C across the entire area (García, 1989).

Capture method. Sea lionfish catches were performed on a monthly basis, from April 2012 until May 2013; the only exception was November 2012 because of the impact of Hurricane Sandy in Santiago de Cuba. Catches were carried out with scuba-diving equipment at 15 to 30 m depth by dive computer Mares Puck Pro®. Fish were collected by speargun fishing, and all the animals sighted during diving were caught, regardless of fish size. On the surface, fish were placed in a cooler chest and transported to the laboratory at the Siboney-Jutici Ecological Reserve, where they were kept refrigerated and processed within 24 hours.

Data collection. Total length (L_T , cm) of each fish was measured with a board to the nearest 1 cm. Total weight (M_T , g) was recorded with a dynamometer to the nearest 1 g (± 1 g weight error). Then, fish were dissected by following the procedures detailed in Green *et al.* (2012b). The Kruskal-Wallis test was run to test for differences between monthly medians of both total length and total weight. The significance level applied was $\alpha=0.05$. The weight of gonads, liver, and fat were recorded with an analytical balance (to the nearest 0.001 g). The U Mann-Whitney test was used to explore the statistical significance of differences in size between males and females. A Chi-square test ($\alpha = 0.05$) was used to determine significant differences between months.

Data processing to determine the breeding season. To determine the breeding season, the gonadosomatic index was calculated using the following equation:

$$I_G = (M_G / M_T) 100 \text{ (Maddock \& Burton, 1998).}$$

where:

$$I_G = \text{Gonadosomatic index.}$$

$$M_G = \text{Weight of both gonads (g).}$$

$$M_T = \text{Total weight without stomach content (g).}$$

Mean monthly IG values were plotted to determine the peak of spawning, when this index decrease in an annual cycle.

The hepatosomatic index (I_H) was used as a quantification of cyclical changes in accumulation of reserves.

$$I_H = (LM / M_T) 100 \text{ (Maddock \& Burton, 1998)}$$

where:

$$I_H = \text{Hepatosomatic index}$$

$$LM = \text{Liver weight (g)}$$

$$M_T = \text{Total fish weight (g)}$$

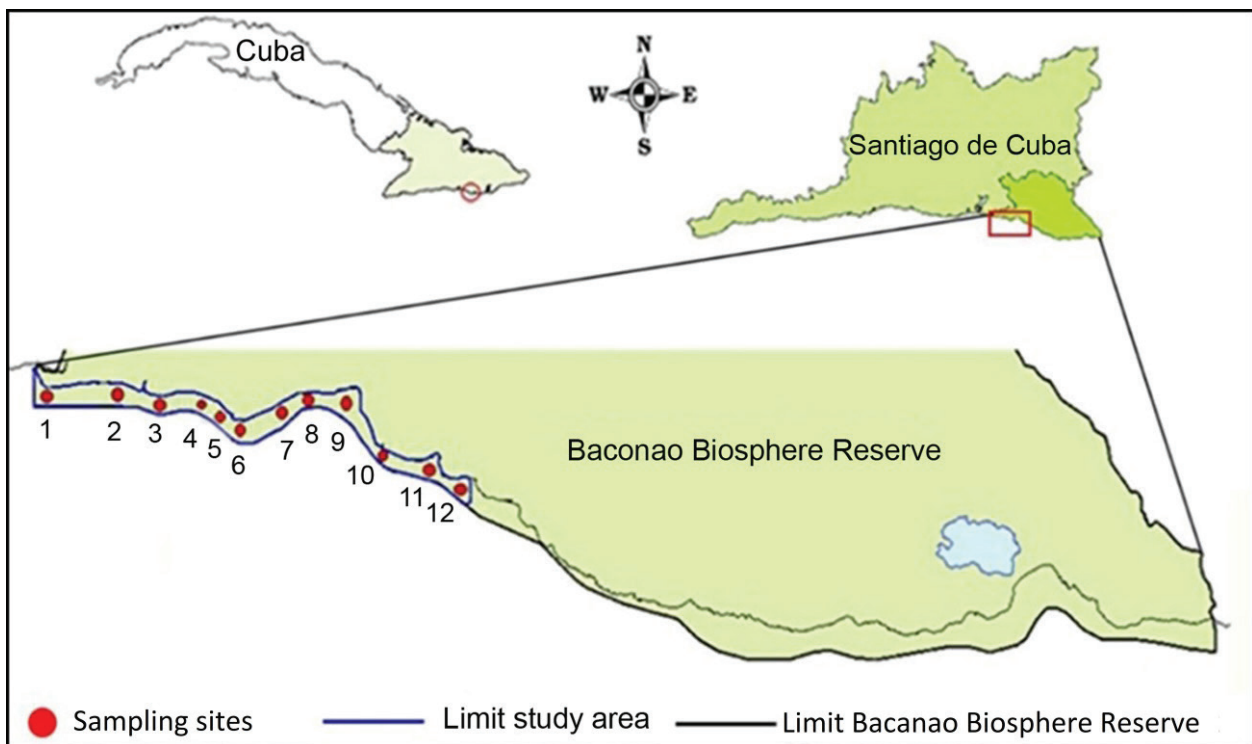


Figure 1. Study area in the Baconao Biosphere Reserve, south-eastern coast of Cuba. 1. Aguadores Este; 2. Sardinero Oeste; 3. Sardinero Este; 4. El Mangle; 5. Jutici Oeste; 6. Jutici Este; 7. Caballo Blanco; 8. La Cantera; 9. Playa Siboney; 10. Bucanero; 11. Playa Juraguá; 12. Playa Damajayabo.

Additionally, a body fat index was determined, as this is a reserve substance that accumulates before the onset of breeding; the following formula was applied:

$$I_F = (MF / M_T) 100$$

where:

I_F = Fat somatic index

MF = Weight of fat (g)

M_T = Total weight of fish (g)

Data processing of average size at maturity. Organisms in the maturity, spawning and post-spawning stages (It was determined based in GDS III, IV, V, and VI according to Morris *et al.* (2011) and Priyadharsini *et al.* (2013), regardless of sex) were used to estimate the size at first maturity ($L_{0.5}$) defined as the length at which 50% of organisms are sexually mature. Results were plotted and fitted to a logistic function not linear (Gaertner & Laloe, 1986; Sparre & Venema, 1997).

$$H_p = \frac{1}{1 + e^{a+b \cdot L_i}} \quad (1)$$

Where:

H_p : Percentage of sexually mature individuals corresponds to:

$$L_{0.5} = a / b \quad (2)$$

RESULTS

We caught a total of 535 individuals with an average size of 26.8 (standard deviation SD = 2.1 cm). The mean total weight was 290.6 g (SD = 197.6). The largest and smallest fish caught were 42.2 cm and 13.8 cm, respectively. In general, individuals over 35 cm were found at depths greater than 30 m, while fish under 10 cm were observed at depths of less than 10 m. To note, the latter were not collected.

The Kruskal-Wallis test showed significant differences between the monthly medians of total length (K-W = 58913, $p < 0.001$) and total weight (K-W = 53936, $p < 0.001$). Females had a mean total length of 24.7 cm (SD = 3.9) and a mean weight of 207.8 g (SD = 96.1); males reached a mean length of 29.5 cm (SD = 6.1) and a mean weight of 382.1 g (SD = 231.3). The largest fish caught was a 42.3 cm long male weighing 1600 g, while the smallest (undifferentiated) measured 13.8 cm and weighed 10 g.

The microscopic examination of all fish caught showed that 218 fish were females and 233 were males; however, sex could not be determined in 84 fish (Fig. 2). In the remaining specimens, gonads were either damaged or immature, thus precluding the identification of the sex. The Chi-square test ($X^2 = 0.499$, $p = 0.480$) showed a 1:1 (F:M) sex ratio; only in May 2012, when 27 males and 13 females were sampled, there was a significant difference ($X^2 = 4.225$, $p = 0.03983$).

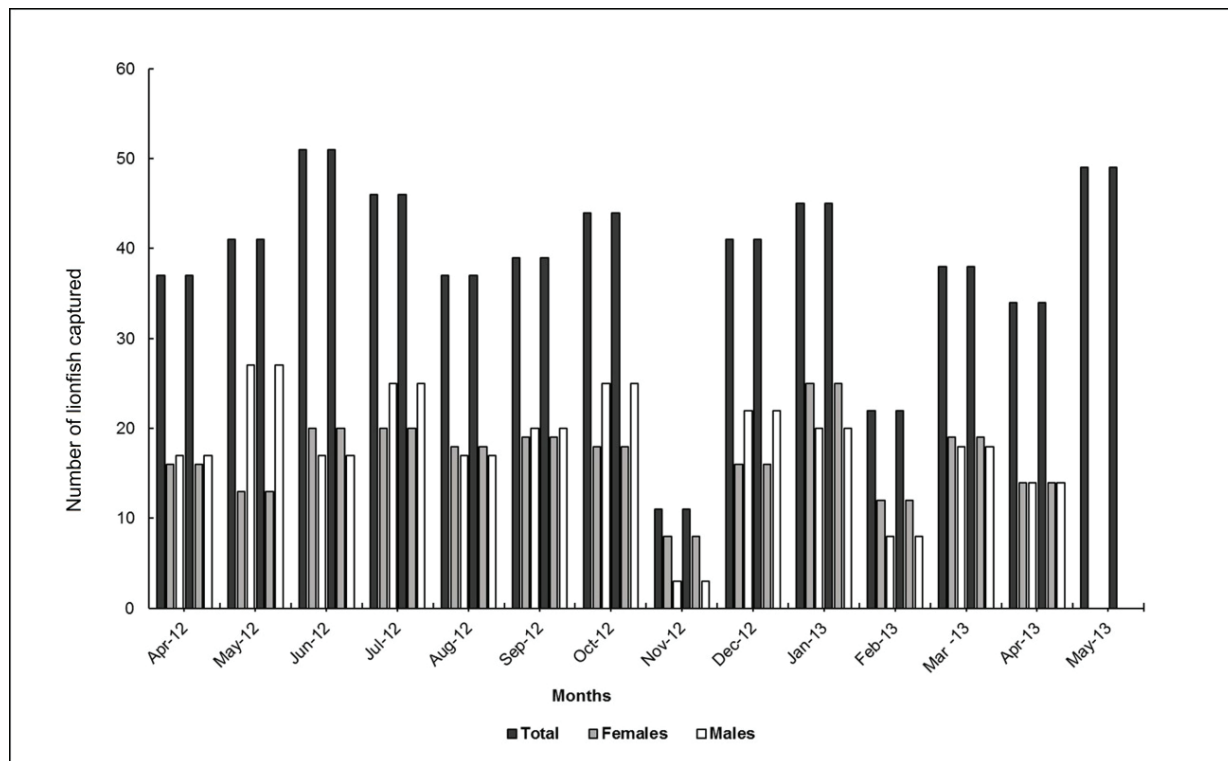


Figure 2. Number of lionfish captured during the sampling period. Baconao Biosphere Reserve, south-eastern coast of Cuba. April 2012 to May 2013.

The size structure by sex revealed that females were mostly in the 22-31 cm size range, while males dominate from 31 cm onward (Fig. 3). In this regard, significant differences in size between males and females were found (U Mann-Whitney: $U = 18161.00 [L_r]$, $U = 13157.50 [M_r]$; $p < 0.001$).

Breeding season. The female GI values show a small decrease from April to June 2012 (4.5 to 2.8) and from March to May 2013 (5.6 to 3.9), which indicates reproductive activity. Males and undifferentiated were not considered since they did not show significant variation (Fig 4 A). Opposite trends were observed between the hepatosomatic index (I_h) and the body fat index (I_f) (Figs. 4 B y C), as well as between each of these two indices with I_g , during spring and summer; also, significant differences were observed in this indices throughout the study period ($X^2(I_h) = 82.693$, $p < 0.001$; $X^2(I_f) = 54.818$, $p < 0.001$).

Recruitment size at reproduction. The size at first maturity of females was 26.2 cm ($a = 11.406$; $b = 0.4352$); for males, it was 30.07 cm ($a = 10.94$; $b = 0.36$). The smallest mature female was 17.5 cm; the smallest male, 17.9 cm (Fig. 5).

DISCUSSION

Mean total length of the fish caught during this study is similar to the mean value reported in the reefs of Santa Marta, Colombia (24.8 cm; González *et al.*, 2011). On the other hand, Froese and Pauly (2018) reported a maximum length of 35 cm, which is lower than the length

of the largest fish caught in this study (42.2 cm), and similar to the maximum length reported by Baker *et al.* (2004) in North Carolina (43 cm). The observations in this work highlight the presence of small fish at shallow depths and larger fish at deeper depths, suggesting segregation according to size across the water column, which opens up a new line of research for future studies. Similarly, the predominance of females in sizes between 15-28 cm at a depth around 25 m suggests a possible bathymetric segregation by sex, as males >30 cm in length prevail beyond 30 m depth, as observed in Turks and Caicos Islands, Bahamas, and in Roatán, Honduras (Claydon *et al.*, 2012; Babour *et al.*, 2010; Biggs & Olden, 2011).

Variations in I_g values suggest an asynchronous reproductive cycle, which is consistent with the findings reported by Morris (2009) in waters of North Carolina, South Carolina, and the Bahamas. This reproductive profile partially explains the rapid dispersal, invasion, and colonization of lionfish in the Caribbean and Atlantic, as a result of the favorable environmental conditions (Morris, 2009; Morris *et al.*, 2011). These include the presence of abundant food for adults, ensuring gonad development at a proper temperature (27.6 °C) (García, 1989) in the study area, known to have a positive effect on reproduction in this species. This temperature is well above the temperature limiting the development of this species, as determined by Kimball *et al.* (2004) (feeding stops at 16.1 °C; 10 °C is lethal). A factor closely related to temperature is photoperiod, also showing little variation in tropical latitudes; both factors contribute to constant food availability (<https://searchworks.stanford.edu/view/1077428>).

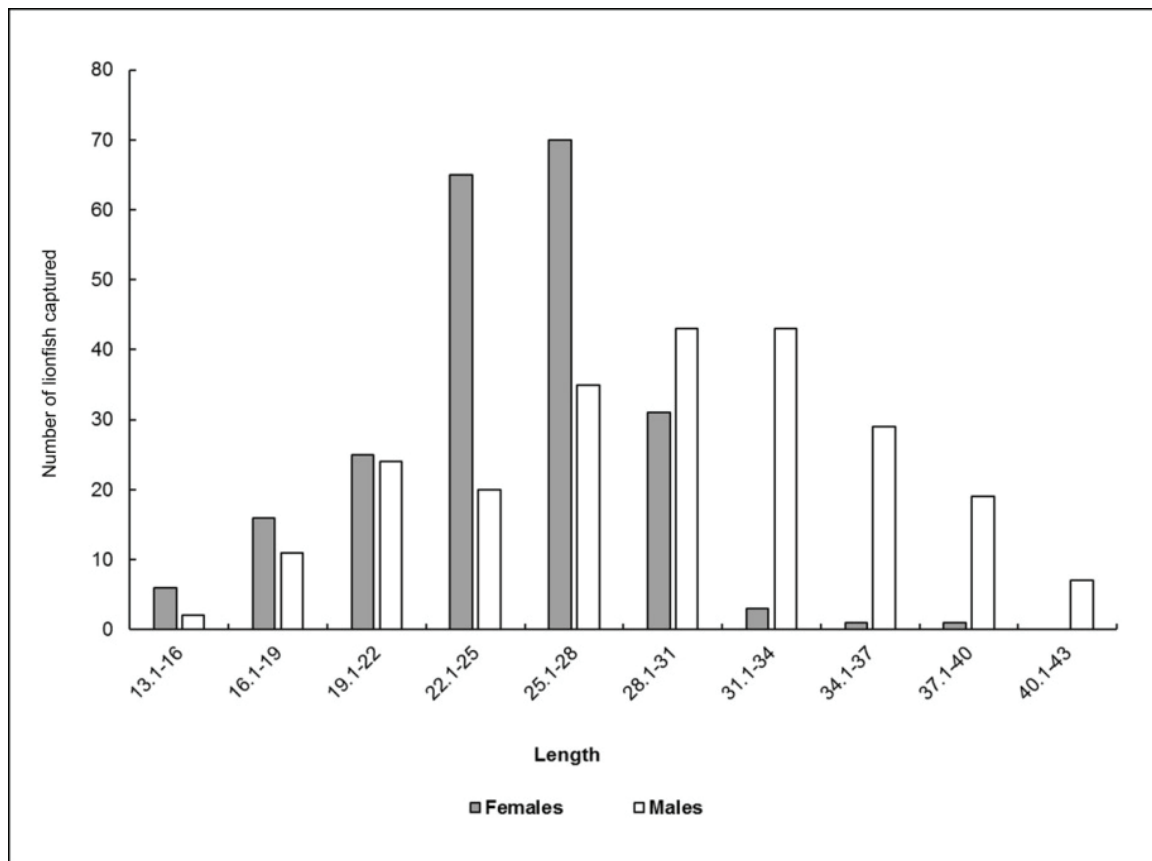


Figure 3. Distribution of sexes by size class. Baconao Biosphere Reserve, south-eastern coast of Cuba. April 2012 to May 2013.

The peak in reproductive activity in winter was reported previously in Florida waters by Ruiz-Carus *et al.* (2006). When these spawning seasons is compared with reports for the natural range of lionfish in the southeast coast of India in August (Priyadharsini *et al.*, 2013), an important difference of 4-7 months emerges, which may be an adaptive response of this species to conditions in Cuban waters.

The opposite trends of I_H and I_F values during the months when lower I_G values were recorded may be explained by the accumulation of reserves, mainly lipids and vitellogenin, the yolk precursor stored in oocytes during vitellogenesis (Love, 1970; Van Bohemen *et al.*, 1981). In this study, I_G and I_H apparently do not follow an opposite trend, with both decreasing as a result of reproduction. This is assumed to happen as a consequence of a surplus energy reserve, thus allowing lionfish not to deplete its reserves. This is supported by the fact that lionfish is iteroparous, so the liver does not play a major role, contrasting with species inhabiting in limiting environments that impose the need to store reserves to cope with starvation periods (Love, 1970; Van Bohemen *et al.*, 1981; Saborido-Rey, 2008). To determine whether this statement is actually true would require performing bioenergetic studies. The stability of CF throughout the study period regardless of the reproductive stage reflects favorable conditions for lionfish, i.e., abundant food and

absence of predators, allowing them to maintain a constant physiological performance throughout the whole year (Morris *et al.*, 2011).

As regards the size of recruitment to the reproductive stock, the sizes at first maturity observed in the present study (26.2 cm for females and 30.07 cm for males), are larger than those by reported by Morris (2009) for North and South Carolina, Bahamas, and the Philippines, i.e., a size of first maturity of 17.5 for females and 10 cm for males in pooled samples of the three locations. The smallest female with reproductive activity reported in this study (17.5 cm) is similar to the size reported by Morris (2009) (17.2 cm), but differs from values reported by this same author for lionfish from North and South Carolina (15.8 cm) and the Bahamas (9.8 cm). In the case of males, the values reported by Morris (2009) for North (13.2 cm) and South Carolina (10.5 cm), the Bahamas and the Philippines (10 cm) differ from those recorded in the present study (17.9 cm). These differences may be explained as a response to fishing pressure by reaching maturity at smaller sizes.

The findings in this study suggest that the lionfish, *P. volitans*, shows an asynchronous reproductive cycle characterized by high gonadal index values during the breeding season and an inverse trend of I_H and I_F , suggesting that the liver and body fat store nutrients for use in reproduction.

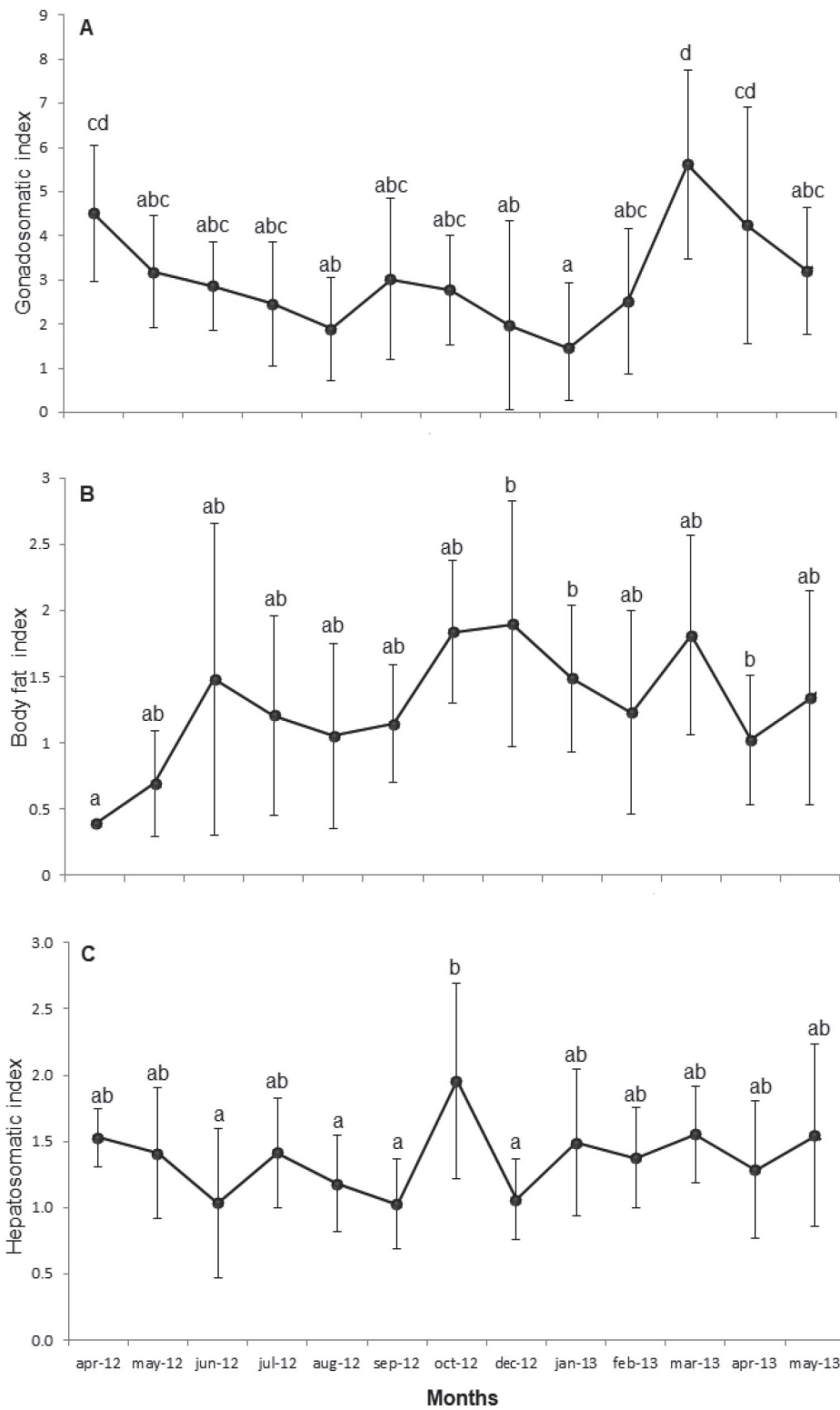


Figure 4. Monthly variation of mean values A) Gonadosomatic index (I_G); B) Body fat index (I_f); C) Hepatosomatic index (I_H), of the lionfish population sampled in Baco-
nao Biosphere Reserve, south-eastern coast of Cuba. April 2012 to May 2013.

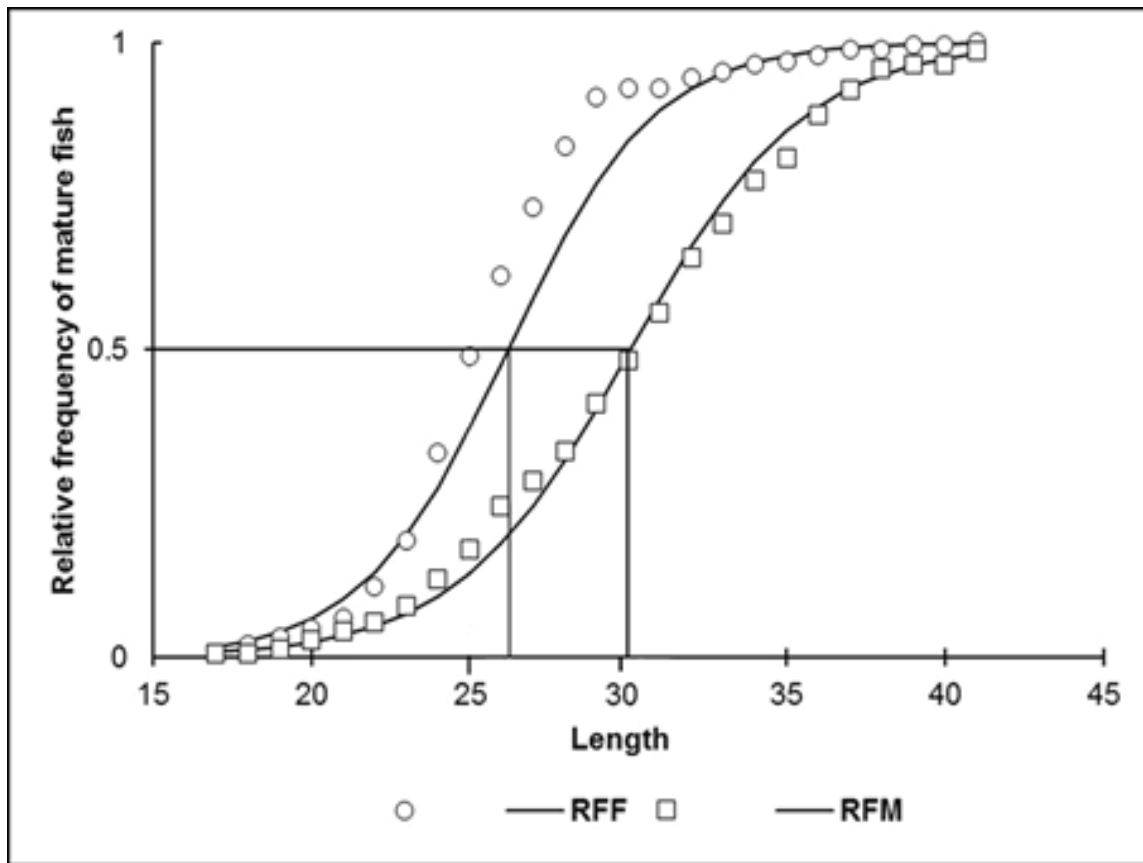


Figure 5. Size at first maturity of the lionfish population. RFF: Relative frequency of females, RFM relative frequency of male. Circles and squares are observed data. Lines refer to data estimated by equation in Baconao Biosphere Reserve, south-eastern coast of Cuba. April 2012 to May 2013.

ACKNOWLEDGEMENTS

East Center of Ecosystems and Biodiversity (BIOECO), M. Abad, A. Viña. National Center for Protected Areas (CNAP) of Cuba, D. Salabarría, L. Castro. Interdisciplinary Center of Marine Sciences (CICIMAR-IPN). Project “Improving the Prevention, Control and Management of Invasive Exotic Species in Vulnerable Ecosystems in Cuba”. M. Villalejo-Fuerte and E. Chávez are fellowship holders from COFAA and EDI, both from the National Polytechnic Institute, México. The English manuscript was edited by María Elena Sánchez-Salazar. Yoendry A. Paz-Rodríguez was BEIFI and CONACyt fellowship.

REFERENCES

- ACUARIO NACIONAL DE CUBA. 2011. *Protocolo para el estudio del pez león (Pterois sp.) en Cuba*. 9 p.
- AGUILAR-PERERA, A., A. TUZ-SULUB, L. CHAN-PERERA, M. J. LÓPEZ-GÓMEZ, X. GONZÁLEZ-TRISTE & E. CARRILLO-FLOTA. 2012. Lionfish invasion of the Northern Coast of the Yucatan Peninsula, Mexico, Southern Gulf of Mexico: What do we know? *Proceedings Gulf Caribbean Fisheries Institute* 64. 34-38. También disponible en la página web <https://www.researchgate.net/publication/235679309>.
- ALBINS, M. A. & M. A. HIXON. 2008. Invasive Indo-Pacific lionfish (*Pterois volitans*) reduce recruitment of Atlantic coral reef fishes. *Marine Ecology Progress Series* 367: 233-238.
- BAKER, P., S. M. BAKER & J. FAJANS. 2004. *No indigenous marine species in the greater Tampa Bay ecosystem*. Final Report to the Tampa Bay Estuary Program. Technical Publication 02-04, Florida. 131 p. También disponible en la página web https://tbep.tech.org/TBEP_TECH_PUBS/2004/TBEP_02_04Invasives.pdf.
- BIGGS, C. & J. OLDEN. 2011. Multi-scale habitat occupancy of invasive lionfish (*Pterois volitans*) in coral reef environments of Roatán, Honduras. *Aquatic Invasions* 6(3): 347-353. DOI: 10.3391/ai.2011.6.3.11
- BROWN, J. & R. RUIZ-CARUS. 2006. First-known lionfish caught of Florida's Gulf coast waters. *Press Release*, F.W.C Florida Fish and Wildlife Research Institute, St. Petersburg. Available online at: <http://myfwc.com/research/saltwater/nonnative/marine-life/gulf-coastlionfish-caught/> (downloaded January 22, 2019).
- BROWN, M., J. COWHEY, S. DAWSON, M. FARRINGTON, M. NASH, J. SHI & S. YOUNG. 2009. Lionfish (*Pterois volitans*) affecting biodiversity of patch reef species. Cape Eleuthera Institute. Available online at: <http://fishconserve.org/arcel/admin/uploads/FPLP119.pdf> (downloaded February 23, 2019).

- CHEVALIER, P., O. E. GUTIÉRREZ, D. IBARZABAL, S. ROMERO, V. ISLA, J. CALDERIN & E. HERNÁNDEZ. 2008. First record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) for Cuban waters. *Solenodon* 7: 37-40.
- CLAYDON, J. A. B., M. C. CALOSSO & S. B. TRAIGER. 2012. Progression of invasive lionfish in seagrass, mangrove and reef habitats. *Marine Ecology Progress Series* 448: 119-129.
- FROESE, R. & D. PAULY. 2018. Fish Base. World Wide Web electronic publication. Disponible en línea en: www.fishbase.org, versión (10/2018) (consultado el 05 octubre 2018).
- GAERTNER, D. & F. LALOE. 1986. Etudebiométrique de la taille a' premier maturitésexuelle de *Geryonmaritae*. *Oceanologica Acta* 9 (4): 479-487.
- GARCÍA, D. C. 1989. *Temperatural (Promedio de enero, febrero y marzo)*. Nuevo Atlas Nacional de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. 39 p.
- GONZÁLEZ, J. D., A. ACERO, A. SERRA & R. BETANCUR. 2011. Caracterización taxonómica de la población del pez león *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758) (Scorpaenidae) residente en el Caribe colombiano: métrica y morfometría. *Biota Colombiana* 12 (2): 15-22. También disponible en la página web <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49122304002>.
- GREEN, S. J. & I. M. CÔTÉ. 2009. Record densities of Indo-Pacific lionfish on Bahamian coral reefs. *Coral Reefs* 28 (1): 107-107. DOI: 10.1007/s00338-008-0446-8.
- GREEN, S. J., J. L. AKINS, A. MALJKOVIĆ & I. M. CÔTÉ. 2012a. Invasive lionfish drive Atlantic coral reef fish declines. *Plos One* 7 (3): e32596. DOI: 10.1371/journal.pone.0032596.
- GREEN, S. J., J. L. AKINS & J. A. MORRIS. 2012b. *Lionfish dissection: Techniques and applications*. NOAA Technical Memorandum. NOS NCCOS 139. 24 p.
- HARE, J. A. & P. E. WHITFIELD. 2003. *An integrated assessment of the introduction of lionfish (Pterois volitans/Pterois miles complex) to the Western Atlantic Ocean*. NOAA Technical Memorandum. NOS NCCOS. 21 p.
- IONIN, A. S., Y. A. PAVLIDIS & O. ABELLÓ-SUÁREZ. 1977. *Geología de la plataforma de Cuba*. Nauka, 215 p.
- KIMBALL, M. E., J. M. MILLER, P. E. WHITFIELD & J. HARE. 2004. Thermal tolerance and potential distribution of invasive lionfish (*Pterois volitans/Pterois miles* complex) on the east coast of the United States. *Marine Ecology Progress Series* 283: 269-278.
- LOVE, R. M. 1970. *The chemical biology of fishes*. Academic Press, London, New York. 547 p.
- MADDOCK, D. M. & M. P. BURTON. 1998. Gross and histological of ovarian development and related condition changes in American plaice. *Journal of Fish Biology* 53 (5): 928-944. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb00454.x.
- MORRIS, J. A. JR., J. L. AKINS, A. BARSE, D. CERINO, D. W. FRESHWATER, S. J. GREEN, R. C. MUÑOZ, C. PARIS & P. E. WHITFIELD. 2008. Biology and ecology of the Invasive Lion fishes, *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Proc of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 409-414.
- MORRIS, J. A. JR. & J. L. AKINS. 2009. Feeding Ecology of Invasive Lionfish (*Pterois volitans*) in the Bahamian Archipelago. *Environmental Biology of Fish* 86 (3): 389-398.
- MORRIS J. A. JR., J. L. AKINS, A. BARSE, D. CERINO, D. W. FRESHWATER, S. J. GREEN, R. C. MUÑOZ, C. PARIS & P. E. WHITFIELD. 2009. Biology and Ecology of the Invasive Lionfishes, *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 61: 409-414.
- MORRIS, J. A. JR. 2009. Reproductive dynamics of the invasive lionfish *Pterois miles* and *P. volitans* in the western north Atlantic. Chapter 6. Ph. D. Thesis. North Carolina State University. pp. 97-117.
- MORRIS, J. A. JR., C. V. SULLIVAN & J. J. GOVONI. 2011. Oogenesis and spawn formation in the invasive lionfish, *Pterois miles* and *Pterois volitans*. *Scientia Marina* 75 (1): 75-90.
- PRİYADHARSINI, S., J. MANOHARAN, D. VARADHARAJAN & A. SUBRAMANIAN. 2013. Reproductive biology and hystological study of red lionfish *Pterois volitans* from Cuddalore, South East Coast of India. *Journal of Aquaculture Research & Development* 4 (6): 201-210. DOI:10.4172/2155-9546.1000201.
- REEF (ENVIRONMENTAL EDUCATION FOUNDATION). 2008. REEF database. Available online at: <http://www.reef.org/db/reports> (downloaded February 15, 2019).
- RUIZ-CARUS, R., R. E. MATHESON, D. E. ROBERTS & P. E. WHITFIELD. 2006. Pacific red lionfish, *Pterois volitans* (Scorpaenidae), in Florida: evidence for reproduction and parasitism in the first exotic marine fish established in state waters. *Biological Conservation* 128 (3): 384-390.
- SABORIDO-REY, F. 2008. Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. Curso de doctorado, Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Universidad de Oviedo. 71 p.
- SANTANDER-MONSALVO, J., I. LÓPEZ-HUERTA, A. AGUILAR-PERERA & A. TUZ-SULUB. 2012. First record of the red lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758]) of the coast of Veracruz, Mexico. *BiolInvasions Records* 1 (2): 131-134.
- SCHOFIELD, P. J. 2009. Geographic extent and chronology of the invasion of non-native lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758] and *P. miles* [Bennett, 1828]) in the Western North Atlantic and Caribbean Sea. *Aquatic Invasions* 4 (3): 473-479.
- SCHOFIELD, P. J. 2010. Update on geographic spread of invasive lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758] and *P. miles* [Bennett, 1828]) in the Western North Atlantic Ocean, Caribbean Sea and Gulf of Mexico. *Aquatic Invasions* 5 (Supplement 1): S117- S122. DOI: [org/10.3391/ai.2010.5.S1.024](https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.S1.024).
- SPARRE, P. & S. VENEMA. 1997. *Introducción a la evaluación de recursos pesqueros tropicales Parte I*. Manual. FAO Documento Técnico de Pesca No. 306/1 Rev. 2. 420p.
- USGS (UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY). 2004. Nonindigenous Aquatic Species. Available online at: <http://nas.er.usgs.gov/queries/StateSearch.html> (downloaded February 21, 2019).
- VAN BOHEMEN, C. G., J. G. D. LAMBERT & J. PEUTE. 1981. Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 44 (1): 94-107.
- WHITFIELD, P. E., T. GARDNER, S. P. VIVES, M. R. GILLIGAN, W. R. COURTENAY, G. C. RAY & J. A. HARE. 2002. Biological invasion of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans* along the Atlantic coast of North America. *Marine Ecology Progress Series* 235: 289-297.
- WHITFIELD, P. E., J. A. HARE, A. W. DAVID, S. L. HARTER, R. C. MUÑOZ & C. M. ADDISON. 2007. Abundance estimates of the Indo-Pacific lionfish *Pterois volitans/Pterois miles* complex in the Western North Atlantic. *Biological Invasions* 9 (1): 53-64.

NOTA CIENTÍFICA

Recent records of *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) on the Mexican Pacific coast with notes on its distribution and conservation status

Registros recientes de *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) en la costa del Pacífico mexicano con notas sobre su distribución y estado de conservación

Salvador Santamaría-Damián¹, Emilio I. Romero-Bermy^{2*}, Cristian Tovilla-Hernández¹ and Margarita E. Gallegos-Martínez³

Recibido: 13 de febrero de 2017.

Aceptado: 21 de octubre de 2019.

Publicado: diciembre de 2019.

ABSTRACT

¹ Departamento de Ciencias de la Sustentabilidad, El Colegio de la Frontera Sur-Unidad Tapachula. Carretera a Antigua Aeropuerto km 2.5, Tapachula, Chiapas, 30700. México

² Centro de Investigaciones Costeras, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Calle J.J. Calzada y Av. Prolongación Calzada de Guadalupe, Col. Evolución, Tonalá, Chiapas, 30500. México

³ Departamento de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 180, Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, Ciudad de México, 09340. México

***Corresponding author:**

Emilio I. Romero-Bermy: e-mail: emilio.romero@unicach.mx

To quote as:

Santamaría-Damián S., E. I. Romero-Bermy, C. Tovilla-Hernández & M. E. Gallegos-Martínez. 2019. Recent records of *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) on the Mexican Pacific coast with notes on its distribution and conservation status. *Hidrobiológica* 29 (3): 197-202.

Background. The mangrove *Avicennia bicolor* was first recorded in Mexico in 1946, however until now there is no basic information about its distribution supported by herbarium specimens. **Goals.** Three recent records of *A. bicolor* are provided at a new location in Mexico on the coastal wetlands of the Gulf of Tehuantepec, Chiapas; and the information about its known records on the American Pacific is summarized. **Methods.** Plant specimens were collected, which then, were dried, corroborated and deposited in four national herbaria. In the field, some structural attributes of the mangroves were determined such as density, basal area and height. A database and publications of species records were reviewed to preliminarily analyze their known distribution in the Pacific. **Results.** In Mexico, *A. bicolor* has been recorded only on the coastal wetlands of Mar Muerto and Los Patos-Solo Dios. The preliminary ecological diagnosis showed its presence in relatively dense stands (234 ± 86 trees ha⁻¹) and with high structural development (basal area: 16.1 m² ha⁻¹, height: 13.9 m). Although its presence is apparently conspicuous in several localities of Panama and Costa Rica, data on the species in the coastal strip between the Gulf of Fonseca and the Gulf of Tehuantepec is lacking. **Conclusions.** The importance of these records is evident, considering the scarce information available on *A. bicolor* and its restricted distribution in Mexico. We consider it appropriate to increase the ecological studies in its distribution area and give it protection through its inclusion in the Official Mexican Standard (NOM-059).

Key words: mangrove, distribution, Chiapas, Gulf of Tehuantepec, NOM-059

RESUMEN

Antecedentes. El mangle *Avicennia bicolor* fue registrado por primera vez en México en 1946, sin embargo, hasta ahora se carece de información básica sobre su distribución respaldada en ejemplares de herbario. **Objetivos.** Aportar tres registros recientes de *A. bicolor* en una nueva localidad para México en humedales costeros del Golfo de Tehuantepec, Chiapas y resumir la información sobre sus registros conocidos en el Pacífico americano. **Métodos.** Se recolectaron ejemplares botánicos, los cuales fueron herborizados, corroborados y depositados en cuatro herbarios nacionales. En campo se determinaron algunos atributos estructurales de los manglares (densidad, área basal, altura). Se revisó una base de datos y publicaciones de registros de la especie para analizar preliminarmente su distribución conocida en el Pacífico. **Resultados.** En México, *A. bicolor* se ha registrado únicamente en los humedales costeros de Mar Muerto y Los Patos-Solo Dios. El diagnóstico ecológico preliminar demostró su presencia en rodales relativamente densos (234 ± 86 árboles ha⁻¹) y con elevado desarrollo estructural (área basal: 16.1 m² ha⁻¹; altura: 13.9 m). Aunque su presencia es apa-

rentemente conspicua en varias localidades de Panamá y Costa Rica, se carece de datos sobre la especie en la franja costera comprendida entre el Golfo de Fonseca y el Golfo de Tehuantepec. **Conclusiones.** Se evidencia la importancia de estos registros, considerando la escasa información disponible y su restringida distribución en México. Consideramos congruente incrementar los estudios ecológicos en su área de distribución y darle protección mediante su inclusión en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059).

Palabras clave: manglar, distribución, Chiapas, Golfo de Tehuantepec, NOM-059

Mangroves are tree and shrub communities that occupy intertidal zones of tropical and subtropical regions. The few species that compose this group display distinctive morphological, physiological and ecological traits that make them adaptable to the coastal environment dynamics (Hogarth, 2007; Tomlinson, 1995). Mangroves are highly productive ecosystems, they provide several environmental services; including protection from coastal erosion, sediment trapping and they are efficient carbon sinks, also, they work as nursery and feeding areas for many fishery species (Sanjurjo-Rivera & Welsh-Casas, 2005; Polidoro *et al.*, 2010; Donato *et al.*, 2011). In Mexico four species of mangroves are widely distributed in both the Atlantic and the Pacific coasts: *Rhizophora mangle* L. (Red Mangrove; Rhizophoraceae), *Avicennia germinans* Jacq. (Black Mangrove; Acanthaceae), *Laguncularia racemosa* Gaertn. (White Mangrove; Combretaceae) and *Conocarpus erectus* L. (Button Mangrove; Combretaceae) with two varieties (*erectus* and *sericeus*) (López-Portillo & Ezcurra, 2002; Pennington & Sarukhán, 2005). Additionally, in the state of Chiapas the presence of *Rhizophora harrisonii* Leechman (considered a natural hybrid between *R. mangle* and *R. racemosa* G. Mey.) and *Avicennia bicolor* Standl. (Salty Mangrove) has been reported (Moldenke, 1960; Rico-Gray, 1981; Lot *et al.*, 2015).

Avicennia bicolor is a native mangrove of the Central American Pacific and found in the restricted areas between Buenaventura Bay in Colombia and the southern Mexican Pacific coast (Jiménez, 1990, 1994; Tomlinson, 1995; Duke, 2010). *Avicennia bicolor* and *A. germinans* can occur in mixed stands and can be easily distinguished by morphological characteristics (leaves and inflorescence arrangement) (*sensu* Gibson, 1970; Tomlinson, 1995). Microsatellite data suggests that a contemporary genetic isolation between the two species exists (Nettel *et al.*, 2008).

The following is a dichotomous key to differentiate the two species of *Avicennia* present in Mexico (Tomlinson, 1995).

1. Corolla conspicuously hairy within, appreciably zygomorphic, stamens slightly to appreciably unequal..... 2
 - 2A. Flowers 10–15 mm long and almost as wide at anthesis, stamens exserted and only slightly unequal; style long, exserted from calyx when corolla is shed. Fruit distinctly beaked, glaucous, surface rough but not pitted. Leaf ovate to elliptic at most. Widely distributed from the Pacific and the Gulf of Mexico coasts..... *Avicennia germinans*
 - 2B. Flowers 5–6 mm long and about as wide at anthesis; stamens included and markedly unequal, with a short filament (0.5 mm) on the inner pair and a longer filament (1 mm) on the outer pair; style short, either deciduous or not exserted from calyx when corolla is shed. Fruit blunt, globose, greenish yellow, surface

irregularly pitted. Leaf blade oblong, elongate, often less than three times as long as wide. Restricted distribution in Chiapas (Mexico) and Central American Pacific coasts.....

Avicennia bicolor

Records of *A. bicolor* in Mexico are particularly scarce. Its occurrence has been cited without location data (e.g., López-Portillo & Ezcurra, 2002; Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2013) or valid specimens, generating uncertainty on the actual occurrence and on its distribution in the country. The aim of this note is to report three recent records of *A. bicolor* in the state of Chiapas. Also, we provided data on the mangrove community structure with emphasis in *A. bicolor* and the general characteristics of its habitat. Additionally, information gaps of the species were determined through an analysis of its records in the Central American Pacific.

Previous records. The Japanese botanist Eizi Matuda collected the first record of *A. bicolor* in Mexico in 1946. This specimen collected in Paderón [sic], Chiapas (16° 2' 25.5" N, 093° 51' 59.91" W approximately) was deposited in the U.S. National Herbarium (US 1889845; we revised photographs of this specimen in April 10, 2015). A second specimen was collected after 40 years later, on the east of the Mar Muerto coastal lagoon (Chiapas state) during an ungraduated research project in 1987 (see section material examined) (Gallegos & Gómez, 1989). The information provided by the mangrove forests inventory made on the coasts of Chiapas and Oaxaca (Tovilla-Hernández *et al.*, 2007; 2010) suggests that *A. bicolor* is found in some sites on the northeastern of the Gulf of Tehuantepec, Mexico (Fig. 1).

Recent records. *Avicennia bicolor* stands were in the Mangrove Priority Site Los Patos-Solo Dios, municipalities of Pijijiapan and Tonalá, Chiapas (CONABIO-PS28; Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2013). In this new locality, forest structure parameters (DBH ≥ 2.5 cm, density height, basal area) were determined in three plots (300 m²) where *A. bicolor* was found. In April 2015 and November 2016, we collected specimens using standard field and herbarium techniques (Lot & Chiang, 1986), and for botanical determination, we used the keys of Gibson (1970) and Pool & Rueda (2001). Herbarium specimens were deposited at MEXU (National Herbarium, Universidad Nacional Autónoma de México), UAMIZ (Metropolitan Herbarium "Dr. Ramón Riba y Nava Esparza", Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), HEM (Herbarium "Eizi Matuda", Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas) and ECO-SC-H (El Colegio de la Frontera Sur-San Cristóbal).

Material examined. Mexico. Chiapas. Municipality of Tonalá: Mar Muerto, Estero Cinco Arrobas, ca. 7.5 km southeast of Paredón, 15° 51' N, 093° 51' W, 28 February 1987, A. Gómez and M. Gallegos, 268 (UAMIZ 32515); Panama. Province of Coclé: On Isla del Pozo in salinas (salt flats) of Rio Estero Salado, 8° 11' N, 080° 30' W, 12 February 1982, S. Knapp, K. Clary and D. Piperno, 3401 (MEXU 378957); Province of Panama: Punta Chame, 10-15 miles from Pan-American Highway, 8° 40' N, 79° 45' W, 17 September 1981, S. Knapp, 1244 (MEXU 382325).

Additional material from the new locality. Mexico. Chiapas. Municipality of Pijijiapan: Los Patos-Solo Dios lagoon system, ca. 120 m east of the San José estuary channel and 500 m north of the beach, 15° 43' 39.50" N, 93° 29' 50.20" W, S. Santamaría-Damián 001 and E. I. Romero-Bermy, s/n (MEXU, UAMIZ, HEM, ECO-SC-H), 13 April 2015 (Fig. 2). Ca. 40 m east of the San José estuary channel and 510 m north of the beach, 15° 42' 55.60" N, 093° 28' 52.70" W, S. Santamaría-

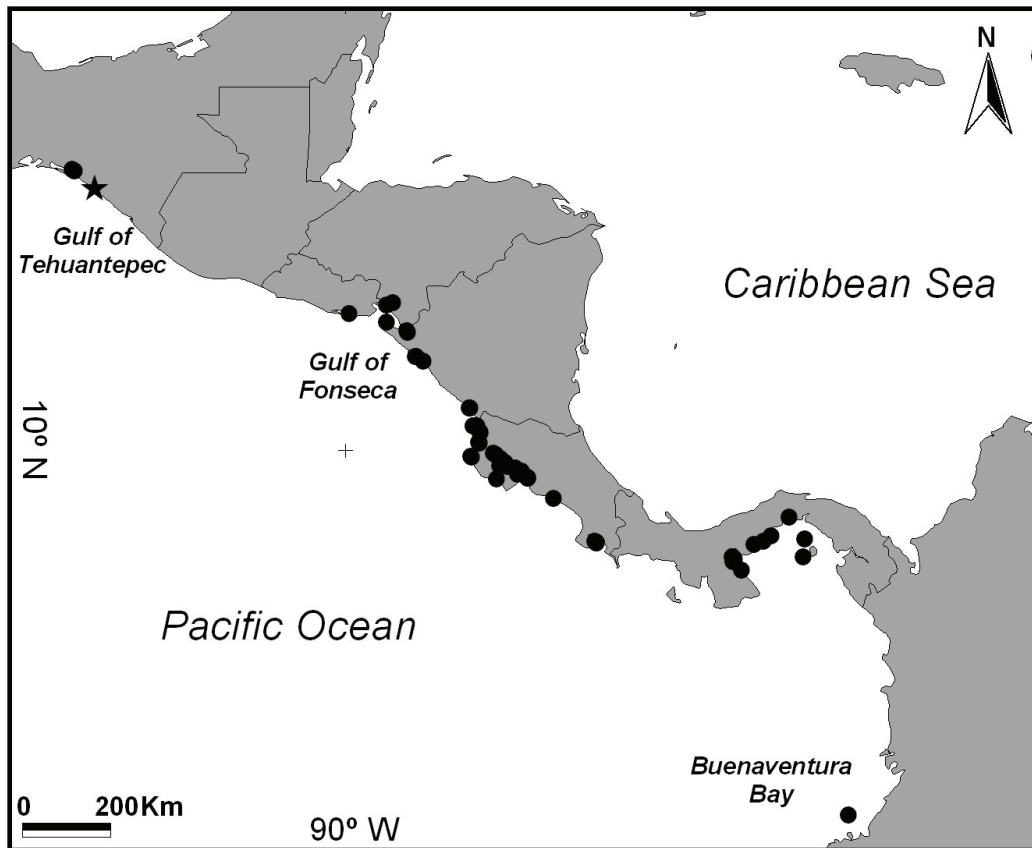


Figure 1. Map of the Pacific coast of Central America showing georeferenced localities of *Avicennia bicolor*. Multiple records in close geographic proximity may be represented by a single symbol. Area of recent records of the species in Los Patos-Solo Dios (Chiapas, Mexico) is represented by a star.

Damián 002 and *E. I. Romero-Berny*, s/n (MEXU, UAMIZ. HEM, ECO-SC-H), 15 April 2015. Municipality of Tonalá: Los Patos-Solo Dios lagoon system, ca. 50 m south of the La Ceiba fishing pier, 15° 45' 30.66" N, 093° 31' 48.74" W, *S. Santamaría-Damián 003* and *E. I. Romero-Berny*, s/n (HEM, ECO-SC-H), 18 November 2016.

Tree community structure. In Los Patos-Solo Dios lagoon system, mean density of *A. bicolor* trees (DBH \geq 2.5 cm) was estimated at 234 ± 86 trees ha^{-1} . Average basal area and mean height were $16.1 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ and 13.9 m, respectively. *Avicennia bicolor* stands were observed in an intertidal creek adjacent to the main estuarine channel. These stands are located to the side of the sandbar that separates the estuary from the open ocean and it has a surface salinity of 34 psu (dry season, February 2010). *Rhizophora mangle* trees occurred at the borders of the creek (605 ± 177 trees ha^{-1}) while the *A. germinans* stands (661 ± 107 trees ha^{-1}) are surrounding the stands of *A. bicolor*. The composition and structure of dry climate mangroves along the Pacific of Central America show differences among stands in the inland and edge sections of the forest where the runoff seasonally modifies the patterns of local drought and salinity, which is evident in *A. bicolor*-*A. germinans* mixed stands (Jiménez, 1990). In general, the communities of *A. bicolor* in this new Mexican locality have a more developed forest structure in

comparison to those of the Gulf of Fonseca (southeastern El Salvador), where low values of density, height and basal area are reported (Chicas-Batres *et al.*, 2016).

Distribution records. To summarize the distribution records of *A. bicolor* in the Central American Pacific, we compiled locality data using the Global Biodiversity Information Facility dataset (GBIF, 2013) and literature. The search of GBIF returned 176 records with georeferenced data (including the synonym *A. tonduzii*). The species has been collected in seven countries including Mexico. Most records come from Costa Rica and Panama (Fig 1). However, there are no records north of the Gulf of Fonseca and the coast of Guatemala, with exception of those mentioned for Mexico in this note.

In Mexico, this species is restricted to a coastal stretch along the Mar Muerto lagoon to the Joaquín Amaro-La Conquista dredged channel (40.3 km). The Mar Muerto record (Paredón, Chiapas) represents the northernmost locality for this species in the Eastern Pacific, although it is necessary to intensify exploration in the northern region of the Gulf of Tehuantepec to locate a more precise distribution limit. It is also advisable to carry out a more complete characterization of its habitat to determine the environmental drivers that define its distribution and structural patterns.

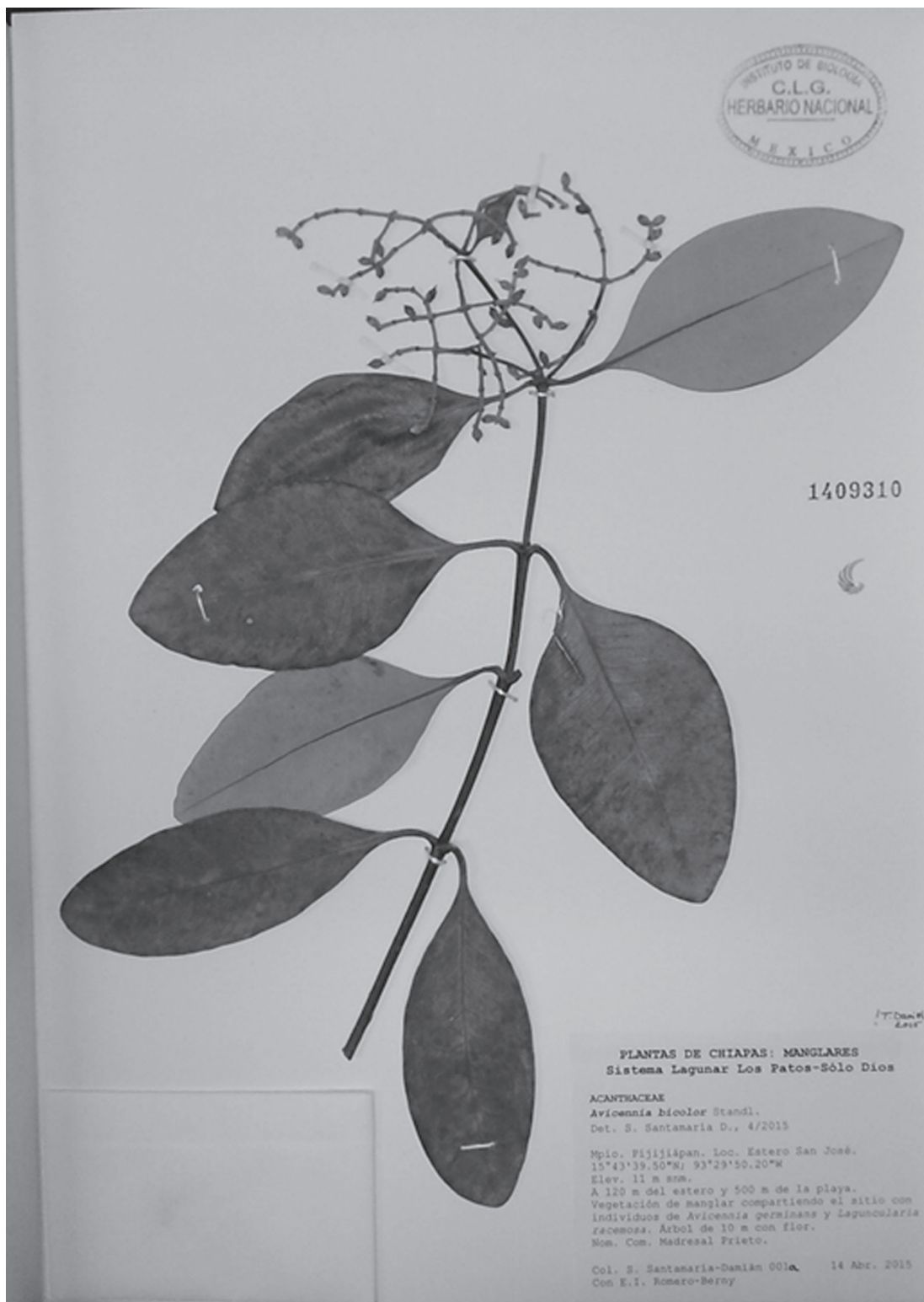


Figure 2. Herbarium specimen of *Avicennia bicolor*

Federal laws protect mangrove ecosystems in Mexico; however there is a gap with respect to *A. bicolor*, which is not listed in the Official Mexican Standard (Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SEMARNAT-2001), although the IUCN Red List categorized it as Vulnerable (Duke, 2010; SEMARNAT, 2010). Our records show that *A. bicolor* is distributed in a limited but important area in the northern Mesoamerica, in relatively dense stands with high structural development. The mangrove system of Los Patos-Solo Dios lacks conservation status and is threatened by changes in land use and selective logging (Santamaría-Damián *et al.*, 2015). Therefore, it is considered congruent to give legal protection to the site and necessary to include *A. bicolor* in the NOM-059.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. S. Gernandt and staff of the Herbario Nacional (UNAM-IB) for their invaluable assistance in several activities of this research; J. Santana Carrillo (UAMIZ), B. V. Juárez Jaimes (MEXU), H. Gómez Domínguez, M. A. Pérez Farrera (HEM), I. Vasquez Lara and M. Ishiki Ishihara (ECO-SC-H) for their assistance with database queries of collections and deposit of specimens; J. De la Presa, F. Ovalle, A. Lang and E. Serrano for field support; fishermen of S.C.P.P. El Remolino allowing access to the collecting sites; M. R. García Peña for the photographs of the specimens deposited at the National Herbarium of the Smithsonian Institute; SEMARNAT for collection permit (SGPA/DGGFS/712/2105/14). Comments on manuscript from W.A. Matamoros and two anonymous reviewers helped to substantially improve the final version.

REFERENCES

- CHICAS-BATRES, F. A., J. A. GONZÁLEZ-LEIVA & J. A. SAYES 2016. Composición florística y estructura del manglar de la Bahía de La Unión, El Salvador. *Revista Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2 (1): 52-64.
- DONATO, C. D., J. B. KAUFFMAN, D. MURDIYARSO, S. KURNIANTO, M. STIDHAM & M. KANNINEN 2011. Mangroves among the most carbon rich forests in the tropics. *Nature Geoscience* 4: 293-297. DOI:10.1038/NGE01123
- DUKE, N. C. 2010. *Avicennia bicolor*. The IUCN Red List of Threatened Species. V.2015.2. Available on line at <http://iucnredlist.org/details/178847/0> (downloaded July 28, 2015).
- GALLEGOS, M. & A. GÓMEZ. 1989. *Análisis estructural del manglar de la laguna costera Mar Muerto, Chiapas, México*. Boletín de Resúmenes del III Congreso Venezolano sobre Ciencias del Mar, Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela. 45 p.
- GBIF. 2013. *Avicennia bicolor* Standley. GBIF Backbone Taxonomy. Available online at <http://gbif.org/species/4196610> (downloaded July 28, 2015).
- GIBSON, D. N. 1970. Verbenaceae. In: Standley, P. C. & L. O. Williams (eds.). *Flora of Guatemala. Fieldiana Botany* 24 (9/1-2): 167-236.
- HOGARTH, P. J. 2007. *The Biology of Mangroves and Seagrasses*. Oxford University Press. Oxford. 284 p.
- JIMÉNEZ, J. A. 1990. The structure and function of dry weather mangroves of the Pacific coasts of Central America, with emphasis on *Avicennia bicolor* forests. *Estuaries* 13 (2): 182-192.
- JIMÉNEZ, J. A. 1994. *Los manglares del Pacífico centroamericano*. Fundación UNA. Heredia, Costa Rica. 352 p.
- LÓPEZ-PORTILLO, J. & E. EZCURRA. 2002. Los manglares de México: una revisión. *Madera y Bosques* 8 (1): 27-51.
- LOT, A. & F. CHIANG (COMPS.). 1986. *Manual de Herbario: administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*. Consejo Nacional de la Flora de México A.C., Mexico. 142 p.
- LOT, A., C. ZEPEDA & A. MORA. 2015. Vegetación acuática y subacuática de México. In: Lot, A. (ed.). *Catálogo de la flora y vegetación de los humedales mexicanos*, Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 27-104.
- MOLDENKE, H. N. 1960. Materials toward a monograph of the genus *Avicennia*. *Phytologia* 7: 123-168.
- NETTEL, A., R. S. DODD, Z. AFZAL-RAFII & C. TOVILLA-HERNÁNDEZ. 2008. Genetic diversity enhanced by ancient introgression and secondary contact in East Pacific Black mangroves. *Molecular Ecology* 17: 2680-2690. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03766.x
- PENNINGTON, T. D. & J. SARUKHÁN. 2005. *Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica, México. 523 p.
- POLIDORO, A. B., K. E. CARPENTER, L. COLLINS, N. DUKE, A. M. ELLISON, J. C. ELLISON, E. J. FARNSWORTH, E. S. FERNANDO, K. KATHIRESAN, N. E. KOEDAM, S. R. LIVINGSTON, T. MIYAGI, G. E. MOORE, V. NGOC NAM, J. EONG ONG, J. H. PRIMAVERA, S. G. SALMO III, J. C. SANSIANGCO, S. SUKARDJO, Y. WANG & J. W. JONG-YONG. 2010. The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *Plos One* 5: e0010095. DOI: 10.1371/journal.pone.0010095
- POOL, A. & R. M. RUEDA. 2001. Verbenaceae. In: Stevens, W. D., C. Ulloa, A. Pool & O. M. Montiel (eds.). *Flora de Nicaragua*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, St Louis, Missouri, pp. 2497-2525.
- RICO-GRAY, V. 1981. *Rhizophora harrisonii* (Rhizophoraceae), un nuevo registro para las costas de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 7: 163-165.
- RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, M. T., C. TROCHE-SOUZA, A. D. VÁSQUEZ-LULE, J. D. MÁRQUEZ-MENDOZA, B. VÁSQUEZ-BALDERAS, L. VALDERRAMA-LANDEROS, S. VELÁZQUEZ-SALAZAR, M. I. CRUZ-LÓPEZ, R. RESSL, A. URIBE-MARTÍNEZ, S. CERDEIRA-ESTRADA, J. ACOSTA-VELÁZQUEZ, J. DÍAZ-GALLEGOS, R. JIMÉNEZ-ROSENBERG, L. FUEYO-MACDONALD & C. GALINDO-LEAL. 2013. *Manglares de México. Extensión, distribución y monitoreo*. CONABIO, México. 128 p.
- SANJURJO-RIVERA, E. & S. WELSH-CASAS. 2005. Una descripción del valor de los bienes y servicios ambientales prestados por los manglares. *Gaceta Ecológica* 74: 55-68.
- SANTAMARÍA-DAMIÁN, S., J. ACOSTA-VELÁZQUEZ, E. I. ROMERO-BERNY & C. TOVILLA-HERNÁNDEZ. 2015. Cambios en la cobertura de los manglares y modificación del terreno en el sistema lagunar Los Patos-Solo Dios, en la costa de Chiapas, México. *Lacandonia* 9 (9):21-30.

- SEMARNAT (SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM 059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México, D.F. 35 p.
- TOMLINSON, P. B. 1995. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press. 432 p.
- TOVILLA-HERNÁNDEZ, C., R. L. SALAS-ROBLERO, J. C. DE LA PRESA-PÉREZ, E. ROMERO-BERNY, F. OVALLE-ESTRADA, R. GÓMEZ-ORTEGA, J. HERNÁNDEZ-SANDOVAL, E. DE LA CRUZ-MONTES & A. HERNÁNDEZ-GUZMÁN. 2007. *Inventario forestal de los bosques de manglar de la costa de Chiapas*. Informe final, ECOSUR-COCYTECH, México. 92 p.
- TOVILLA-HERNÁNDEZ, C., F. OVALLE-ESTRADA, J. C. DE LA PRESA-PÉREZ & D.T. GONZÁLEZ-CASTILLO. 2010. *Inventario y monitoreo del estado actual de los bosques de manglar de Chiapas y Oaxaca*. 2º Informe, ECOSUR-CONABIO, México. 129 p.

Hidrobiológica

Índice del volumen 29, 2019

- Saucedo P. E., A. Olivera-Bonilla, H. Acosta-Salmón y J. M. Mazón-Suástegui**
Cultivo primario de células de manto de la madreperla *Pinctada mazatlanica*, con potencial aplicación en el cultivo de perlas 1-7
- Sánchez-Santillán N., A. Esquivel-Herrera and J. Aldeco-Ramírez**
Relation between the sharpnose shark *Rhizoprionodon terranova* in the southern Gulf of Mexico and the average number of sunspots 9-16
- Palacios-Salgado D. S., L. Campos-Dávila, J. Granados-Amores, V. H. Cruz-Escalona, M. S. Peterson, X. G. Moreno-Sánchez, R. Aguilar-Medrano, J. R. Flores-Ortega and L. A. Abitia-Cárdenas**
Functional diversity in fish assemblages of the Tropical Eastern Pacific Ocean: A review of two decades of progress in the functional diversity approach 17-40
- NOTAS CIENTÍFICAS**
- García-Rivas M. del C., M. del P. Blanco-Parra, D. N. Castelblanco-Martínez and C. A. Niño-Torres**
First record of Fin whale *Balaenoptera physalus* for the Mexican Caribbean 41-43
- Mar Silva V., L. M. Mar Silva, Y. Herreras Diego, M. Medina Nava y O. Domínguez Domínguez**
Translocación de *Chapalichthys encaustus* (Actinopterygii: Goodeidae) en el río Teuchitlán, Jalisco, México 45-47
- Rogers A., Jean-François Hamel and A. Mercier**
Earthquake induces mass-spawning event in two coral-reef sea cucumber species in Belize 49-51
- Número 2**
- Cerón Ortiz, A. N., M. Á. Ángeles Monroy, M. A. Limón Mendoza y J. A. León Escamilla**
Impacto de la proporción de sexos en aspectos reproductivos del acocil *Cambarellus montezumae* 53-62
- Tovar-Aguilar G. I., M. A. Arzate-Cardenas y R. Rico-Martínez**
Efectos del diclofenaco en el rotífero dulciacuícola *Lecane papuana* (Murray, 1913) (Monogononta: Lecanidae) 63-72
- Ramírez-Torrez J. A., M. del C. Monroy-Dosta, L. H. Hernández Hernández, J. Bustos-Martínez, A. Hamdan-Partida, J. Castro-Mejía and D. I. Orozco-Rojas**
Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and digestive enzymes activity fed with autochthonous probiotics 73-81
- NOTAS CIENTÍFICAS**
- Gutiérrez-Benítez O., G. Galindo-Cortes, E. Velarde González and D. Salas Monreal**
Monterrey's sardine catch series analysis, *Sardinops sagax* in the Gulf of California, Mexico 83-87
- Medina-Rosas P. y A. Raymundo-Huizar**
Segundo reporte de la quimera *Harriotta raleighana* (Chondrichthyes: Rhinochimaeridae) en Bahía de Banderas, Jalisco, México 89-92
- Instrucciones para autores** 93-96
- Instructions for authors** 97-100
- Número 3**
- De la Cruz-Leyva Ma. C., J. U. González-de la Cruz, T. Durán-Mendoza, S. López-Martínez, A. I. Corona-Cruz, M. Zamudio-Maya and R. A. Rojas-Herrera**
Bacterial flora associated with commercial *Octopus maya* captured in the Yucatan Peninsula, Mexico 101-108
- Hernández-Almeida O. U., K. M. Estrada-Gutiérrez, D. A. Siqueiros-Beltrones y E. A. Inda-Díaz**
Composición de especies de diatomeas en la dieta *in situ* del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en un sistema estuarino 109-127
- Góngora-Gómez A. M., P. A. Sandoval-Rivera, L. C. Villanueva-Fonseca, M. López-Meyer, J. C. Sainz-Hernández, L. G. Espinosa-Alonso, D. C. Escobedo-Urías, J. A. Hernández-Sepúlveda, H. Rodríguez-González y M. García-Ulloa**
Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* de la costa central de Sinaloa, México 129-136

Ardila-Poveda L. S.

Taxocenosis macroalgales indicadoras de calidad del agua en sistemas costeros 137-153

Cuervo-González R., P. San Martín del Angel and L. Covarrubias

Allometric growth and reduced pectoral fin regeneration rate in terrestrialized *Polypterus senegalus* 155-161

Cruz-Ramírez A. K., M. Á. Salcedo, A. J. Sánchez, J. de D. Mendoza, E. Barba, N. Álvarez-Pliego and R. Florido

Intra-annual variation of chlorophyll-*a* and nutrients in a hydraulically perturbed river-floodplain system in the Grijalva River basin 163-170

De la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria, R. Martínez-García, J. M. Piña-Gutierrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana y E. Peña

Caracterización y mejoramiento de la harina de *Cannavalia ensiformis* como alimento balanceado para *Oreochromis niloticus* 171-179

Rumahlatu D., A. Duran-Corebima, Mohamad Amin and F. Rohman

Effect of cadmium on the concentration and expression of TNF- α protein in sea urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778) 181-188

Paz-Rodríguez Y. A., M. T. Villalejo-Fuerte, E. A. Chávez, J. A. Tamayo-Fonseca, A. Campo-Castro and Nurenskaya Vélez-Arellano

Reproductive biology of *Pterois volitans* in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba 189-196

NOTA CIENTÍFICA**Santamaría-Damián S., E. I. Romero-Berny, C. Tovilla-Hernández and M. E. Gallegos-Martínez**

Recent records of *Avicennia bicolor* (Acanthaceae) on the Mexican Pacific coast with notes on its distribution and conservation status 197-202

Índice del volumen 203-204

Índice de autores 205-206

Hidrobiológica

Índice de autores

Abitia-Cárdenas L. A.	17	Duran-Corebima A.	181
Acosta-Salmón H.	1	Durán-Mendoza T.	101
Aguilar-Medrano R.	17	Escobedo-Urías D. C.	129
Aldeco-Ramírez J.	9	Espinosa-Alonso L. G.	129
Álvarez-González C. A.	171	Esquivel-Herrera A.	9
Álvarez-Pliego N.	163	Estrada-Gutiérrez K. M.	109
Amin M.	181	Flores-Ortega J. R.	17
Ángeles-Monroy M. Á.	53	Florido R.	163
Ardila-Poveda L. S.	137	Frías-Quintana C. A.	171
Arzate-Cardenas M. A.	63	Gallegos-Martínez M. E.	197
Barba E.	163	Galindo-Cortes G.	83
Blanco-Parra M. del P.	41	García-Rivas M. del C.	41
Bustos-Martínez J.	73	García-Ulloa M.	129
Campo-Castro A.	189	Góngora-Gómez A. M.	129
Campos-Dávila L.	17	González-de la Cruz J. U.	101
Castelblanco-Martínez D. N.	41	Granados-Amores J.	17
Castro-Mejía J.	73	Gutiérrez-Benítez O.	83
Cerón-Ortiz A. N.	53	Hamdan-Partida A.	73
Concha-Frías B.	171	Hernández-Almeida O. U.	109
Corona-Cruz A. I.	101	Hernández-Hernández L. H.	73
Covarrubias L.	155	Hernández-Sepúlveda J. A.	129
Cruz-Escalona V. H.	17	Herrerías-Diego Y.	45
Cruz-Ramírez A. K.	163	Inda-Díaz E. A.	109
Cuervo-González R.	155	Jean-François Hamel	49
Chávez E. A.	189	León-Escamilla J. A.	53
De la Cruz-Alvarado F. J.	171	Limón-Mendoza M. A.	53
De la Cruz-Leyva Ma. C.	101	López-Martínez S.	101
Domínguez-Domínguez O.	45	López-Meyer M.	129

Mar-Silva V.	45	Rogers A.	49
Mar-Silva L. M.	45	Rohman F.	181
Martínez-García R.	171	Rojas-Herrera R. A.	101
Mazón-Suástegui J. M.	1	Romero-Berny E. I.	197
Medina-Rosas P.	89	Rumahlatu D.	181
Medina-Nava M.	45	Salas-Monreal D.	83
Mendoza J. de D.	163	Salcedo M. Á.	163
Mercier A.	49	Sánchez A. J.	163
Monroy-Dosta M. del C.	73	Sánchez-Santillán N.	9
Moreno-Sánchez X. G.	17	San Martín del Angel P.	155
Niño-Torres C. A.	41	Sandoval-Rivera P. A.	129
Nolasco-Soria H.	171	Santamaría-Damián S.	197
Olivera-Bonilla A.	1	Sainz-Hernández J. C.	129
Orozco-Rojas D. I.	73	Saucedo P. E.	1
Palacios-Salgado D. S.	17	Siqueiros-Beltrones D. A.	109
Paz-Rodríguez Y. A.	189	Tovar-Aguilar G. I.	63
Peña E.	171	Tamayo-Fonseca J. A.	189
Peterson M. S.	17	Tovilla-Hernández C.	197
Piña-Gutiérrez J. M.	171	Velarde-González E.	83
Ramírez-Torrez J. A.	73	Vélez-Arellano N.	189
Raymundo-Huizar A.	89	Villanueva-Fonseca L. C.	129
Rico-Martínez R.	63	Villalejo-Fuerte M. T.	189
Rodríguez-González H.	129	Zamudio-Maya M.	101

HIDROBIOLÓGICA

Revista del Departamento de Hidrobiología

VOLUMEN 29

Número 3

2019

De la Cruz-Leyva Ma. C., J. U. González-de la Cruz, T. Durán-Mendoza, S. López-Martínez, A. I. Corona-Cruz, M. Zamudio-Maya and R. A. Rojas-Herrera Bacterial flora associated with commercial <i>Octopus maya</i> captured in the Yucatan Peninsula, Mexico	101-108
Hernández-Almeida O. U., K. M. Estrada-Gutiérrez, D. A. Siqueiros-Beltrones y E. A. Inda-Díaz Composición de especies de diatomeas en la dieta <i>in situ</i> del ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> en un sistema estuarino	109-127
Góngora-Gómez A. M., P. A. Sandoval Rivera, L. C. Villanueva-Fonseca, M. López-Meyer, J. C. Sainz-Hernández, L. G. Espinosa-Alonso, D. C. Escobedo-Urías, J. A. Hernández-Sepúlveda, H. Rodríguez-González y M. García-Ulloa Prevalencia de <i>Perkinsus</i> sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata <i>Megapitaria squalida</i> de la costa central de Sinaloa, México	129-136
Ardila-Poveda L. S. Taxocenosis macroalgales indicadoras de calidad del agua en sistemas costeros	137-153
Cuervo-González R., P. San Martín del Angel and L. Covarrubias Allometric growth and reduced pectoral fin regeneration rate in terrestrialized <i>Polypterus senegalus</i>	155-161
Cruz-Ramírez A. K., M. Á. Salcedo, A. J. Sánchez, J. de D. Mendoza, E. Barba, N. Álvarez-Pliego and R. Florido Intra-annual variation of chlorophyll- <i>a</i> and nutrients in a hydraulically perturbed river-floodplain system in the Grijalva River basin	163-170
de la Cruz-Alvarado F. J., C. A. Álvarez-González, H. Nolasco-Soria R. Martínez-García, J. M. Piña-Gutiérrez, B. Concha-Frías, C. A. Frías-Quintana y E. Peña Caracterización y mejoramiento de la harina de <i>Cannavalia ensiformis</i> como alimento balanceado para <i>Oreochromis niloticus</i>	171-179
Rumahlatu D., A. Duran Corebima, M. Aminw and F. Rohman Effect of cadmium on the concentration and expression of TNF- α protein in sea urchin <i>Diadema setosum</i> (Leske, 1778)	181-188
Paz-Rodríguez Y. A., M. T. Villalejo-Fuerte, E. A. Chávez, J. A. Tamayo-Fonseca, A. Campo-Castro and N. Vélez-Arellano Reproductive biology of <i>Pterois volitans</i> in the Baconao Biosphere Reserve, southern Cuba	189-196
NOTA CIENTÍFICA	
Santamaría-Damián S., E. I. Romero-Berny, C. Tovilla-Hernández and M. E. Gallegos-Martínez Recent records of <i>Avicennia bicolor</i> (Acanthaceae) on the Mexican Pacific coast with notes on its distribution and conservation status	197-202
Índice del volumen	203-204
Índice de autores	205-206
