

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA *a* TOTAL
(**ChlaT**) DEL FITOPLANCTON MARINO CON BASE EN EL METODO DE
FLUORESCENCIA MULTIESPECTRAL POR MEDIO DEL *Phyto-PAM*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

José Alfredo Mercado Santana

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.
MARZO DEL 2014

ASUNTO: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

DR. LUIS ANTONIO CUPUL MAGAÑA
COORDINADOR DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **José Alfredo Mercado Santana** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a TOTAL (**ChlaT**) DEL FITOPLANCTON MARINO CON BASE EN EL METODO DE FLUORESCENCIA MULTIESPECTRAL POR MEDIO DE **PHYTO-PAM**.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 19 de febrero de 2014



DR. EDUARDO M. SANTAMARIA DEL ANGEL
DIRECTOR DE TESIS

c.c.p. Expediente

ASUNTO: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

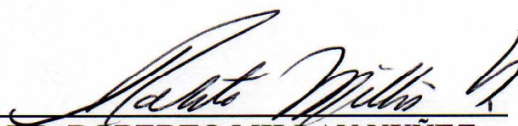
DR. LUIS ANTONIO CUPUL MAGAÑA
COORDINADOR DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **José Alfredo Mercado Santana** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a TOTAL (ChlaT) DEL FITOPLANCTON MARINO CON BASE EN EL METODO DE FLUORESCENCIA MULTIESPECTRAL POR MEDIO DE **PHYTO-PAM**.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 19 de febrero de 2014


DR. ROBERTO MILLAN NUÑEZ
SINODAL

c.c.p. Expediente

ASUNTO: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Maestría

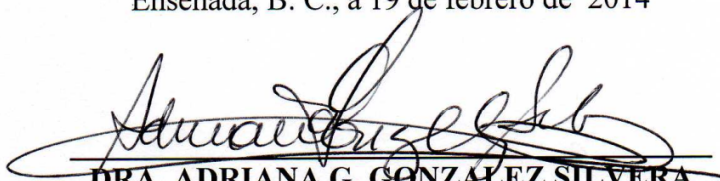
DR. LUIS ANTONIO CUPUL MAGAÑA
COORDINADOR DE POSGRADO
E INVESTIGACION, F.C.M.
Presente.-

Después de haber efectuado una revisión minuciosa sobre el trabajo de tesis presentado por el estudiante **José Alfredo Mercado Santana** para poder presentar la defensa de su examen y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera, me permito comunicarle que he dado mi voto **Aprobatorio**, sobre su trabajo titulado:

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a TOTAL (ChlaT) DEL FITOPLANCTON MARINO CON BASE EN EL METODO DE FLUORESCENCIA MULTIESPECTRAL POR MEDIO DE **PHYTO-PAM**.

Esperando reciba el presente de conformidad, quedo de usted.

Ensenada, B. C., a 19 de febrero de 2014


DRA. ADRIANA G. GONZÁLEZ SILVERA
SINODAL

c.c.d. Expediente

I. RESUMEN

Palabras Clave: Fluorescencia multiespectral, Clorofila a total, Phyto-PAM

Se realizó un diseño experimental que incluyó el ensayo 14 especies de fitoplancton cultivadas en laboratorio que se identificaron en seis grupos fitoplanctónicos (Bacilariofitas, Clorofitas, Dinofitas, Crisofitas, Cryptofitas y Prymnesiofitas) y la obtención de muestras provenientes de campo (*in situ*). El cual, tuvo como objetivo estimar la concentración de clorofila a total (ChlaT) del fitoplancton marino con base en los parámetros básicos de fluorescencia mediante el método de fluorescencia multiespectral del Phyto-PAM (4 canales de medición: 470, 520, 645 y 665nm). De los cultivos se realizó una serie de diluciones, con la finalidad de propiciar escenarios de concentraciones de Chla bajas, medias y altas. De estas diluciones, se efectuaron mediciones de manera simultánea de los parámetros de fluorescencia básicos (F_0 , F_m , F_v y Φ_{PSII}) y de concentración de ChlaT, con ayuda de un Phyto-PAM y un espectrofotómetro, respectivamente. Todo lo anterior con el objetivo de determinar el parámetro con la mejor asociación a la ChlaT y modelar la respuesta de esta relación; dicha determinación, se basó en una regresión lineal múltiple por pasos con la técnica de eliminación hacia atrás, donde se probaron los cuatro estadístico siguientes: la significancia estadística de los coeficientes ligados a las variables (canales), la significancia estadística de la constante (punto de intersección), la significancia estadística global (F de Fisher) y finalmente el valor del coeficiente de determinación lineal (R^2). El análisis por grupos mostró que 4 de los seis grupos (Dinofitas, Crisofitas, Cryptofitas y las Prymnesiofitas) encontró una mejor asociación con el parámetro de Φ_{PSII} . El análisis del conjunto de los grupos, mostró que el Φ_{PSII} se asoció mejor con la ChlaT, el cual obtuvo todos los canales y la constante significativos estadísticamente, el R^2 más alto (80.5%), así como, la prueba de significancia global mostro que esta relación fue significativa estadísticamente. Posteriormente, se procedió a modelar la relación entre el Φ_{PSII} vs ChlaT. Esta aproximación determino cuatro modelaciones finales con acotaciones particulares cada una: la modelación 1, se compone de una ecuación que estima la ChlaT para los tres escenarios de ChlaT propuestos. En las 3 modelaciones restantes se construyó un índice que ayudo a determinar los límites de los escenarios de ChlaT, el cual se llamó respuesta media de la fluorescencia multiespectral (RM_{FM}). La modelación 2, se compone de dos ecuaciones complementarias, y sus criterios de selección se definieron de manera siguiente: para ChlaT medias-bajas un $RM_{FM} < 0.4$ y un $RM_{FM} > 0.4$ para ChlaT altas, las modelaciones 3 y 4, se componen de tres ecuaciones, pero con diferentes criterios de selección, la modelación 3 se acoto bajo los criterios siguientes: para condiciones de $RM_{FM} < 0.36$, se utilizará la ec. De ChlaT bajas, para un RM_{FM} entre 0.36 a 0.45 se utilizará la ChlaT medias y para ChlaT altas un $RM_{FM} > 0.45$. La modelación 4, resultó en los criterios siguientes: para condiciones con una $RM_{FM} < 0.1$ se usara la ec. de ChlaT bajas; con un RM_{FM} entre 0.101 a 0.4 se usará la ec. de ChlaT medias y la ec. de ChlaT altas se usara con un $RM_{FM} > 0.4$. La validación de las cuatro modelaciones se basó en un análisis *Match-up* con 232 datos de campo de 3 cruceros y una estación en BSQ. Los resultados mostraron que la modelación 3 fue la que mejor estimo la concentración de ChlaT y esto se reflejó en los valores de los estadísticos de prueba un $r_{pearson}$ de 0.93, un RMSE de 0.39 y un sesgo de 0.17, después la modelación 4 presentaron valores aceptables de $r_{pearson}$ de 0.91 y RMSE de 0.59, pero con sesgo alto de 0.87, seguido por la modelación 1 que obtuvo un $r_{pearson}$ 0.82 un RMSE de 0.74 y un sesgo del 0.36, la modelación 2 fue la que peor estimo la ChlaT y esto se reflejó en el $r_{pearson}$ de 0.66 en el RMSE de 0.93 y en el sesgo muy alto de 1.16. Particularmente se probó la estimación de ChlaT en condiciones de marea roja, este estudio probó que el Phyto-PAM presenta una alternativa para estimar de manera rápida la concentración de ChlaT en dichas condiciones y que la modelación 3 es la opción más factible.

II. DEDICATORIA

Al iniciar tan importante camino en mi vida hubo quienes creyeron en mí desde un comienzo y lucharon a mi lado para conseguirlo y hubo quienes sin saberlo me impulsaron a continuar, es por ello que hoy quisiera agradecer su valiosísima colaboración dedicándoles este logro... uno muy importante en mi vida:

A mis padres, R. Martina Santana Bartoleño y J. Alfredo Mercado Velazco, quienes son parte fundamental de mi vida y quienes a través de su esfuerzo me han dado la oportunidad de terminar mis estudios con éxito, confiando en mí, para poder realizar este trabajo lejos de mi hogar. A ellos que me han formado con buenos valores y me han motivado día a día para llegar a alcanzar mis sueños.

A mis hermanas, Yuliana, Magali y Graciela, porque sin importar la distancia, han estado para darme consejos, apoyarme y como siempre lo han hecho, consentirme.

A mis princesas, Fernanda, Renata y Jimena, por recordarme lo maravilloso de la vida con cada abrazo y sonrisa recibida.

A mis amigos de profesión, Karina, Denisse, Rosabel, Angélica, Rosa Angélica, Zafiro y Manuel, por mostrarme lo valioso de la vida.

*En especial a la memoria de mi amigo, compañero y hermano **Joel**, quien vivió con valentía, hizo lo que quiso y que enfrentó una mala situación con agallas...*



Bio. Mar. Joel Flores Anduaga (1987-2013)



III. AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por otorgarme el grado de maestro en ciencias en oceanografía costera y por la oportunidad concedida para continuar fortaleciéndome académicamente.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca, para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr Eduardo Santamaría del Ángel por aceptarme como su estudiante y por brindarme la confianza de trabajar en un tema que los dos fuimos explorando durante la investigación, por ser a la vez director y amigo.

A la Dra. Adriana González Silvera y el Dr. Roberto Millán-Núñez, por brindarme todo su apoyo ante las preguntas surgidas durante esta investigación, en especial, por sus comentarios tan atinados para la escritura de esta tesis.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza por la disposición de la muestras de fitoplancton, que a pesar de los inconvenientes siempre estuvo dispuesto a ayudarme y aconsejarme para que todo saliera en tiempo.

Agradezco a la Secretaría de Marina Armada de México (SEMAR) por el apoyo brindado para la realización de los cruceros oceanográficos, a través de los B/O Altair (Noviembre de 2002) y Río Suchiate (Junio y Noviembre de 2003), sin los cual esta tesis no podría haberse realizado; al personal de marina y alumnos de la UABC por las mediciones de los datos, en especial, a la Dra. Adriana por la disposición solidaria de los datos de Phyto-PAM de los cruceros.

A todos los compañeros que han pasado por el grupo "POPEyE", en especial a María Fernanda, Yolohiti y Raúl "Lalo", por su ayuda invaluable durante los experimentos con el Phyto-PAM, porque sin su ayuda este trabajo no hubiera tenido buenos resultados.

A los amigos que conocí durante mi estancia en Ensenada: en especial a Mariana, Jonatan y Santa por abrirme las puertas de su casa y porque siempre tuvieron la disposición y las palabras adecuadas para hacer sentir como su amigo; a María Fernanda y Yoloxochitl por sus palabras de aliento y por su ayuda incondicional durante mi estancia; A el “Lalo” por su incondicional amistad y por haberme mostrado la parte bonita de Ensenada; a los compañeros de generación y a todos los que en cierto modo nos conocimos en el camino.

A mi nueva familia adoptiva, las Mendoza y los Murillo, porque me acogieron como parte de su familia, porque siempre estuvieron pendientes de mí ser y porque siempre recibí una sonrisa y una palmadita que me levanto en los momentos de flaqueza... Gracias de corazón.

Al personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas, en especial a Angélica Arce, por su buena disposición y atención al orientarme siempre en lo referente a los trámites administrativos.

A todos aquellos que en este momento escapan de mi mente, pero formaron parte importante en esta etapa de mi vida.

En especial a DIOS, por permitir vivir esta maravillosa experiencia, por darme siempre lo mejor cada día y por permitirme crecer espiritual y emocionalmente.

GRCIAS A TODOS

“El mar nunca ha sido amigable para el hombre. Siempre ha sido cómplice de la inquietud humana”

Joseph Conrad

IV.ÍNDICE

I. Votos Aprobatorios	I
II. Resumen	IV
III. Dedicatoria	V
IV. Agradecimientos	VII
V. Índice	IX
VI. Lista de Tablas	X
VII. Lista de Figuras.	XIII
VIII. Lista de Ecuaciones	XV
IX. Lista de Acrónimos	XVI
1. Introducción	1
1.1. Consideraciones teóricas previas	6
1.1.1. ¿Qué es la Fluorescencia de la Chla?	6
1.1.2. ¿Qué es el Fotosistema II (PSII) y su relación con la medición de fluorescencia?	8
1.1.3. ¿Qué es el <i>Phyto-PAM</i> y cómo funciona?	10
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos particulares	17
4. Materiales y Métodos	18
4.1. Obtención de cultivos de fitoplancton	18
4.2. Medición de ChlaT y parámetros de fluorescencia	19
4.3. Asociación entre la concentración de ChlaT y los parámetros de fluorescencia	26
4.3.1. Determinación del mejor(es) parámetro(s) asociado a la ChlaT	27
4.4. Modelación de la ChlaT con el mejor parámetro de fluorescencia.	29
4.5. Significancia estadística de las modelaciones	31
4.5.1. Validación de las modelaciones obtenidas	31
5. Resultados	36
5.1. Asociación de los parámetros de fluorescencia y la ChlaT por grupos fitoplanctónicos	36
5.2. Asociación de los parámetros de fluorescencia y la ChlaT englobando todos los grupos fitoplanctónicos	40
5.3. Modelación de la ChlaT con base en el mejor parámetro de fluorescencia	44
5.4. Validación de las modelaciones propuestas para estimar la ChlaT	54
6. Discusiones	58
6.1. Algunas consideraciones para el uso de los parámetros de fluorescencia en la estimación de la ChlaT	75
7. Conclusiones	78
8. Literatura Citada	79

V. LISTA DE TABLAS

Tabla		PAGINA
1	Definición de los parámetros de fluorescencia derivados del Phyto-PAM, las celdas en color verde corresponden a los parámetros básicos, obtenidos en base a el primer pulso de luz (MF32) y las celdas blancas corresponden a los parámetros que se derivan de una curva luz (Fig. 2). Modificado de Cosgrove (2007).	25
2	Síntesis de los datos usados para la validación de las modelaciones obtenidas.	32
3	Resumen del análisis para determinar el parámetro con la mejor asociación con la ChlaT por cada grupo fitoplanctónico. La primer columna corresponde al parámetro que resulto con la mejor asociación con la ChlaT, la columna 2 (Constante) corresponde a la prueba de significancia del punto de intersección o constate; la columna 3 (Variables) corresponde a los valores obtenidos de los coeficientes ligados a cada canal; la columna 4 (Estadísticos) corresponden a los valores de $t_{crítica}$; la columna 5 (CD) corresponde a los valores del coeficiente de determinación; y las columnas 6 (Modelo) y 7 (Estadístico) corresponde a los valores obtenidos en el análisis del modelo global y la última columna corresponde al número de datos. Los valores en rojo hacen referencia a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis estadísticos.	39
4	Asociación de los parámetros de fluorescencia con su valor correspondiente de ChlaT. Por un análisis de regresión múltiple su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de los parámetros del modelo probada con $t_{0.05; 591}$ crítica = 1.96, significancia global del modelo probada con $F_{0.05; 4, 595}$ crítica = 2.38. n=595. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.	42
5	Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de la ChlaT, para la modelación 2. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2).	46

Significancia de las variables del modelo probada con $t_{\text{critica } 0.05; 191} = 1.97$ para el bloqueo > 0.4 y $t_{\text{critica } 0.05; 312} = 1.96$ para bloqueo < 0.4 , significancia global del modelo probada con $F_{\text{Critica } 0.05; 4, 194} = 2.47$ para el bloqueo < 0.4 y $F_{0.05; 4, 315 \text{ critica}} = 2.40$ para bloqueo > 0.4 . Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.

- | | | |
|---|---|----|
| 6 | <p>Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de la ChlaT, para la modelación 3. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de las variables y la constante del modelo probada con $t_{\text{critica } \alpha = 0.05; n-p}$. Significancia global del modelo probada con $F_{\text{critica } \alpha = 0.05; p, n-1}$. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.</p> | 49 |
| 7 | <p>Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de ChlaT, para la Modelación 4. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de las variables y la constante del modelo probada con $t_{\alpha = 0.05; n-p \text{ critica}}$, significancia global del modelo probada con $F_{\alpha = 0.05; p, n-1 \text{ critica}}$. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.</p> | 53 |
| 8 | <p>Sinopsis de los criterios de selección para cada modelación, el número de ecuaciones complementarias y los resultados de los descriptores estadísticos utilizados en el análisis Match-up de ChlaT_{observada} (HPLC) y ChlaT_{calculada} (Φ_{PSII}). Para las cuatro modelaciones propuestas. Valor critico de $r_{\text{pearson } 0.05, 232} = 0.117$.</p> | 57 |
| 9 | <p>Resumen del análisis de significancia de los coeficientes de los canales y del coeficiente de determinación por ecuación para las cuatro modelaciones propuestos para calcular la ChlaT. Dónde: el representa los coeficientes que resultaron con signo positivo, el representa los coeficientes que resultaron con signo</p> | 65 |

negativo, el $\square$ representa los canales que no fueron significativos en la ecuación y el $\star$ representa los coeficientes de mayor peso en cada ecuación.

- | | | |
|----|--|----|
| 10 | <p>Análisis de regresión lineal para los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$, como predictores de la concentración de ChlaT, con base en los valores obtenidos de coeficiente de determinación (R^2). Significancia de la variable y la constante del modelo probada con $t_{\text{critica } \alpha} = 0.05$; n-p, la significancia global del modelo probada con $F_{\text{critica } \alpha} = 0.05$; p,n-1. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%.</p> | 69 |
|----|--|----|

VI. LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Espectro de absorción de la Chla (línea azul) y espectro de fluorescencia de la Chla (línea roja). Tomado de Maxwell y Johnson (2000).	7
2	Estructura y funcionamiento del PSII (P ₆₈₀).	11
3	Cinética de inducción de fluorescencia, el primer grafico (lado izquierdo) ilustra la respuesta de fluorescencia de una muestra adaptada a oscuridad cuando es sometida a un pulso de luz saturación de tiempo corto (~10μS), y se define la nomenclatura básica asociada a esta medición (referencias en el texto). Las flechas oscuras hacia arriba indican inducción por pulso de luz, se ilustran los parámetro de fluorescencia mínima (F ₀), fluorescencia máxima (F _m), el parámetro derivado de estas dos, la fluorescencia variable (F _v). La figura de lado derecho, ilustra la respuesta de fluorescencia cuando una muestra es sometida a pulsos de luz cortos con diferencia de intensidades con intervalos de 1 minuto cada uno (también conocida como curva rápida de luz), las flechas blancas indican activación (arriba) y desactivación (abajo) de la luz actínica (luz de medición), de estas mediciones se derivan parámetros secundarios de fluorescencia de importancia en el estudio de la fotosíntesis, los cuales se definen la tabla I. Tomado de Schriber, (2004).	15
4	Representación Esquemática del experimento de conteo de células con cámara de Neubauer y concentración de Chla, que facilito la determinación del número de diluciones necesarias por especie de fitoplancton.	20
5	Diagrama esquemático del análisis de las diluciones por especies de fitoplancton con Phyto-PAM y su respectivo valor de concentración de ChlaT.	30
6	Área de estudio correspondiente a las campañas donde se obtuvieron datos de campo. Figura 3a representa los cruceros oceanográficos reportados por (Barocio-León, 2006), donde se aprecia la red de estaciones muestreadas (círculos vacíos). Las cruces rojas indican las estaciones muestreadas en Noviembre 2002; las	33

equis verdes indican estaciones muestreadas durante Junio de 2003; los puntos azules indican estaciones muestreadas durante Noviembre de 2003. Figura 3b, señala la ubicación de la estación de muestreo dentro de la laguna Bahía San Quintín (BSQ) (círculo oscuro) reportada por Segura-Soto (2013).

7	Diagrama de dispersión de los parámetros de fluorescencia que resultaron significativos (eje de abscisas) con respecto a la concentración de ChlaT (eje de ordenadas) para los seis grupos analizados. Canal-470nm (Círculos azules), Canal-520 (Círculos verdes), Canal-645 (Círculos rojos) y Canal-665 (Círculos cafés).	38
8	Grafica de dispersión de los parámetros de fluorescencia con respecto a la concentración de ChlaT para los 4 canales. (a) Corresponde a la relación F_0 vs ChlaT; (b) corresponde a la relación F_m vs ChlaT; (c) corresponde a la relación F_v vs ChlaT y (d) corresponde a la relación Φ_{PSII} vs ChlaT. Canal 470 (círculos azules), canal 520 (círculos verdes), canal 645 (círculos Rojos), Canal 665 (círculos Cafe), $n=593$.	43
9	Gráfico de vectores del análisis de factor, entre RMFM (Ec. 12) que fueron bloqueados como bajos (< 0.1) medios ($0.1- 0.4$) y altos (> 0.4) y la ChlaT se agrupo como ChlaT bajas (< 0.5 mg / L) ChlaT medias (0.51 a 1.5 mg/ L) y ChlaT altas (> 1.51) y donde se aprecia la asociación de los datos de ChlaT y $RM_{FM}\Phi_{PSII}$.	51
10	Relación entre la ChlaT observada (HPLC) y ChlaT calculada estimada a partir de los modelos propuestos con Φ_{PSII} (mg/L), $n = 232$. Las líneas diagonales a 450 representan la relación ideal 1:1. (a) ChlaT estimada a partir de la Modelacion1, (b) ChlaT estimada a partir de la Modelación 2, (c) ChlaT estimada a partir de la modelación 3 y (d) ChlaT estimada a partir de la Modelacion 4.	56
11	Relación entre la ChlaT observada (HPLC) y ChlaT calculada estimada a partir del modelo propuesto con dos canales ($\Phi_{PSII-645}$ y $\Phi_{PSII-665}$) (mg/L), $n = 232$. La línea diagonal a 450 representa la relación ideal 1:1.	70

VII. LISTA DE ECUACIONES

FIGURA		PAGINA
1	Derivación de la fluorescencia variable (FV).	14
2	Derivación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}).	14
3	Calculo de la concentración de Chla (Lorenzen, 1967).	21
4	Calculo de los Feopigmentos (Lorenzen, 1967).	21
5	Ecuación general de regresión lineal múltiple basada en un polinomio de Taylor de primer grado cuarto orden.	26
6	Derivación del coeficiente de determinación (R^2).	28
7	Sumatoria de cuadrados debida a la regresión o explicada por la regresión (SCR).	28
8	Sumatoria de cuadrados totales (SCT).	28
9	Derivación del índice de Respuesta Media de la Fluorescencia Multiespectral (FM_{FM}).	30
10	Calculo del coeficiente de correlación lineal de Pearson ($r_{pearson}$).	34
11	Calculo del error cuadrático medio (RMSE).	35
12	Calculo del sesgo BIAS.	35

VIII. LISTA DE ACRONIMOS

NOTA:

- Los parámetros de fluorescencia de Chla se definen en la tabla 1 (pag. 26)

ATP	Adenosín trifosfato
Chl	Clorofila
Chla	Clorofila a
ChlaT	Clorofila a Total
CR	Centro de reacción
CRII*	Centro de reacción del fotosistema II reducido
D1	Proteína captadora de luz que rodea el CR
D2	Proteína captadora de luz que rodea el CR
E	Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
F	Fluorescencia
Feo	Feofitina
FRR	Taza rápida de fluorescencia
LED	Diodo de emisión de luz
LHCI	Centro de recolección de luz (antena) del PSI
LHCII	Centro de recolección de luz (antena) del PSII
NPQ	Cosecha no-fotoquímica
NPQ _{max}	Cosecha no-fotoquímica máxima
PAM	Puso de amplitud modulada
POP	Productividad orgánica primaria
PQ _A	Plastoquinona
PQH ₂	Plastoquinol
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PSU	Unidad fotosintética
QB ⁻	Plastoquinona reducida
qN	Amortiguamiento no-fotoquímico
qP	Amortiguamiento fotoquímico
RCII	Centro de reacción del fotosistema II (también se le conoce como P ₆₈₀)
S ₀	Estado de excitación cero
S ₁	Estado de Excitación 1
S ₂	Estado de Excitación 2
Unidad US	Unidad de emisión y detección (componente del Phyto-PAM)
Φ_{PSII}	Rendimiento cuántico optimo a través del PSII
$\Phi_{\text{PSII}}^{\text{max}}$	Rendimiento cuántico máximo del transporte de electrones a través del PSII

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el ciclo global de carbón y su componente de bióxido de carbono atmosférico son temas de interés internacional. Se cree que los procesos biológicos por parte del fitoplancton pueden alterar significativamente el intercambio de carbón entre la atmósfera y el océano. Se ha estimado que la biomasa fitoplanctónica aporta únicamente entre 1 al 2% del carbono total del planeta. A pesar de esta biomasa relativamente baja, estos organismos, fijan entre 30 y 50 Gt (Giga toneladas) de carbono anualmente vía fotosíntesis (Falkowski y Raven, 2007).

En otras palabras, la fotosíntesis marina puede reducir la presión parcial de bióxido de carbono en las aguas superficiales, originando que una porción de carbón orgánico se ha exportado al fondo oceánico provocando un efecto neto de flujo de carbón de la atmósfera al océano. Dicho fenómeno es conocido como la “*bomba biológica*” (Lewis, 1992).

Sin embargo, las estimaciones de flujos de carbono se basan en modelos matemáticos, los cuales comprenden desde simples ajustes empíricos, pasando por semi-analíticos hasta modelos analíticos complejos (Platt y Sathyendranath, 1993). En general, la mayoría de los modelos deben ser alimentados con valores de biomasa fitoplanctónica y de la capacidad fotosintética de la población fitoplanctónica. Por convención, la biomasa fitoplanctónica es expresada en concentración de Clorofila a (Chla), por ser un pigmento contenido en todos los grupos de fitoplancton (exceptuando las Proclorofitas) y la capacidad fotosintética

es expresada en parámetros fotosintéticos como el rendimiento cuántico máximo (Φ_{PSII}^{max}) (Kroon *et al.*, 1993).

En un principio las aproximaciones para estimar la Chla se basaron en la concentración de un volumen determinado de muestra y la extracción del pigmento por medio de solventes orgánicos, evaluando dicha concentración de pigmento por medios colorimétricos o fluorimétrico. Estos métodos son clasificados como aproximaciones *in vitro*.

Las aproximaciones colorimétricas o espectrofotométricas más usadas son las descritas por: Parsons y Strickland (1963); UNESCO (1966); Lorenzen (1967) y Jeffrey y Humphrey (1975). En general, estas aproximaciones consisten en extraer los pigmentos mediante un solvente orgánico y leer la absorción de la luz en un espectrofotómetro a longitudes de onda específicas para cada pigmento. La base de estos procedimientos, es que las células se rompan y los pigmentos se disuelvan en el solvente.

Otro método tradicional *in vitro* para medir la concentración de Chla, es el método fluororimétrico (Holm-Hansen *et al.*, 1965), el cual se basa en la aplicación de una única longitud de onda de excitación (~436nm) y la obtención de una respuesta en la longitud de onda de ~685nm. Una de las ventajas de este método es su sensibilidad en comparación con los métodos espectrofotométricos, que puede ser de 2 a 3 órdenes de magnitud más sensibles.

A últimas fechas, se ha usado la metodología *in vitro*, de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC, por sus siglas en inglés) (Jeffrey *et al.*, 1997), la

cual es más precisa porque permite cualificar y cuantificar otros pigmentos en una muestra de agua, además de la Chla. En esta aproximación, para poder comparar con los resultados de derivados de las otras dos aproximaciones *in vitro* (fluorescencia y espectrofotometría), es necesario considerar la Chla Total (ChlaT), que es la suma de la Chla y de sus pigmentos derivados (Monovinil Chla, Divinil Chla, Clorofilide a, el Alómero y Epímero de la Chla), los cuales absorben en la misma longitud de onda (Trees *et al.*, 2000).

Paralelo a las aproximaciones anteriores y con la evolución de los avances tecnológicos en este campo, se han desarrollado otro tipo de aproximaciones para la evaluación de la Chla, como lo es la fluorescencia *in vivo*. Desde su primera descripción (Lorenzen, 1966), estos métodos han sido catalogados como una herramienta potencial en investigaciones básicas de la fotosíntesis, debido a que, permiten muestreos *in situ* de organismos vivos (*in vivo*). La característica básica de este tipo de aproximaciones, es que no son de carácter intrusivo, y en general no requieren ninguna preparación de la muestra, dando resultados de manera instantánea (Holm-Hansen *et al.*, 1965; Lorenzen, 1966; Yentsch, 1980; Desiderio *et al.*, 1997; Beutler *et al.*, 2002).

En un comienzo, los métodos de fluorescencia *in vivo* se basaron en una única longitud de onda de excitación (generalmente ~435nm) (Kiefer y Chamberlin, 1989). Durante los últimos años, los esfuerzos de la comunidad científica, particularmente los que estudian la fotosíntesis en el medio acuático, se centraron en la posibilidad de ampliar el uso de la fluorescencia de la Chla, para describir al mismo tiempo, la variabilidad espacio temporal de la biomasa y taxocenosis

fitoplanctónica, de manera continua y en escalas más amplias, (Falkowski y Raven, 2007, Falkowski *et al.*, 1998; Field *et al.*, 1998). Estos esfuerzos resultaron en el diseño de metodologías de fluorescencia con capacidad multiespectral, que se basan en la excitación selectiva de las antenas de los centros de reacción (CR), con base en dos o más longitudes de onda de excitación. Con algunas suposiciones y bajo ciertas circunstancias, estas aproximaciones se han usado para poder caracterizar la composición taxonómica de la comunidad de fitoplancton (Schreiber, 1995c, 1998; Schreiber *et al.*, 1998; Beutler *et al.*, 2002).

Con la introducción de fluorímetros portátiles se abrió el camino para aplicaciones prácticas en campo. Este tipo de fluorímetros fue el resultado de la reducción de tamaño y peso de los instrumentos de laboratorio, así como, las capacidades de sumergirse en agua, acoplando sistemas de operación remota (por ejemplo CTD) e incluso se desarrollaron sistemas continuos de bombeo de agua a través del instrumento (Cosgrove, 2007).

Los fluorímetros portátiles pueden ser simples (una longitud de onda) o multiespectrales, y se encuentran disponibles comercialmente varios instrumentos, clasificados de la siguiente manera:

1. Fluorímetro de Pulsos de Amplitud Modulada (PAM)
2. Fluorímetro de tasa de repetición rápida de fluorescencia (FrrF)
3. Fluorímetro de Sistema de inducción y relajación de fluorescencia (FIRE)
4. Fluorímetro de bomba y sonda (PnP)
5. Fluorímetro de inducción

Los fluorímetros tipo PAM y FrrF son los más populares. Dentro de los PAM varios modelos se han diseñado para el estudio del fitoplancton marino y fotosíntesis (XE-PAM, Water-PAM, Phyto-PAM, Microscopy-PAM y PAM-101, entre otros). Los fluorímetros tipo FrrF se utilizan comúnmente para hacer mediciones especializadas de los parámetros de la fotosíntesis (*vgr.* La medición de absorción de la sección cruzada del PSII). Los fluorímetros PAM y FrrF han sustituido en gran medida a los fluorímetros PnP y de inducción (Schreiber, 2004, Cosgrove, 2007).

Así mismo, con algunas suposiciones, la última generación de fluorímetros portátiles se ha especializado en estimar los parámetros de la fotosíntesis de cada grupo fitoplanctónico en muestras mixtas, por ejemplo el AquaTracka II (Chelsea Instruments, Reino Unido), los C3 y C6 multi-sensor platform (Turner Designs, EE.UU.), el AOA (analizador en línea de fitoplancton), el fluorímetro de monitoreo de Chla y toxicidad (bbe, Moldaenke, Alemania) y el Multi-Exciter (JFE Alec Co., Ltd, Japón), entre otros.

Este estudio utiliza el fluorímetro Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemania) para estimar la fluorescencia de la Chla, el cual, se basa en la respuesta de excitación de los centros de reacción del fotosistema II (CRII) contenidos en la Chla del fitoplancton (Krause y Weis, 1991). Para excitar la Chla, el Phyto-PAM utiliza un arreglo de 4 diferentes diodos de emisión de luz (LEDs) con picos máximos de longitud de onda de emisión de 470, 520, 645 y 665 nm (Phyto-ML) (Kolbowski y Schreiber, 1995; Schreiber, 1998; Beutler *et al.*, 2002). Permite obtener información detallada sobre los parámetros básicos de fotosíntesis, como

la fluorescencia mínima (F_0), la fluorescencia máxima (F_m), la fluorescencia variable (F_v) y el rendimiento cuántico óptimo del fotosistema II (Φ_{PSII}) (Schreiber, 2004).

1.1. CONSIDERACIONES TEÓRICAS PREVIAS

Los experimentos y modelaciones realizados en este trabajo, se basan en los principios teóricos fundamentales de fluorescencia de la Chla, con un fuerte énfasis en los procesos de conversión energética. Este subcapítulo pretende proporcionar un breve panorama de la teoría básica de la fluorescencia de la Chla en ambientes acuáticos, y es organizado en forma de 3 preguntas básicas:

1.1.1. ¿Qué es la Fluorescencia de la Chla?

En general se puede definir a la fluorescencia como la re-emisión de energía en forma de un fotón (luz) cuando un electrón vuelve al estado fundamental de un estado excitado (Beutler *et al.*, 2003). El ciclo completo es muy breve, y transcurre en nanosegundos, por lo que puede considerarse prácticamente instantáneo. Debido a que este fenómeno es de tan corta duración, se puede diferenciar la fluorescencia de otro fenómeno luminoso conocido como fosforescencia (Falkowski y Kolber, 1993; Falkowski y Raven, 2007).

En métodos *in vitro*, específicamente en los espectrofotométricos, se ha observado que el espectro de absorción de la Chla (Fig. 1) presenta dos picos de mayor absorción, siendo el de mayor magnitud el cercano a los ~430nm (en la región azul del espectro de luz visible) y el otro en longitud de onda ~680nm (en la región roja del espectro de luz visible) (Schreiber, 2004 entre muchos otros).

La medición *in vitro* por medio de fluorescencia, se enfoca en las longitudes de onda donde se encuentran los picos de mayor absorción de la Chla. Como ya se mencionó anteriormente, esta aproximación utiliza la aplicación de una única longitud de onda de excitación a ~436nm y la obtención de una respuesta en la longitud de onda de ~685nm (Holm-Hansen *et al.*, 1965) (Fig.1).

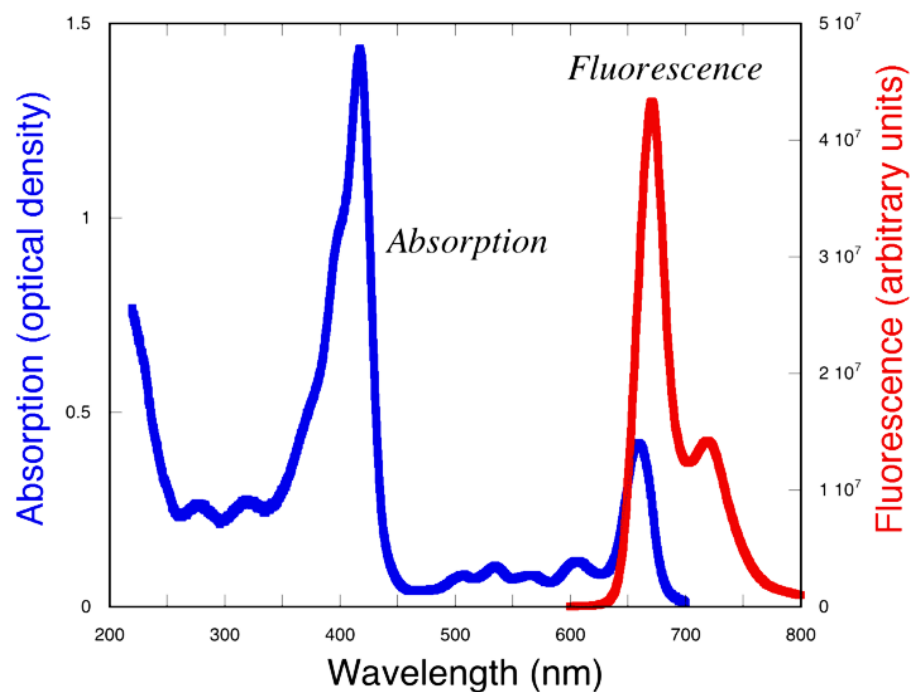


Figura. 1.- Espectro de absorción de la Chla (línea azul) y espectro de fluorescencia de la Chla (línea roja). Tomado de Maxwell y Johnson (2000).

Según Falkowski y Kolber (1993); Falkowski y Raven (2007) y Papageorgiou y Govindjee (2004) el principio fisiológico se debe a que una molécula de Chla en estado de excitación cero (S_0) es excitada por la absorción de un fotón de longitud de onda inferior a 670 nm en la región roja del espectro de luz visible (600 a 670

nm). Cuando esto sucede se llega a un estado de excitación 1 (S_1) y si el fotón absorbido, es de una longitud de onda más corta (*vgr.* luz azul, $\sim 420\text{nm}$) la energía extra, excitara la molécula de Chla a un estado excitación 2 (S_2) donde la energía absorbida será usada en los procesos fotoquímicos; una pequeña porción de esta se emitirá en forma de calor.

Debido a lo anterior, la molécula de clorofila pasa rápidamente de estado S_2 al S_1 y del S_1 al S_0 . Es en este último cambio del estado de excitación (S_1 al S_0) es cuando se produce la fluorescencia, y se deben cumplir las siguientes características:

1. Que la energía de este fotón no sea utilizada en la separación de la carga.
2. Que la energía de este fotón no sea disipada en forma de calor (excitación térmica).
3. Que la energía de este fotón no sea transferida a una molécula vecina o al centro de reacción del PS.

Una compilación más detallada de los procesos fisiológicos involucrados en la fluorescencia es descrita por Papageorgiou y Govindjee (2004).

1.1.2. ¿Qué es el Fotosistema II (PSII) y su relación con la medición de fluorescencia?

Según Krause y Weis (1991) y Falkowski y Raven (2007), el fotosistema II (PSII) es considerado una “trampa de luz” poco efectiva, ya que parte de la energía absorbida es disipada en forma de fluorescencia, mientras que el fotosistema I (PSI), es considerado como una “trampa de luz” eficiente, ya que existe menos posibilidad de que la energía absorbida pueda escapar en forma de fluorescencia.

Se ha estimado que a temperatura ambiente ~90 al 95% de la fluorescencia total proviene del PSII y representa ~10% del total de la luz absorbida por la Chla (Nicklisch y Köhler, 2001).

Con base a lo antepuesto y considerando el subcapítulo anterior, debemos enfatizar que todos los fluorímetros conocidos se basan en la estimación de la fluorescencia que proveniente principalmente del PSII.

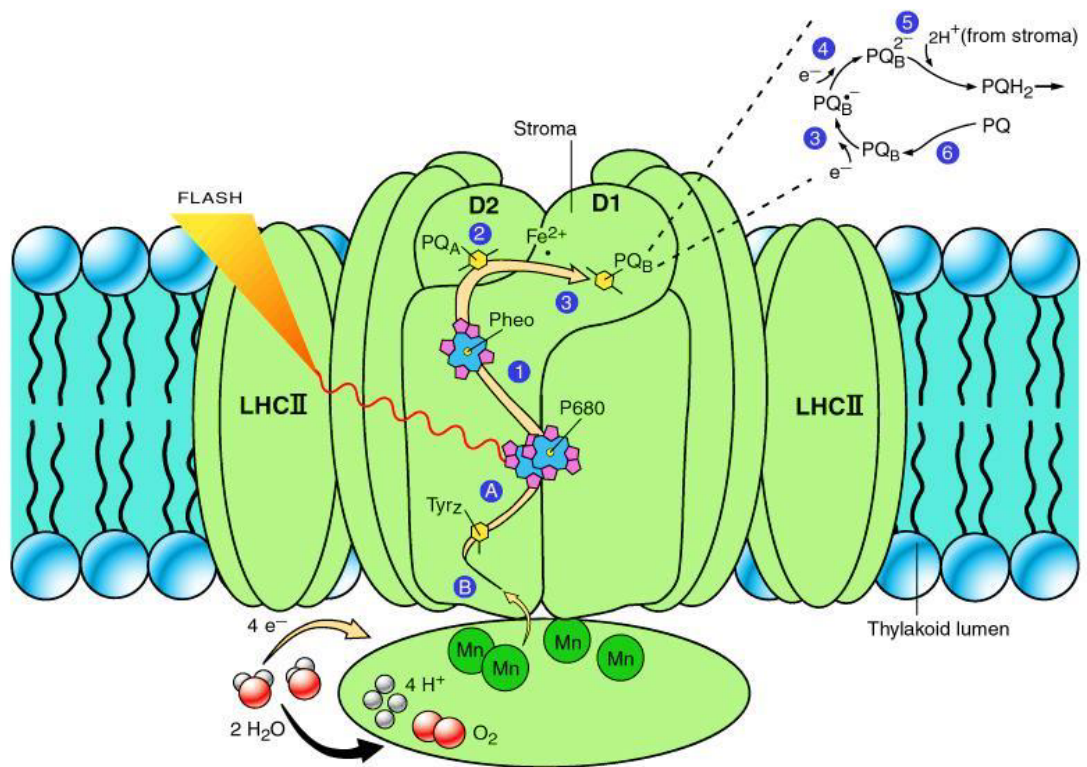
El PSII es un complejo de proteínas transmembranales (atraviesa la membrana tilacoidal), que unen los componentes que se encargan de la separación de la carga inicial de los aceptores y donadores de electrones. El PSII conforma los componentes necesarios para que el proceso de captación de energía continúe a través del proceso de fotosíntesis (Vitadello *et al.*, 2010).

Este complejo de proteínas forman el centro de reacción del PSII (CRII) y son: la clorofila catalítica especializada (Chl_{680}), también conocida como P_{680} (el subíndice 680, se refiere a la longitud de onda de absorción) unida con las proteínas D1, D2 y citocromo b_{559} (Cyt-b_{559}) (Greene *et al.*, 1991; Geider *et al.*, 1993b; Falkowski, 1994; Bergmann *et al.*, 2002). Las proteínas D1 y D2 componen todos los aceptores y donantes principales del PSII junto con el RCII (Fig. 2). Se conoce que D1 presenta una tasa rápida de rotación inducida por la luz (Carpentier, 1997).

El CRII se encuentra rodeado por un conjunto de pigmentos fotosintéticos periféricos (CP43 y CP47) conocida como antena del PSII, que recolectan la luz a diferentes longitudes de onda. Pero, en lugar de ser catalíticos, estos pigmentos

están involucrados en la transducción de la energía y por lo general funcionan como un “trampa” que lleva energía hacia el CRII, actuando como una “antena efectiva” (Falkowski y Raven, 2007). Las bandas de absorción de estos pigmentos son de una longitud de onda más corta que la del CRII, la energía atrapada es transferida preferentemente hacia el CRII (hacia abajo), esta absorción presenta un pico máximo (~longitud de onda rojo), alcanzándose el estado S_1 que entra en un estado excitado (RCII*). Sin embargo, la diferencia en las bandadas de absorción es tan pequeña que la energía puede escapar consecuentemente del CRII y regresar a los pigmentos periféricos, por ello, al CRII se le conoce como una “trampa superficial” (Falkowski y Raven, 2007).

Estudios en plantas superiores, han encontrado que PSII se localiza preferentemente en las regiones apiladas del tilacoide, mientras PSI y la ATPsintetasa son más comunes en las regiones del estroma no apiladas (Büchel y Wilhelm, 1993). El fitoplancton, especialmente el que contiene Chl *c* y las cianobacterias, tienden a presentar menos capas tilacoidales que las plantas superiores, por lo que se esperaría, una reducción en la separación espacial del PSII y el PSI y ATPsintetasa (Büchel y Wilhelm, 1993).



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Figura. 2.- Estructura y funcionamiento del PSII (P_{680}). Muestra la estructura del PSII dentro de la membrana del tilacoide, también se muestra la posición de LHCII (complejos captadores de luz, por sus siglas en inglés), se observa la posición de las proteínas D1 y D2 con respecto al CRII. Se ejemplifica el flujo de electrones en flechas amarillas, inicia con la absorción de la luz por el P_{680} , se produce la separación de la carga primaria en la que un electrón es donado por $CRII^*$ a la Feofitina (numero 1) y el centro de reacción se convierte en un radical catiónico ($CRII^+$). $CRII^+$ es un oxidante fuerte, este, regresa a su estado $CRII$ mediante la aceptación de un electrón de un grupo de 4 moléculas de magnesio que se encuentra en el lado del lumen del PSII (letra B), a través de un residuo de tirosina Tyr_z (letra A). La Feofitina continúa el transporte de electrones vía la reducción de la quinona ($PQ_A > PQ_A^-$) (numero 2) que a su vez se reduce una plastoquinona ($PQ_B > PQ_B^-$) (numero 3), solo después de que este proceso ha tenido lugar el centro de reacción del PSII puede aceptar otro electrón. Con la repetición de este proceso PQ_B^- acepta un electrón y elimina un protón de cada uno de las dos moléculas de agua del estroma (dejando dos iones hidroxilo) para convertirse en plastoquinol (PQH_2) y se libera en la PQ para convertirse en un lecho de plastoquinona (Pool PQ) (números 3 al 6) (Kolber y Falkowski, 1993). Tomado de Vitadello *et al.* (2010).

El proceso de captación de luz en el PSII, se ha descrito por un modelo par de excitación-radical (Trissl *et al.*, 1993), el cual se completa en un tiempo estimado de picosegundos. La eficiencia de conversión de energía fotoquímica depende de procesos como Kulandaivelu y Daniell (1980) y Greene *et al.* (1992):

- (i) La captación de luz.
- (ii) Captura y separación de la carga primaria.
- (iii) Estabilización de la separación de la carga en aceptores secundarios.
- (iv) La captura de energía del “complejo” de magnesio que conduce a la oxidación de las moléculas de agua.

Para información más detallada, se recomienda la consulta de trabajos como Critchley (1997); Bricker y Frankel (2002), y en específico se recomienda el libro de Suggett *et al.* (2011).

1.1.3. ¿Qué es el Phyto-PAM y cómo funciona?

El Phyto-PAM es un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada que emplea cuatro diferentes longitudes de onda para excitar la Chla contenida en fitoplancton vivo. Para que esto suceda el Phyto-PAM está equipado con la Unidad óptica ED101-US (Phyto-US), que cuenta con una cubeta de cuarzo estándar de 10x10 mm de 3 ml de volumen (Schreiber, 1998).

La medición de la fluorescencia se basa en cuatro pulsos de luz que son modulados a un intervalo de $\sim 10\mu\text{s}$ por cada longitud de onda (canal). Un fotomultiplicador, en combinación con un amplificador de impulsos integrado en el fluorímetro, detecta la fluorescencia cerca de $\sim 680\text{nm}$. Un microprocesador

controla la generación síncrona de los pulsos de corriente de los cuatro diferentes canales y la amplificación selectiva de cada pulso (Schreiber, 1998 y 2004).

La unidad Phtyto-US consiste en dos arreglos de diodos: el primero es un arreglo de una matriz de 25 LEDs, que emiten longitudes de onda de 470, 520, 645 y 665 nm, los cuales serían los canales de mediciones de dicho instrumento. El segundo arreglo consta de una matriz 12 LEDs de luz actínica, que emite ~655nm. La intensidad de la luz máxima medida con este arreglo es de $\sim 550 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pero puede llegar a incrementarse a hasta $\sim 1800 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ utilizando el recurso de “Pulso de Saturación” con los dos arreglos (los 37 LEDs) operando simultáneamente (Schreiber, *et al.*, 1995b; Lürling y Verschoor, 2002).

El fluorímetro es operado por el software PhytoWin versión 1.45, el cual recaba la información de fluorescencia y calcula los valores de los parámetros básicos de fluorescencia y los guarda automáticamente en formato .txt. La figura 3 ilustra la derivación cinética de cada parámetro calculado por el Phyto-PAM. La fluorescencia mínima (F_0) se puede definir como fluorescencia inducida por la iluminación inmediatamente después de una adaptación a oscuridad, la fluorescencia máxima (F_m) se define como la fluorescencia máxima alcanzada cuando una muestra es sometida a un pulso de luz de saturación, lo suficientemente alto para cerrar todos los CRIIs; de estos dos parámetros puede ser derivado un tercer parámetro conocido como fluorescencia variable (F_v), el cual se basa en la sustracción de la fluorescencia máxima menos la fluorescencia mínima (Ecu. 1):

$$F_v = (F_m - F_0) \quad (1)$$

El parámetro de rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) es un proceso de eficiencia dependiente de la luz y se deriva de la relación de los tres parámetros anteriores (Ecu. 2):

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (2)$$

Para que el Phyto-PAM opere adecuadamente se deben seleccionar los espectros de referencia adecuados para cada canal. Un espectro de referencia es definido como la señal de fluorescencia normalizada en los cuatro canales de una muestra particular medida con un instrumento determinado; se caracteriza por ser un conjunto de valores de fluorescencia estandarizados para cada canal, lo suficientemente separados para que la señal no se traslape. El Phyto-PAM cuenta con espectros de referencia estándares (originales) para los 4 canales, los cuales fueron realizados por el fabricante con base en cultivos puros de fitoplancton de *Synechocystis spp.* para el canal de 470nm, *Chlorella vulgaris* para el canal de 520nm y *Phaeodactylum tricornutum* para los canales 645 y 665nm.

El Phyto-PAM posee la particularidad de activar o desactivar cada canal dependiendo de los objetivos de la investigación, además el fluorímetro tiene la capacidad de crear nuevos espectros de referencia para cada nueva muestra, si así se desea, estos nuevos espectros se almacenan en formato .txt y pueden ser usados en futuras investigaciones.

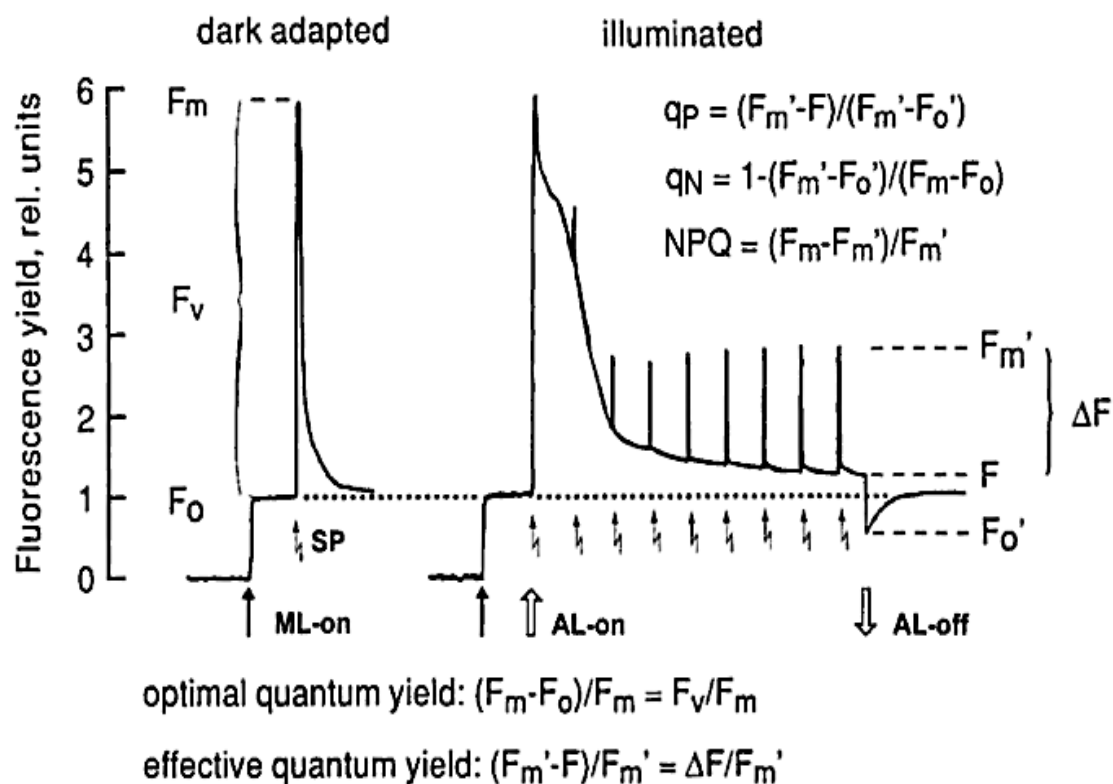


Figura 3.- Cinética de inducción de fluorescencia, el primer grafico (lado izquierdo) ilustra la respuesta de fluorescencia de una muestra adaptada a oscuridad cuando es sometida a un pulso de luz saturación de tiempo corto ($\sim 10\mu S$), y se define la nomenclatura básica asociada a esta medición (referencias en el texto). Las flechas oscuras hacia arriba indican inducción por pulso de luz, se ilustran los parámetro de fluorescencia mínima (F_0), fluorescencia máxima (F_m), el parámetro derivado de estas dos, la fluorescencia variable (F_v). La figura de lado derecho, ilustra la respuesta de fluorescencia cuando una muestra es sometida a pulsos de luz cortos con diferencia de intensidades con intervalos de 1 minuto cada uno (también conocida como curva rápida de luz), las flechas blancas indican activación (arriba) y desactivación (abajo) de la luz actínica (luz de medición), de estas mediciones se derivan parámetros secundarios de fluorescencia de importancia en el estudio de la fotosíntesis, los cuales se definen la tabla I. Tomado de Schriber, (2004).

En el presente estudio se utilizaron los espectros de referencia estándares predeterminados por el fabricante (uno por cada canal), para realizar las lecturas de sinolos parámetros de fluorescencia y la ChlaT.

Es importante mencionar que existe un interés amplio por la comunidad científica que estudia los ecosistemas acuáticos de tener metodologías versátiles, sensibles y fáciles de operar para obtener concentraciones de ChlaT de manera rápida, dado que los organismo que contienen ChlaT son los primeros eslabones en las redes tróficas, la salud y / o las abundancias de estos productores primarios tendrán efectos en cascada en todos los organismos superiores. Por lo tanto, la determinación de la concentración de la ChlaT es uno de los índices clave en la salud de los ecosistemas. De aquí, que el presente estudio posea relevancia, por proponer una metodología sin necesidad de metodologías de extracción y su relativa rapidez al proporcionar resultados.

2. HIPÓTESIS

Los parámetros de fluorescencia como F_0 , F_m , F_v , y Φ_{PSII} estimados con la aproximación de fluorescencia multiespectral (con cuatro diferentes longitudes de onda 470, 520, 645, 665nm) del Phyto-PAM, pueden usarse como estimadores de la concentración de ChlaT en el fitoplancton marino bajo diferentes escenarios de concentración de ChlaT.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Estimar la concentración de clorofila a total (ChlaT) del fitoplancton marino con base en el o los parámetros fluorescencia que mejor se asocien a la ChlaT derivado del método de fluorescencia multiespectral del Phyto-PAM bajo diferentes escenarios de concentración de ChlaT.

3.2. PARTICULARES

A. Evaluar y describir comparativamente la relación entre cada uno de los parámetros de fluorescencia (F_0 , F_m , F_v , Φ_{PSII}) y la ChlaT.

B. Determinar el o los parámetros de fluorescencia que mejor se asocien a la ChlaT.

C. Modelar la concentración de ChlaT como función del o los parámetros de fluorescencia que mejor se asociaron a la ChlaT, utilizando diferentes escenarios de respuesta de fluorescencia y concentración de ChlaT.

D. Corroborar los diferentes modelos obtenidos usando datos derivados de campo con diferentes escenarios de concentración ChlaT.

E. Determinar el mejor modelo que estime la ChlaT bajo los diferentes escenarios propuestos de concentración de ChlaT.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de Cultivos de fitoplancton

Todos los cultivos utilizados en este trabajo se obtuvieron del cepario del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California (IIO-UABC). Las especies utilizadas fueron:

1. **Bacilariofitas:** *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans.*, *Skeletonema costatum*.

2. **Clorofitas:** *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis gracilis*.

3. **Dinofitas:** *Amphidinium spp.*, *Lingulodinium spp.*

4. **Cryptofitas:** *Rhodomonas spp.*

5. **Crisofitas:** *Monochrysis lutheri*.

6. **Prymnesiofitas:** *Isochrysis galbana* (Clone T-Iso).

Las microalgas derivaron de cultivos en matraces de 250 ml bajo el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975). Preparado con agua de mar natural estéril con una salinidad de 33 ± 1 y adicionado con nutrientes. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 19 ± 1 °C y un pH inicial 7.5, luz fría continúa a $\sim 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodos de luz de 24 hrs. con agitación manual una vez al día. Todos los cultivos se iniciaron con un inóculo de un historial de flujo fotónico proveniente de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2007). Cada muestra de cultivo se obtuvo al séptimo día de crecimiento en el estado estacionario de acuerdo a una curva de crecimiento en un cultivo cerrado.

4.2. Mediciones de ChlaT y parámetros de fluorescencia

Con el objetivo de evaluar de manera practica la concentración de Chla de cada cultivo, se contó el número de células presentes en un mililitro de muestra madre con ayuda de una cámara de Neubauer (Hematocitometro), y al mismo tiempo se procedió a leer la Chla de 0.5, 1, 2, 5 y 10ml de muestra por medio de espectrofotometría usando las aproximaciones y consideraciones de Lorenzen (1967) (Fig. 4). El procedimiento anterior facilito el cálculo las diluciones previas necesarias para cada cultivo y así poder tener escenarios de concentraciones de Chla bajos (menores a 0.50 $\mu\text{g/L}$), medios (0.51 a 3 $\mu\text{g/L}$) y altos (mayores a 3 $\mu\text{g/L}$).

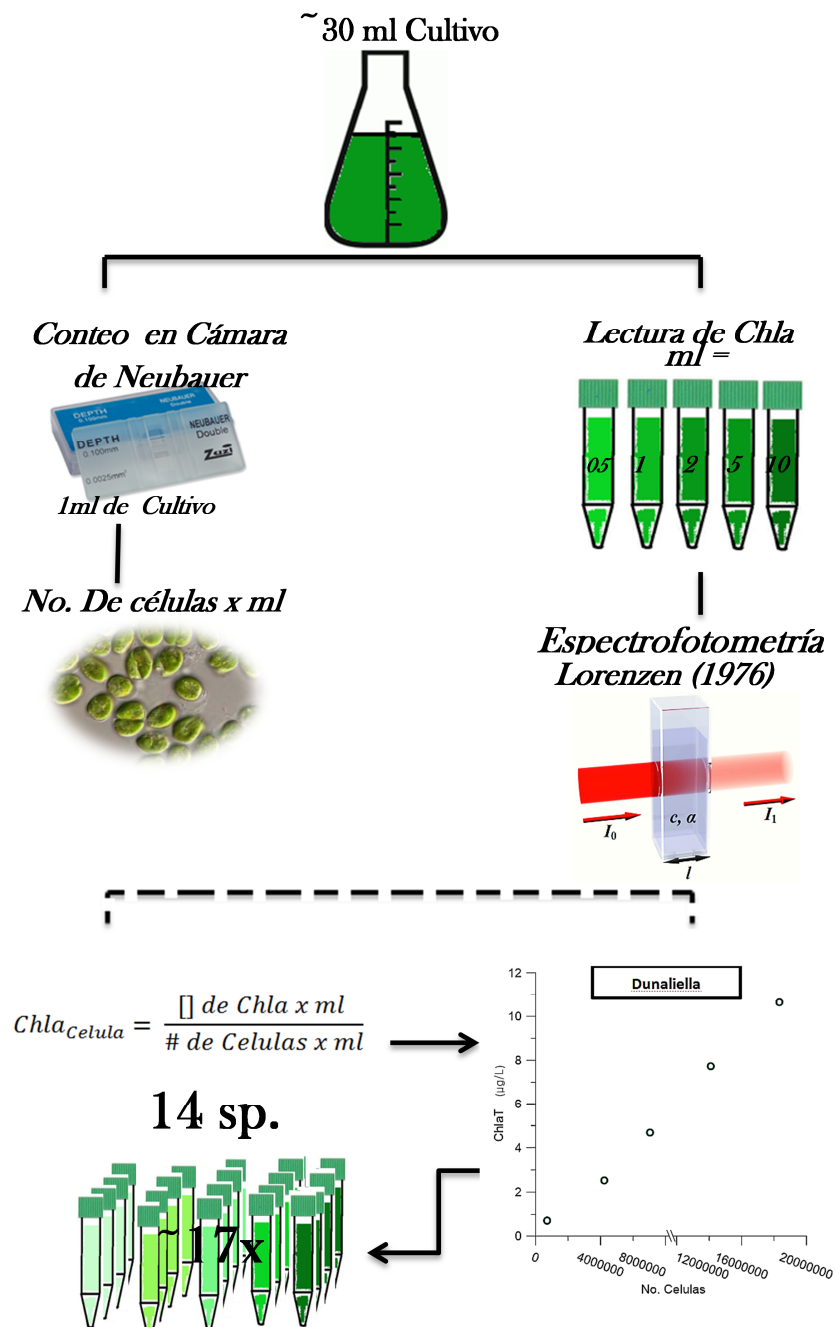


Figura 4.-Representación Esquemática del experimento de conteo de células y concentración de Chla, que facilito la determinación del número de diluciones necesarias por especie de fitoplancton.

Con los resultados anteriores y con una nueva alícuota de cultivo madre se realizaron las diluciones adecuadas para tener los escenarios anteriormente mencionados. De estas nuevas alícuotas madres (una de cada especie), se analizó simultáneamente los parámetros de fluorescencia con ayuda del Phyto-PAM y la concentración de ChlaT correspondiente a cada escenario (Fig. 5). Es importante mencionar que todas las diluciones se basaron en un litro agua tanto para los cálculos de ChlaT como para las lecturas con Phyto-PAM.

Los análisis de concentración de ChlaT se realizaron con base en el método propuesto por Lorenzen (1967), dejando que los pigmentos se extrajeran durante 24 hrs a -4 °C en 10 ml de acetona 100%. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Perking Elmer Lambda. Para la determinación de la concentración de ChlaT se utilizó la ecuación 3, y para los Feopigmentos la ecuación 4:

$$Chla = \frac{[26.7(E_{664}-E_{665})*V_{ext}]}{(V_{fil}*L_{celda})} \quad (3)$$

$$Feopigmentos = \frac{[26.7(1.7(E_{664}-E_{665}))*V_{ext}]}{(V_{fil}*L_{celda})} \quad (4)$$

Dónde:

E_{664} : Es la absorbancia a los 664 nm.

E_{665} : Es la absorbancia a los 665nm.

V_{ext} : Es el volumen del solvente utilizado (acetona al 100%)

V_{fil} : Es el volumen total filtrado de la muestra, en este estudio, los cálculos se realizaron con base en un litro, para homogenizar los resultados con Phyto-PAM.

L_{celda} : Es el volumen de la celda utilizada en el espectrofotómetro expresado en litros.

La medición con Phyto-PAM, consistió en: cada dilución se aforó a un litro de agua de mar filtrada con 0.2 μ m de poro, y se homogenizó durante 15 minutos (min) con ayuda de un agitador magnético a la menor revolución posible y en completa oscuridad. Una vez transcurridos estos 15 minutos, se tomaron 3 ml y se filtraron con un filtro membrana de 0.2 μ m de poro, con la finalidad de eliminar todo material particulado (Fig. 5). El volumen filtrado se leyó con la función Zero-off (*Zoff*), con el objetivo de suprimir las señales de fluorescencia de las sustancias disueltas en la muestra (ácidos húmicos, materia orgánica disuelta coloreada o CDOM, por sus siglas en inglés e incluso la señal de la propia agua). Las cuatro lecturas normalizadas con el *Zoff* se almacenaron en el programa y se actualizan automáticamente con cada nueva determinación de *Zoff*. Esta normalización con *Zoff* se le realizó previa a cada nueva lectura de fluorescencia.

Una vez suprimidas las señales que podrían introducir ruido en las lecturas, se procedió a realizar tres lecturas de fluorescencia con remplazo de la muestra a intensidad de $\sim 21 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con base en la intensidad de MF32 (frecuencia de medición recomendada por el Phyto-PAM), siguiendo los criterios expuestos por Schreiber (2004). Todo lo anterior fue realizado en oscuridad, para procurar que la mayoría de los CRIIs se encontraran abiertos (Fig. 5).

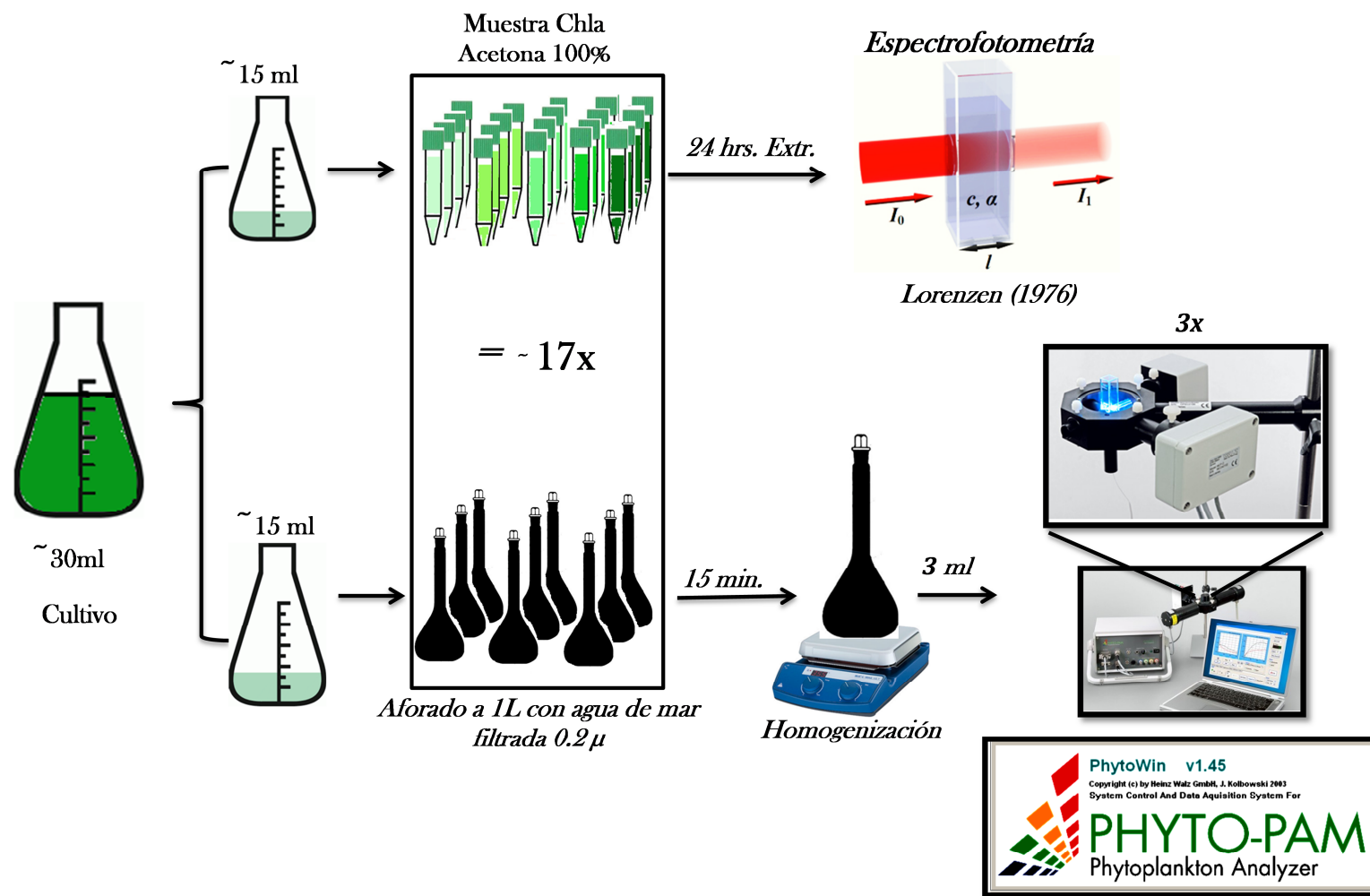


Figura. 5.- Diagrama esquemático del análisis de las diluciones por especies de fitoplancton con Phyto-PAM y su respectivo valor de concentración de Chl a

Los productos finales de cada lectura con Phyto-PAM consistieron en cuatro señales independientes (una por cada canal) de los parámetros de fluorescencia mínima (F_0), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable (F_v) y rendimiento cuántico óptimo de la fluorescencia (Φ_{PSII}) (Tabla 1), que son desplegados por la interface programática PhytoWin versión 1.45. Es importante hacer notar que debido al gran número de términos utilizados para nombrar los parámetros de la fluorescencia y que muchos de los cuales son sinonimias, este trabajo se basó en la nomenclatura propuesta en Papageorgiou y Govindjee (2004) que se basa en Kooten y Snel (1990), Kromkamp y Forster (2003).

Tabla 1. - Definición de los parámetros de fluorescencia derivados del Phyto-PAM, las celdas en color verde corresponden a los parámetros obtenidos en base a el primer pulso (MF32) y las celdas blancas corresponden a parámetros que se derivan de una curva luz (Fig. 3) (modificado de Cosgrove, 2007).

*Nota: todos los parámetros son adimensionales.

<i>Parámetro</i>	<i>Sinonimia</i>	<i>Definición</i>	<i>Derivación</i>
F_0	0	Fluorescencia mínima o base (aclimatado a oscuridad, todos los RCIIIs abiertos)	
F_m	P, F_{max}	Fluorescencia máxima (aclimatado a oscuridad, todos los CRIIs cerrados pero sin NPQ)	
F_v		Fluorescencia variable	$F_m - F_0$
Φ_{PSII}	F_v/F_m	Rendimiento cuántico óptimo o eficiencia fotoquímica (CRIIs abiertos)	F_v/F_m
F'_m		Fluorescencia máxima en luz actínica	
F'	F, F_s o F_t	Fluorescencia en luz actínica (F_s o F_t usados en estado estacionario)	
F'_0		Fluorescencia mínima en luz actínica	
F'_v		Fluorescencia variable en luz actínica	$F'_m - F'_0$
F'_q	ΔF	Diferencia entre el rendimiento de la fluorescencia de $F'_m - F'$	$F'_m - F'$
F'_q/F'_m	$\Delta F/F'_m$	Eficiencia fotoquímica en luz actínica o eficiencia de los CRIIs	$(F'_m - F') / F'_m$
F'_v/F'_m		Cosecha no fotoquímica	F'_v/F'_m
q_p	F'_q/F'_v	Cosecha fotoquímica	$(F'_m - F') / (F'_m - F'_0)$
NPQ		Cosecha cuántica no proveniente de la fotoquímica	$(F_m - F'_m) / F'_m$

4.3. Asociación entre la Concentración ChlaT y los parámetros de fluorescencia

Con el objetivo de determinar la posible modelación de la concentración de ChlaT (como variable dependiente) con base a las respuestas en cada canal (470, 520, 645 y 665 nm) de los parámetros de fluorescencia (como variables independientes) se aplicó una serie de análisis de regresión lineal múltiple basadas en polinomios de Taylor de primer grado cuarto orden. El análisis de regresión lineal múltiple está basado en el ajuste de una ecuación a un conjunto de datos mediante mínimos cuadrados y es uno de los más empleados en todas las ciencias (Draper y Smith, 1981), la ecuación general se presenta a continuación:

$$ChlaT = b_0 + b_1P_{470} + b_2P_{520} + b_3P_{645} + b_4P_{665} \quad (5)$$

Donde, ChlaT es la variable dependiente y las P representan los parámetros de fluorescencia utilizados como variables independientes y los subíndices corresponden a las longitudes de onda de medición. Las b son los coeficientes de regresión de cada variable explicativa. Los signos de los parámetros $b_1 b_2 \dots b_n$ miden el sentido de la relación entre cada una de las variables explicativas y la variable dependiente asumiendo como constante la influencia de las restantes variables explicativas.

Se utilizó el método de regresión por pasos con la técnica de eliminación hacia atrás (*Stepwise regression with backward elimination*) para descartar las variables independientes que no se asocian con la dependiente (Significancia de los coeficientes ligados a cada variable independiente), obtener la significancia

global del modelo (mediante un ANOVA de 1 vía con base a las variabilidad de los datos observados y modelados), y encontrar los valores de alto ruido, (por medio de un análisis residual de la regresión). Este método prueba y determina las mejores regresiones contenidas en un cierto número de variables (Draper y Smith, 1981).

4.3.1. Determinación del mejor(es) parámetro(s) asociado a la ChlaT

Una vez realizado el análisis de regresión múltiple, se procedió a determinar el mejor parámetro que se asocie a la ChlaT, con base en las significancias estadísticas de los valores obtenidos en el análisis de regresión. Para cada modelo se probó significancia estadística de cada uno de los canales y del intercepto (constante) de la ecuación, con base en una prueba “t” de student, que permite contrastar la hipótesis nula que asume que el coeficiente asociado a las variables independientes (parámetro-canal) es igual a cero ($H_0: \beta = 0$) lo que implicaría que la tasa de cambio de la variable dependiente no es significativa al cambio de esa variable independiente. En contraste si este coeficiente fuera diferente de cero ($H_a: \beta \neq 0$) implicaría que la tasa de cambio de la variable dependiente si es estadísticamente significativa con el cambio de esa variable independiente.

De igual manera, se probó la significancia global del modelo con ANOVA de Regresión basado en una prueba “F” de Fisher. En ambos casos se probaron las significancias con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

Finalmente, se seleccionó aquellos modelos que explicaran la mayor parte de la variabilidad de la variable dependiente, con base en el coeficiente de

determinación (R^2) (Ecu. 6). Dicho coeficiente es la razón de variabilidad explicada por el modelo (SCR) (Ecu. 7) con respecto a la variabilidad de la variable dependiente (SCT) (Ecu. 8).

$$R^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{\sum(\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum(y - \bar{y})^2} \quad (6)$$

$$SCR = \sum(\hat{y} - \bar{y})^2 \quad (7)$$

$$SCT = \sum(y - \bar{y})^2 \quad (8)$$

Dónde:

SCR: es la suma de cuadrados debida a la regresión o explicada por la regresión y representa la variación de los valores estimados de Y alrededor de su media.

SCT: es la suma de cuadrados total y representa la variación total de los valores reales de Y respecto de su media muestral.

Es de importancia resaltar que este análisis se realizó en una primera aproximación de los resultados de respuesta de fluorescencia grupo por grupo (seis grupos) y un segundo análisis de una matriz que concentraron los seis grupos fitoplanctónicos con sus respectivos valores de ChlaT.

4.4. Modelación de la ChlaT con el mejor parámetro de Fluorescencia

Con la finalidad de encontrar la mejor modelación de la ChlaT utilizando el mejor(es) parámetro(s), se realizaron aproximaciones de regresión lineal múltiple con la técnica de eliminación hacia atrás, donde se tomó como variable dependiente la concentración de ChlaT y como variables independientes los cuatro canales del parámetro con la mejor asociación. Se realizaron cuatro modelaciones, las cuales consistieron en dos tipos:

El primer tipo representa una aproximación donde no se realizó ninguna separación a los datos, a la cual se le denominó **modelación 1**: se deriva de una ecuación que se compone del mejor(es) parámetro(s) con respuesta multiespectral como predictor de la concentración de ChlaT en las tres condiciones de ChlaT probadas.

El segundo tipo consistió en tres modelaciones por escenarios de concentración de ChlaT utilizando el mejor(es) parámetro(s), según los criterios y las aproximaciones. Estas consideraciones derivaron 3 juegos de modelaciones:

La Modelación 2: consta de 2 ecuaciones una para condiciones de alta concentración de ChlaT, la otra para condiciones no altas de ChlaT. Los criterios para la aplicación de las ecuaciones son debidamente explicados en la sección de resultados.

La Modelación 3: consta de 3 ecuaciones para condiciones de clorofila alta, media y baja.

Modelación 4: también se compone de 3 ecuaciones para condiciones de clorofila alta, media y baja. La diferencia entre la Modelación 3 y la Modelación 4, se basa en los criterios de acotamiento para cada una de las condiciones antes mencionadas. Los criterios de selección dentro de cada modelación están debidamente explicados en la sección de resultados.

Para definir las condiciones de modelación por escenarios en las Modelaciones 2, 3 y 4, fue necesario la obtención de un índice que pudiera ser utilizado para acotar las condiciones en las cuales se aplica cada ecuación dentro de cada Modelación. Debido a esto, y considerando que la respuesta de fluorescencia obtenida del Phyto-PAM es en cuatro canales, se propuso el valor medio de la respuesta de los canales para el parámetro de fluorescencia y se denominó “Respuesta Media de la Fluorescencia Multiespectral” (RM_{FM}) (Ecu. 9):

$$RM_{FM} = \frac{(V_{maximo} + V_{minimo})}{2} \quad (9)$$

Dónde:

V_{maximo} : Es el valor máximo de la detección del parámetro de fluorescencia en los canales con respuesta.

V_{minimo} : Es el valor mínimo de la detección del parámetro de fluorescencia en los canales con respuesta.

4.5. Significancia estadística de las modelaciones

Este subcapítulo se basa en los conceptos ya expuestos anteriormente en la sección 3.3, utilizando los análisis de significancia de los coeficientes por medio de una prueba “t”, así como, la significancia del modelo global con una ANOVA de Regresión basado en una prueba “F”. En ambos análisis se evaluaron las significancias con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$).

Así mismo se calculó el coeficiente de determinación R^2 (Ecu.9) para determinar la proporción de variación total, explicada por la variabilidad de cada ecuación.

4.5.1. Validación de las modelaciones obtenidas

Con la finalidad de corroborar las modelaciones obtenidas, se obtuvieron 232 pares de experimentos donde se tenían mediciones de Phyto-PAM (primera lectura con MF32) y HPLC (ChlaT); 198 corresponden a 3 cruceros oceanográficos realizados en la Corriente de California frente a las costas de Baja California (Barocio-León, 2006) (Fig. 4a) y los restantes 34 proviene de un muestreo realizado en una estación fija dentro de la laguna de Bahía San Quintín, B.C. (BSQ) (Segura-Soto, 2013) (Fig. 4b). Esta base de datos pertenece al Cuerpo Académico de Ecología del Fitoplancton de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC (CA-158) (Tabla II).

Tabla II. Síntesis de los datos usados para la validación de las modelaciones obtenidas.

Campañas en Campo	Numero pares de datos (Phyto-PAM y HPLC)	Condiciones de ChlaT (µg/L)
Crucero Noviembre de 2002	70	Bajas y Medias (0.2 a 1)
Crucero junio de 2003*	65	Bajas, Medias y Altas (0.2 a 1 y evento de marea roja)
Crucero noviembre de 2003	63	Bajas (0.2 a 0.5)
Estación BSQ	34	Medias (1.5 a 3.5)

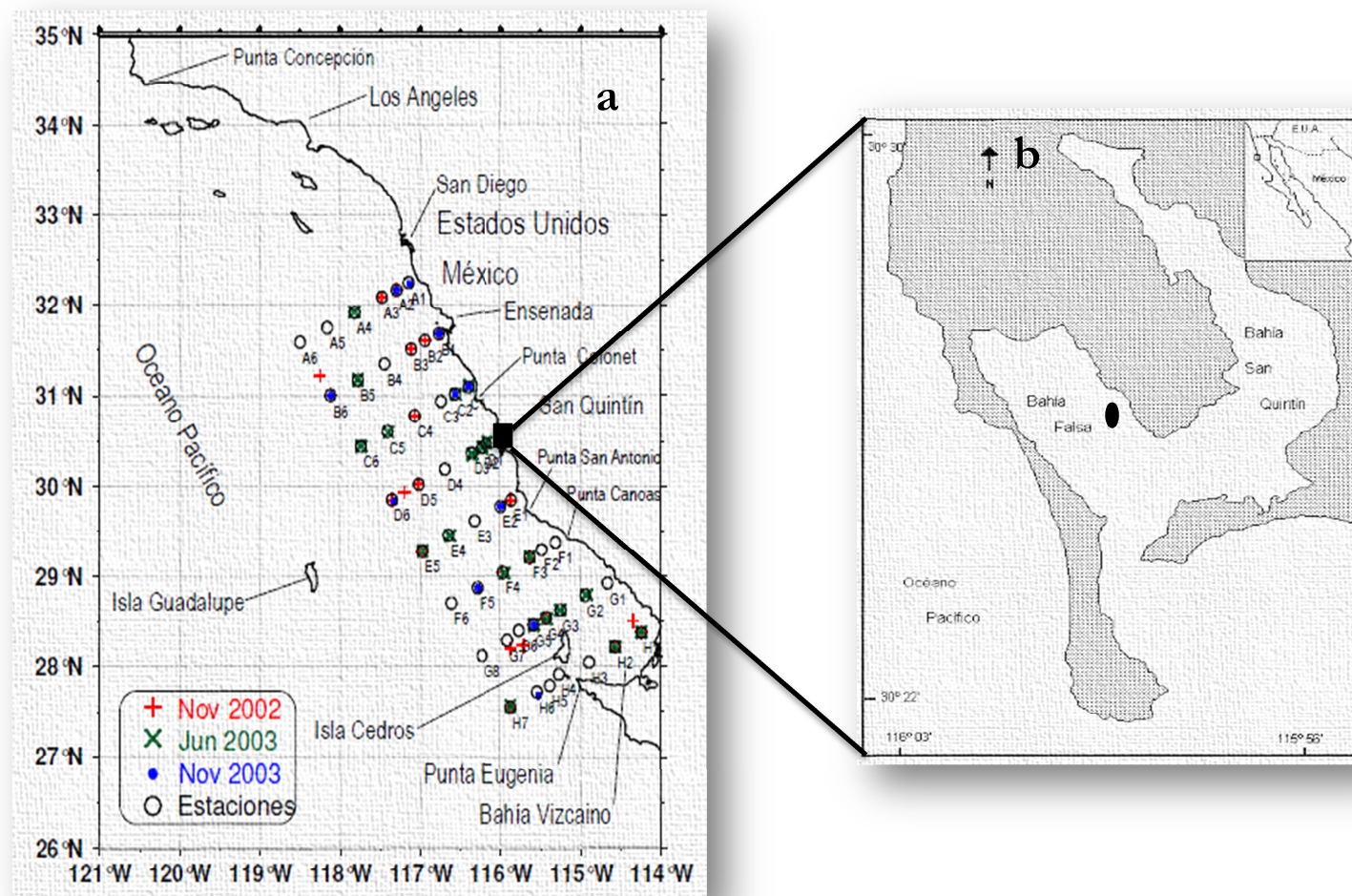


Figura. 6.- Área de estudio correspondiente a las campañas donde se obtuvieron datos de campo. Figura 3a representa los cruceros oceanográficos reportados por (Barocio-León, 2006), donde se aprecia la red de estaciones muestreadas (círculos vacíos). Las cruces rojas indican las estaciones muestreadas en Noviembre 2002; las equis verdes indican estaciones muestreadas durante Junio de 2003; los puntos azules indican estaciones muestreadas durante Noviembre de 2003. Figura 3b, señala la ubicación de la estación de muestreo dentro de la laguna Bahía San Quintín (BSQ) (círculo oscuro) reportada por Segura-Soto (2013).

Utilizando las cuatro modelaciones mencionadas en el subcapítulo anterior, se estimó la ChlaT ($ChlaT_{calculada}$) mediante datos del Phyto-PAM.

A fin de determinar el grado de correspondencia entre la $ChlaT_{calculada}$ y $ChlaT$ observada en el campo ($ChlaT_{observada}$), se utilizó un análisis *Match-up* (Santamaría-del-Ángel *et al.*, 2011).

El análisis de *Match-up* es una técnica grafica basada en la teoría de correspondencia perfecta entre dos juegos de datos, si estos tienen patrones de distribución idénticos, la dispersión de los datos resultara en una línea recta perfecta a 45 grados.

Generalmente este tipo de análisis grafico se complementa con parámetros estadísticos como el coeficiente de correlación de Pearson ($r_{pearson}$ Ecu. 10), que determina el grado de asociación línea entre dos variables y se valida realizando una prueba de significancia de dicho coeficiente (Santamaría-del-Ángel *et al.*, 2011).

$$r_{pearson} = \frac{Cov_{OC}}{SD_C SD_O} \quad (10)$$

Dónde:

Cov_{OC} : es la covarianza entre los datos observados y calculados

SD : las desviaciones estándar de cada uno

Además del análisis *Match-up*, se calcularon dos parámetros estadísticos más, el error cuadrático medio RMSE (Ecu. 11) y el sesgo BIAS (Ecu. 12).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (O_i - C_i)^2} \quad (11)$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{O_i - C_i}{C_i} \right) \quad (12)$$

Dónde:

O_i sea el i-esimo dato observado

C_i el i-esimo dato calculado por el modelo.

El RMSE es uno de los estadísticos más usados cuando se desea evaluar la capacidad de predicción de un modelo (datos calculados) cuando son comparados con datos observados en campo. Es definido como la raíz cuadrada del error cuadrático medio y si el RMSE es cercano a cero, el error cuadrático medio es bajo, mientras más se aleja del cero error cuadrático medio será mayor. El sesgo BIAS proporciona información sobre la tendencia de sobreestimar o subestimar una variable, se utiliza para cuantifica el error sistemático del modelo. Los rangos de valor van de +1 a -1, lo que indica una sobreestimación con valores cercanos a 1 y subestimación cercanos a -1, valores cercanos a cero compensan las sobreestimaciones y las subestimaciones (Pielke, 2002).

5. RESULTADOS

Los resultados se presentaran de la siguiente manera: primeramente se expondrá la asociación de la concentración de la ChlaT con la respuesta de fluorescencia de los 4 parámetros por grupos (sección 5.1). Posteriormente, se presentará la asociación entre la concentración de ChlaT con la respuesta de fluorescencia de los 4 parámetros englobando todos los grupos (sección 5.2). Seguidamente, se presentará la aproximación del mejor parámetro obtenido y los criterios propuestos para la modelación de predicción de la ChlaT (sección 5.3). Finalmente, se presentará la validación de las modelaciones obtenidas usando datos provenientes de campo (sección 5.4).

5.3. Asociación de los parámetros de fluorescencia y la ChlaT por grupos fitoplanctónicos

En total se analizaron 6 grupos fitoplanctónicos. La tabla III resume los resultados del parámetro que obtuvo la mejor asociación en cada grupo de fitoplancton y los valores de los estadísticos probados. Los resultados mostraron que en cuatro de los seis grupos, el mejor parámetro asociado a la ChlaT fue el Φ_{PSII} (Tabla III). Estos grupos que se asociaron con el parámetro de Φ_{PSII} fueron las Dinofitas, Crisofitas, Criptofitas y las Prymnesiofitas (Fig. 7). Así mismo, el valor porcentual de R^2 en estos grupos fue mayor a 70%, siendo las Prymnesiofitas y Criptofitas superior a 90% (Tabla III). El análisis de los modelos generales mostro que en los cuatro grupos los modelos fueron significativos. Es de hacer notar que en estos cuatro modelos el canal $\Phi_{PSII-520}$ no fue significativo estadísticamente.

Las Bacilariofitas presentaron asociación de la ChlaT en el parámetro de F_m (Fig. 7), con una R^2 porcentual de 49.8 (Tabla III). De acuerdo al análisis del modelo general este si fue significativo.

Por su parte, las Clorofitas presentaron una mejor asociación con el parámetro F_0 (Fig. 7), con una R^2 porcentual de 72.7, y los 4 canales y la constante fueron significativos (Tabla III). El análisis del modelo general también fue significativo, presentando una $F_{calculada}$ de 66.59 (Tabla III).

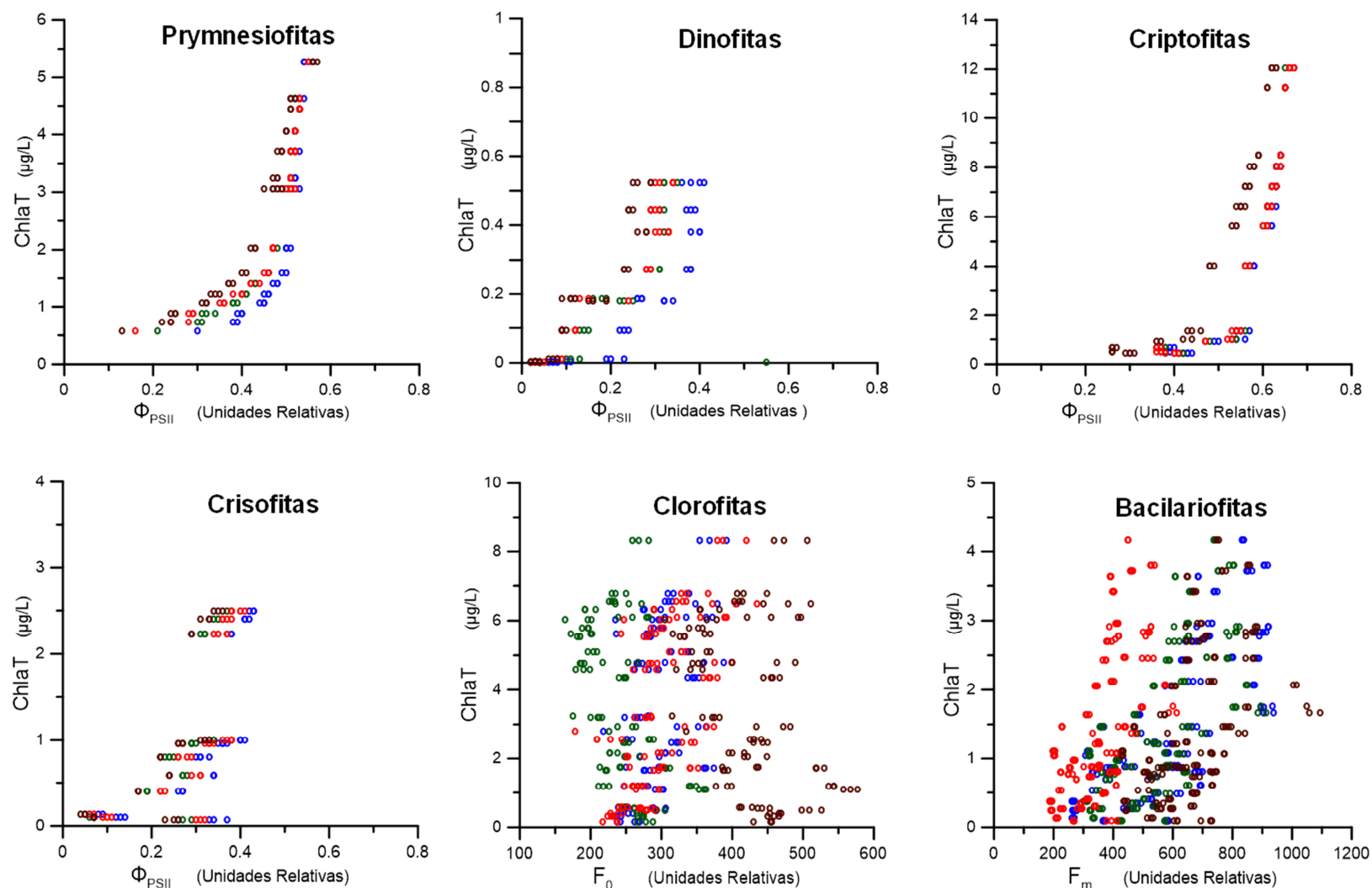


Figura 7.- Diagrama de dispersión de los parámetros de fluorescencia que resultaron significativos (eje de abscisas) con respecto a la concentración de ChlaT (eje de ordenadas) para los seis grupos analizados. Canal-470nm (Círculos azules), Canal-520 (Círculos verdes), Canal-645 (Círculos rojos) y Canal-665 (Círculos cafés).

Tabla III.- Resumen del análisis para determinar el parámetro con la mejor asociación con la ChlaT por cada grupo fitoplanctónico. La primera columna corresponde al parámetro que resultó con la mejor asociación con la ChlaT, la columna 2 (Constante) corresponde a la prueba de significancia del punto de intersección o constante; la columna 3 (Variables) corresponde a los valores obtenidos de los coeficientes ligados a cada canal; la columna 4 (Estadísticos) corresponden a los valores de $t_{crítica}$; la columna 5 (CD) corresponde a los valores del coeficiente de determinación; y las columnas 6 (Modelo) y 7 (Estadístico) corresponden a los valores obtenidos en el análisis del modelo global y la última columna corresponde al número de datos. Los valores en rojo hacen referencia a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis estadísticos.

		Constante "b0"	Variables	Estadístico	CD	Modelo	Estadístico	No. datos
	Parámetros	t_{cal}	t_{cal}	$t_{crítica}$	$R^2 \%$	$F_{calculada}$	$F_{crítica}$	n
Bacilariófitas	F_m	-0.48		1.97	49.8	45.58	2.42	188
	F_{m-470}		5.92					
	F_{m-520}		-1.57					
	F_{m-645}		-0.32					
	F_{m-665}		-0.39					
Clorófitas	F_0	3.39		1.97	72.7	66.59	2.44	126
	F_{0-470}		-3.01					
	F_{0-520}		4.83					
	F_{0-645}		6.97					
	F_{0-665}		-6.45					
Crisófitas	Φ_{PSII}	1.19		2.02	65.1	17.7	2.59	42
	$\Phi_{PSII-470}$		-1.42					
	$\Phi_{PSII-520}$		2.05					
	$\Phi_{PSII-645}$		-1.05					
	$\Phi_{PSII-665}$		1.4					
Cryptófitas	Φ_{PSII}	7.51		2.01	95.2	223.65	2.56	49
	$\Phi_{PSII-470}$		-2.39					
	$\Phi_{PSII-520}$		-1.97					
	$\Phi_{PSII-645}$		-3.51					
	$\Phi_{PSII-665}$		12.8					
Dinófitas	Φ_{PSII}	9.1		1.99	89.2	55.53	2.51	66
	$\Phi_{PSII-470}$		-5.2					
	$\Phi_{PSII-520}$		-1.99					
	$\Phi_{PSII-645}$		5.25					
	$\Phi_{PSII-665}$		-9.95					
Prymnesiófitas	Φ_{PSII}	3.13		2.01	95.5	229.53	2.57	47
	$\Phi_{PSII-470}$		-2.46					
	$\Phi_{PSII-520}$		-0.56					
	$\Phi_{PSII-645}$		-4.23					
	$\Phi_{PSII-665}$		9.62					

5.4. Asociación de los parámetros de fluorescencia con la ChlaT englobando todos los grupos fitoplanctónicos.

Este análisis fue similar a la sección anterior con la diferencia que en esta sección se consideró las respuestas de los parámetros para los cuatro canales englobando todos los grupos fitoplanctónicos (Tabla IV).

De manera general, los resultados mostraron que solamente el análisis basado en Φ_{PSII} vs ChlaT, obtuvo una significancia en todos los canales, siendo $\Phi_{PSII-470}$ y $\Phi_{PSII-645}$ los que presentaron una asociación inversa con la ChlaT (con coeficientes negativos del modelo) (Tabla IV). Los canales restantes ($\Phi_{PSII-520}$ y $\Phi_{PSII-665}$) se asociaron positivamente con la ChlaT. Además, este análisis fue el de mayor R^2 porcentual (80.5) y fue el que obtuvo una razón $F_{calculada}$ mayor (437.42). Los resultados anteriores determinaron que el parámetro de rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) fue el mejor asociado a la ChlaT.

El resto de los parámetros presento R^2 más bajas (<70%), siendo la F_0 el valor de R^2 menor (54.3%) (Tabla IV).

De manera similar, F_0 y F_m presentaron significancia en tres canales a excepción del canal a 470 nm. El parámetro F_v solo presento al canal 645 mientras que F_v solo fue significativa en F_{v-645} (Tabla IV).

Es importante destacar que las comparaciones de los cuatro parámetro vs ChlaT se basaron en el mismo número de datos (n=595).

Con base en los resultados anteriores se realizó un análisis grafico basados en diagramas de dispersión de cada parámetro (x) vs ChlaT (y) (Fig. 8). Los

resultados de dicho análisis muestran que solamente el diagrama de Φ_{PSII} vs ChlaT (Fig. 8d) presentó un patrón de dispersión definido con forma general de hipérbola inversa en los cuatro canales. El resto de los diagramas mostro una dispersión sin patrones aparentes (Fig. 8a, 8b y 8c).

Tabla. IV.- Asociación de los parámetros de fluorescencia con su valor correspondiente de ChlaT. Por un análisis de regresión múltiple su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de los parámetros del modelo probada con $t_{0.05; 591 \text{ crítica}} = 1.96$, significancia global del modelo probada con $F_{0.05; 4, 595 \text{ crítica}} = 2.38$. $n=595$. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.

			Constante	Variables	CD	Modelo
	Parámetros	Modelo Regresión	t_{cal}	t_{cal}	R^2	F_{cal}
F_0		$ChlaT = 1.77 - 0.00299F_{0-470} + 0.0172F_{0-520} + 0.0326 F_{0-645} - 0.0274 F_{0-665}$	4.83		54.3	175.27
	F_{0-470}			-1.95		
	F_{0-520}			8.94		
	F_{0-645}			17.96		
	F_{0-665}			-17.5		
F_m		$ChlaT = 0.263 - 0.000345F_{m-470} + 0.00498F_{m-520} + 0.0158F_{m-645} - 0.0105F_{m-665}$	1.01		65.9	286.06
	F_{m-470}			-0.55		
	F_{m-520}			7.05		
	F_{m-645}			18.34		
	F_{m-665}			-10.95		
F_v		$ChlaT = -0.183 - 0.00173F_{v-470} + 0.00200F_{v-520} + 0.0139F_{v-645} - 0.00032F_{v-665}$	-1.9		67.9	312.76
	F_{v-470}			-1.28		
	F_{v-520}			1.89		
	F_{v-645}			8.91		
	F_{v-665}			-0.18		
Φ_{PSII}		$ChlaT = 0.768 - 7.96\Phi_{PSII-470} + 3.31\Phi_{PSII-520} - 15.6\Phi_{PSII-645} + 26.4\Phi_{PSII-665}$	8.83		80.5	437.42
	$\Phi_{PSII-470}$			-6.43		
	$\Phi_{PSII-520}$			2.09		
	$\Phi_{PSII-645}$			-10.31		
	$\Phi_{PSII-665}$			21.31		

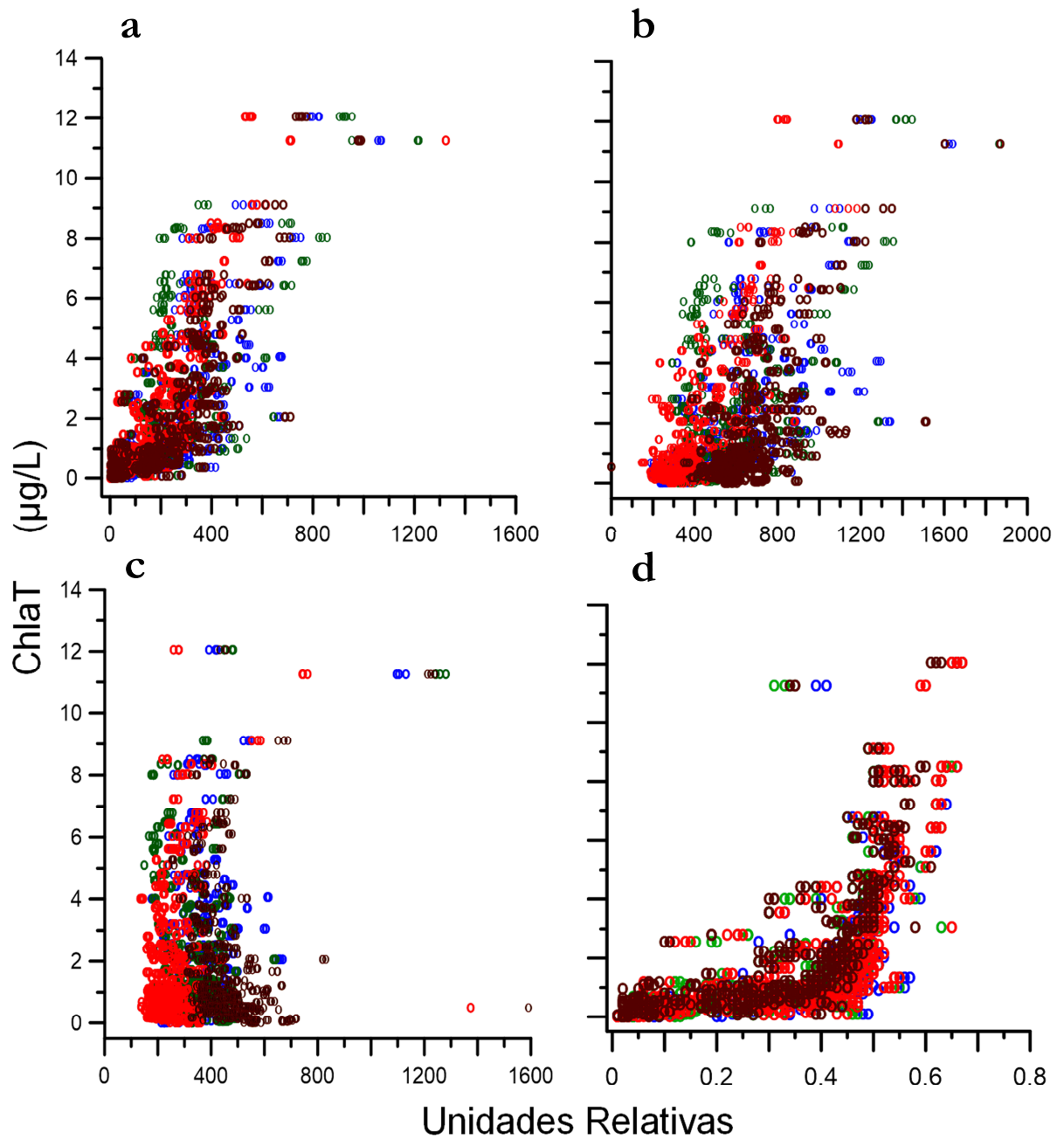


Figura 8.- Grafica de dispersión de los parámetros de fluorescencia con respecto a la concentración de ChlaT para los 4 canales. (a) Corresponde a la relación F_0 vs ChlaT; (b) corresponde a la relación F_m vs ChlaT; (c) corresponde a la relación F_v vs ChlaT y (d) corresponde a la relación Φ_{PSII} vs ChlaT. Canal 470 (círculos azules), canal 520 (círculos verdes), canal 645 (círculos Rojos), Canal 665 (círculos Cafe), n=593.

El patrón de hipérbola inversa mostrado en la relación Φ_{PSII} y ChlaT (Fig. 8d), se puede describir de una manera sencilla como el incremento exponencial del Φ_{PSII} conforme aumenta la ChlaT. Así mismo se observa una tendencia de mayor dispersión en valores de Φ_{PSII} mayores a 0.4 y una menor dispersión en valores de Φ_{PSII} menores a 0.4. Este patrón de menor dispersión es más estrecho en valores menores de 0.1 Φ_{PSII} .

5.5. Modelación de la ChlaT con base en el mejor parámetro de fluorescencia

En la sección anterior, se determinó que el rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) fue el que mejor se asoció con la ChlaT. Con la finalidad de encontrar la mejor modelación para estimar la concentración de ChlaT bajo diferentes escenarios, se utilizó la aproximación de regresión lineal múltiple con la técnica de eliminación hacia atrás, donde se tomó como variable dependiente la concentración de ChlaT y como variables independientes los 4 canales de Φ_{PSII} . Esta aproximación consideró cuatro modelaciones cuyos resultados se describen a continuación:

La Modelación 1 o “General” es el modelo de predicción de ChlaT, considerando la respuesta de Φ_{PSII} en todos los canales, para los seis grupos fitoplanctónicos en las condiciones de ChlaT probadas (Tabla IV). Esta Modelación consta de una sola ecuación para estimar la concentración de ChlaT, la cual obtuvo con una R^2 porcentual del 80.5 y que se describió en la sección anterior.

La Modelación 2, resulto con 2 ecuaciones complementarias (Tabla V), una para condiciones de alta concentración de ChlaT (mayor a $3\mu\text{g/L}$) y otra para condiciones de ChlaT medias-bajas. Los criterios para la aplicación de cada una de las ecuaciones se basaron en los patrones de dispersión que se observaron en la relación ChlaT vs Φ_{PSII} (Fig. 6d), en los cuales se denota que un valor de 0.4 de Φ_{PSII} es la frontera entre una región de mayor dispersión con concentraciones de ChlaT alta y una de menor dispersión con concentraciones de ChlaT medias-bajas. Estos patrones de dispersión determinaron en el análisis de los datos que resulto en la modelación 2.

Tabla V.- Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de la ChlaT, para la modelación 2. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de las variables del modelo probada con $t_{\text{crítica } 0.05; 191} = 1.97$ para el bloqueo > 0.4 y $t_{\text{crítica } 0.05; 312} = 1.96$ para bloqueo < 0.4 , significancia global del modelo probada con $F_{\text{Crítica } 0.05; 4, 194} = 2.47$ para el bloqueo < 0.4 y $F_{0.05; 4, 315 \text{ crítica}} = 2.40$ para bloqueo > 0.4 . Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.

		Modelación 2	Constante "bo"	Variables	CD	Modelo	No. Datos
	Parametro	Ecuaciones	t_{cal}	t_{cal}	$R^2 \%$	F_{cal}	n
RM_{FM} < 0.4		$\text{ChlaT} = 0.0628 - 0.394\Phi_{\text{pSII-470}} + 0.603\Phi_{\text{PSII-520}} + 1.67\Phi_{\text{PSII-645}} - 1.06\Phi_{\text{PSII-665}}$	3.55		78	57.76	195
	$\Phi_{\text{pSII-470}}$			-1.81			
	$\Phi_{\text{PSII-520}}$			2.37			
	$\Phi_{\text{PSII-645}}$			4.84			
	$\Phi_{\text{PSII-665}}$			-2.08			
RM_{FM} > 0.4		$\text{ChlaT} = 1.22 - 13.3\Phi_{\text{pSII-470}} + 6.82\Phi_{\text{PSII-520}} + 14.6\Phi_{\text{PSII-645}} - 26.5\Phi_{\text{PSII-665}}$	9.62		80.2	316	316
	$\Phi_{\text{pSII-470}}$			-6.95			
	$\Phi_{\text{PSII-520}}$			3.42			
	$\Phi_{\text{PSII-645}}$			-6.24			
	$\Phi_{\text{PSII-665}}$			19.73			

Por lo anterior, los criterios de selección de las ecuaciones se determinaron de la siguiente manera: cuando la respuesta media de la fluorescencia múltiple (RM_{FM}) se obtenga menor a 0.4 se debe aplicar la primera ecuación de la tabla V (ChlaT medias-bajas) y cuando la RM_{FM} se calcule menor a 0.4 se debe aplicar la segunda ecuación (ChlaT altas) (Tabla V).

Los resultados de los análisis estadísticos para esta modelación se resumen en la tabla V. Para la ecuación de ChlaT medias-bajas ($RM_{FM} < 0.4$) se obtuvo una R^2 porcentual de 78%, siendo la constante y solo los canales $\Phi_{PSII-520}$, $\Phi_{PSII-645}$ y $\Phi_{PSII-665}$ estadísticamente significativos, el canal $\Phi_{PSII-665}$ el que presento un coeficiente negativo. El análisis de significancia global determino que la ecuación fue significativa (Tabla V). De igual manera, la ecuación para ChlaT altas ($RM_{FM} > 0.4$) obtuvo un valor de R^2 80.2%, siendo todos los canales y la constante significativos. Los canales $\Phi_{PSII-470}$ y $\Phi_{PSII-645}$, presentaron signos negativos. La ecuación fue altamente significativa con una razón F de 377.73 (Tabla V).

Por su parte, la Modelación 3 se compone de 3 ecuaciones complementarias, cada una para las condiciones de ChlaT probada (baja, media y alta), los resultados de esta modelación se resumen en la tabla VI. Al igual que la Modelación 2 los criterios de selección de cada ecuación se basan en el índice RM_{FM} . Los límites de los RM_{FM} fueron determinados por el análisis visual de la gráfica de dispersión (Fig. 8d) y se enfocó en separar en dos partes la zona de menor dispersión (zona de ChlaT medias-bajas identificada en la Modelación 2). Este análisis resulto en la determinación de la zona para ChlaT bajas (con $\Phi_{PSII} <$

0.36) y otra zona para ChlaT medias (con Φ_{PSII} entre 0.36 y 0.45). Por lo anterior, los criterios de selección para utilizar cada ecuación fueron: para la ecuación con ChlaT bajas se debe usar cuando se calcule un índice $RM_{FM} < 0.36$, mientras que la ecuación para ChlaT medias se aplica con valores del índice RM_{FM} entre 0.36 a 0.45 y por consiguiente, la ecuación para ChlaT alta se debe aplicar cuando los valores del índice RM_{FM} sean > 0.45 .

Tabla VI.- Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de la ChlaT, para la modelación 3. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de las variables y la constante del modelo probada con $t_{critica} \alpha = 0.05; n-p$. Significancia global del modelo probada con $F_{critica} \alpha = 0.05; p, n-1$. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.

		Modelación 3	Constante "b0"	Variables	Estadístico	CD	Modelo	Estadístico	No. Datos
	Parametro	Ecuaciones	t_{cal}	t_{cal}	t_{crit}	$R^2 \%$	F_{cal}	F_{crit}	n
RM FM (< 0.36)		ChlaT = 0.0233 - 0.519 $\Phi_{PSII-470}$ + 0.737 $\Phi_{PSII-520}$ + 1.77 $\Phi_{PSII-645}$ - 1.12 $\Phi_{PSII-665}$	1.89		1.99	90.5	217.46	2.46	95
	$\Phi_{PSII-470}$			-3.93					
	$\Phi_{PSII-520}$			4.84					
	$\Phi_{PSII-645}$			7.84					
	$\Phi_{PSII-665}$			-7.0					
RM FM (0.36 - 0.45)		ChlaT = 0.688 - 1.31 $\Phi_{PSII-470}$ - 2.46 $\Phi_{PSII-645}$ + 5.50 $\Phi_{PSII-665}$	18.04		1.97	54.1	61.28	2.66	159
	$\Phi_{PSII-470}$			-2.7					
	$\Phi_{PSII-645}$			-3.44					
	$\Phi_{PSII-665}$			7.2					
RM FM (> 0.45)		ChlaT = 1.27 - 7.65 $\Phi_{PSII-470}$ - 21.5 $\Phi_{PSII-645}$ + 24.9 $\Phi_{PSII-665}$	8.85		1.96	80.8	375.18	2.63	271
	$\Phi_{PSII-470}$			-4					
	$\Phi_{PSII-645}$			-7.36					
	$\Phi_{PSII-665}$			19.97					

Los resultados del análisis estadístico arrojaron que para la ecuación de ChlaT bajas ($RM_{FM} < 0.36$) se obtuvo una R^2 porcentual de 90.5%, siendo todos los canales significativos y los canales $\Phi_{PSII-470}$, $\Phi_{PSII-665}$ presentaron coeficientes negativos (Tabla VI).

Para la ecuación de ChlaT medias (RM_{FM} entre 0.36 a 0.45) se obtuvo un valor de R^2 porcentual de 54.2%, que fue el valor más bajo en esta modelación. El $\Phi_{PSII-520}$ resulto no fue significativo, y el resto de los canales ($\Phi_{PSII-470}$, $\Phi_{PSII-645}$ y $\Phi_{PSII-665}$) si fueron significativos y los canales $\Phi_{PSII-470}$ y $\Phi_{PSII-645}$ presentaron coeficientes negativos (Tabla VI).

La ecuación para ChlaT altas ($RM_{FM} > 0.46$), presento una R^2 porcentual de 80.8%. Solo $\Phi_{PSII-520}$ no fue significativo, y los canales $\Phi_{PSII-470}$ y $\Phi_{PSII-645}$ presentaron coeficientes negativos (Tabla VI).

Es de hacer notar que las tres ecuaciones de la Modelación 3 fueron estadísticamente significativas (Tabla VI).

Al igual que la modelación anterior, la Modelación 4 consta de 3 ecuaciones complementarias para condiciones de ChlaT: bajas, medias y altas. La diferencia radica en el criterio de selección de las fronteras para la aplicación de dichas ecuaciones. La modelación anterior se basó en un análisis visual de la relación de ChlaT vs Φ_{PSII} , por el contrario, esta modelación se basó en una serie de análisis de factor ensayando bloques de datos de RM_{FM} con incrementos de 0.1, empezando en 0.01 hasta 0.6 que son los valores mínimos y máximos. Para esta modelación, las concentraciones de ChlaT se dividieron en ChlaT bajas (< 0.5

$\mu\text{g/L}$), ChlaT medias (0.51 a 1.5 $\mu\text{g/L}$) y ChlaT altas ($> 1.51 \mu\text{g/L}$). Los valores de los índices RM_{FM} fueron agrupándose hasta quedar en solo un intervalo de RM_{FM} asociados a una ChlaT.

El resultado final de este análisis de factor (Fig. 9) indica que para aplicar la ecuación de ChlaT bajas los RM_{FM} deben ser < 0.1 , la ecuación de ChlaT medias se debe de aplicar con valores de RM_{FM} entre 0.1 a 0.4 y la ecuación para ChlaT altas debe ser aplicada cuando se presentan $\text{RM}_{\text{FM}} > 0.4$.

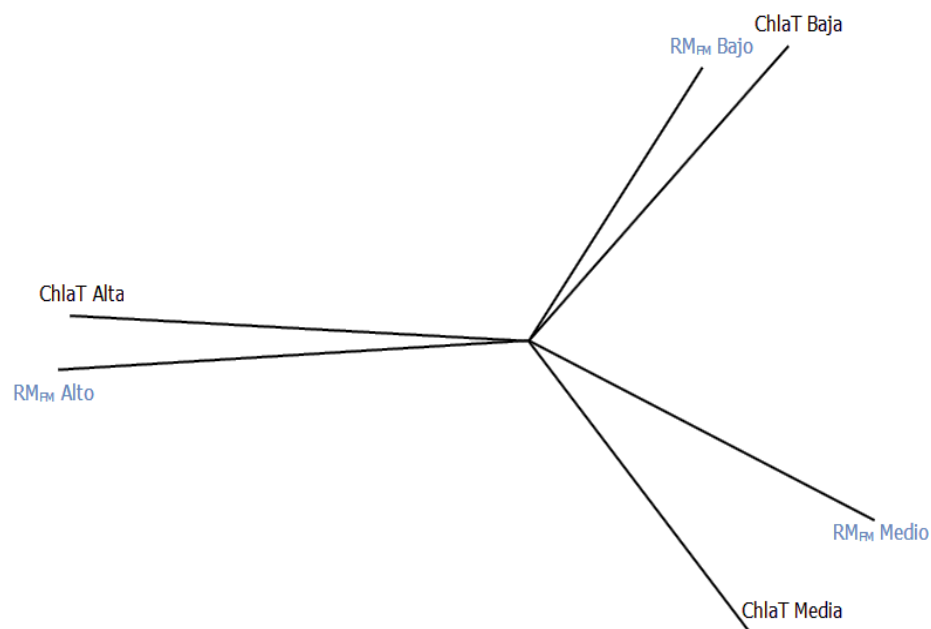


Figura. 9.- Gráfico de vectores del análisis de factor, entre RM_{FM} (Ec. 12) que fueron bloqueados como bajos (< 0.1) medios (0.1- 0.4) y altos (> 0.4) y la ChlaT se agrupó como ChlaT bajas ($< 0.5 \text{ mg / L}$) ChlaT medias (0.51 a 1.5 mg/ L) y ChlaT altas (> 1.51) y donde se aprecia la asociación de los datos de ChlaT y $\text{RM}_{\text{FM}}\Phi_{\text{PSII}}$.

Los resultados del análisis estadístico para la modelación 4 se resumen en la tabla VII, de acuerdo al análisis de significancia de los coeficientes ligados a los canales para cada ecuación: la ecuación para ChlaT bajas presento un R^2

porcentual de 92.5% obteniendo los cuatro canales significativos y presentándose coeficientes negativos en los canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$, $\Phi_{\text{PSII-665}}$. (Tabla VII).

Por su parte, las ecuaciones de Chla medias y altas presentaron una R^2 porcentual de 58% y 81% respectivamente. En ambas ecuaciones el canal $\Phi_{\text{PSII-520}}$ no fue significativo y los canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$ y $\Phi_{\text{PSII-645}}$, son ponderados por coeficientes negativos y el canal $\Phi_{\text{PSII-665}}$ por coeficientes positivos (Tabla VII).

Las tres ecuaciones derivadas de la Modelación 4 fueron significativas de manera global, siendo la ecuación de ChlaT altas la de mayor significancia ($F_{\text{calculada}} = 377.73$), seguido de la ecuación para ChlaT bajas ($F_{\text{calculada}} = 227.5$) y la de ChlaT medias ($F_{\text{calculada}} = 29.42$) (Tabla VII).

Tabla VII.- Modelación del rendimiento cuántico óptimo (Φ_{PSII}) como predictor de la concentración de ChlaT, para la Modelación 4. Por un análisis de regresión lineal múltiple, con base en su coeficiente de determinación (R^2). Significancia de las variables y la constante del modelo probada con $t_{\alpha = 0.05; n-p}$ crítica, significancia global del modelo probada con $F_{\alpha = 0.05; p, n-1}$ crítica. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%. Los valores resaltados en color rojo refieren a los valores que no fueron significativos en cada uno de los análisis.

		Modelación 4	Constante "bo"	Variables	Estadístico	CD	Modelo	Estadístico	No. Datos
	Parametro	Ecuaciones	t_{cal}	t_{cal}	t_{crit}	$R^2 \%$	F_{cal}	F_{crit}	n
RMFM (< 0.1)		$ChlaT = 0.0628 - 0.517\Phi_{PSII-470} + 0.737\Phi_{PSII-520} + 1.77\Phi_{PSII-645} - 1.15\Phi_{PSII-665}$	2.89		1.99	92.5	227.5	2.74	67
	$\Phi_{PSII-470}$			-4.93					
	$\Phi_{PSII-520}$			3.84					
	$\Phi_{PSII-645}$			7.56					
RMFM (0.1 - 0.4)		$ChlaT = 0.203 - 0.571\Phi_{PSII-470} - 0.471\Phi_{PSII-645} + 1.85\Phi_{PSII-665}$	13.06		1.97	58	29.42	2.43	146
	$\Phi_{PSII-470}$			-3.19					
	$\Phi_{PSII-645}$			-2.23					
	$\Phi_{PSII-665}$			6.19					
RMFM (> 0.4)		$ChlaT = 1.24 - 7.43 \Phi_{PSII-470} - 21.8 \Phi_{PSII-645} + 28.0\Phi_{PSII-665}$	8.67		1.96	81	377.7	2.63	265
	$\Phi_{PSII-470}$			-3.9					
	$\Phi_{PSII-645}$			-7.51					
	$\Phi_{PSII-665}$			20.18					

5.6. Validación de las modelaciones propuestas para estimar la ChlaT

En total se lograron obtener 232 experimentos de campo (Cruceros y estación BSQ), donde se obtuvo el dato de Φ_{PSII} (Phyto-PAM) con su correspondiente valor de ChlaT (HPLC). Usando las 4 modelaciones propuestas y siguiendo los criterios de selección de las ecuaciones complementarias en cada una de ellas, se estimó la $ChlaT_{calculada}$ utilizando los valores correspondientes a Φ_{PSII} .

La primera aproximación para comparar la $ChlaT_{calculada}$ con la $ChlaT_{observada}$ fue basada en un análisis *Match-up* para cada una de las modelaciones (Fig. 10). Con la finalidad de reforzar los resultados derivados del análisis anterior se calculó el $r_{pearson}$, el RMSE y el BIAS para cada modelación (Fig. 10 y tabla VIII).

Gráficamente la aproximación *Match-up* de $ChlaT_{calculada}$ vs $ChlaT_{observada}$ muestran una mejor ajuste a la recta a 45 grados en la Modelación 3 (Fig. 10c). De la misma manera, se observa que la Modelación 4 (Fig. 10d) presenta un buen ajuste gráfico pero con una mayor dispersión en comparación con la modelación 3. Las modelaciones 1 y 2 (Fig. 10a y 10b, respectivamente) presentaron una mayor dispersión en sus estimaciones en comparación con el resto de las modelaciones, esta dispersión es más amplia cuando se calcula la ChlaT entre 1 a 4 $\mu g/L$ (Fig. 10a y 10b).

Basados en el coeficiente de correlación de Pearson del análisis de *Match-up* (Fig.10 y Tabla VIII), la modelación 3 obtuvo el $r_{pearson}$ más alto, con un valor de 0.93, seguida de la modelación 4 que obtuvo un $r_{pearson}$ de 0.91 y la modelación 1

presento un valor de 0.82. Por su parte, la Modelación 2 fue la que presento un menor grado de ajuste al presentar el valor de la r_{pearson} de 0.66.

El cálculo del RMSE, mostro que la modelación 3 presento el menor valor de RMSE (0.39), seguido de las modelaciones 4 (0.49). Las modelaciones 1 y 2 presentaron valores elevados de RMSE (0.74, 0.93, respectivamente) (Tabla VIII). Por su parte el BIAS mostro que la modelación 3 presento el menor sesgo con un valor de BIAS= 0.17, seguido por la modelación 4 que obtuvo un sesgo del 0.36, el resto de las modelaciones 1 y 2 presentaron sesgos elevados (0.87 y 1.16 respectivamente).

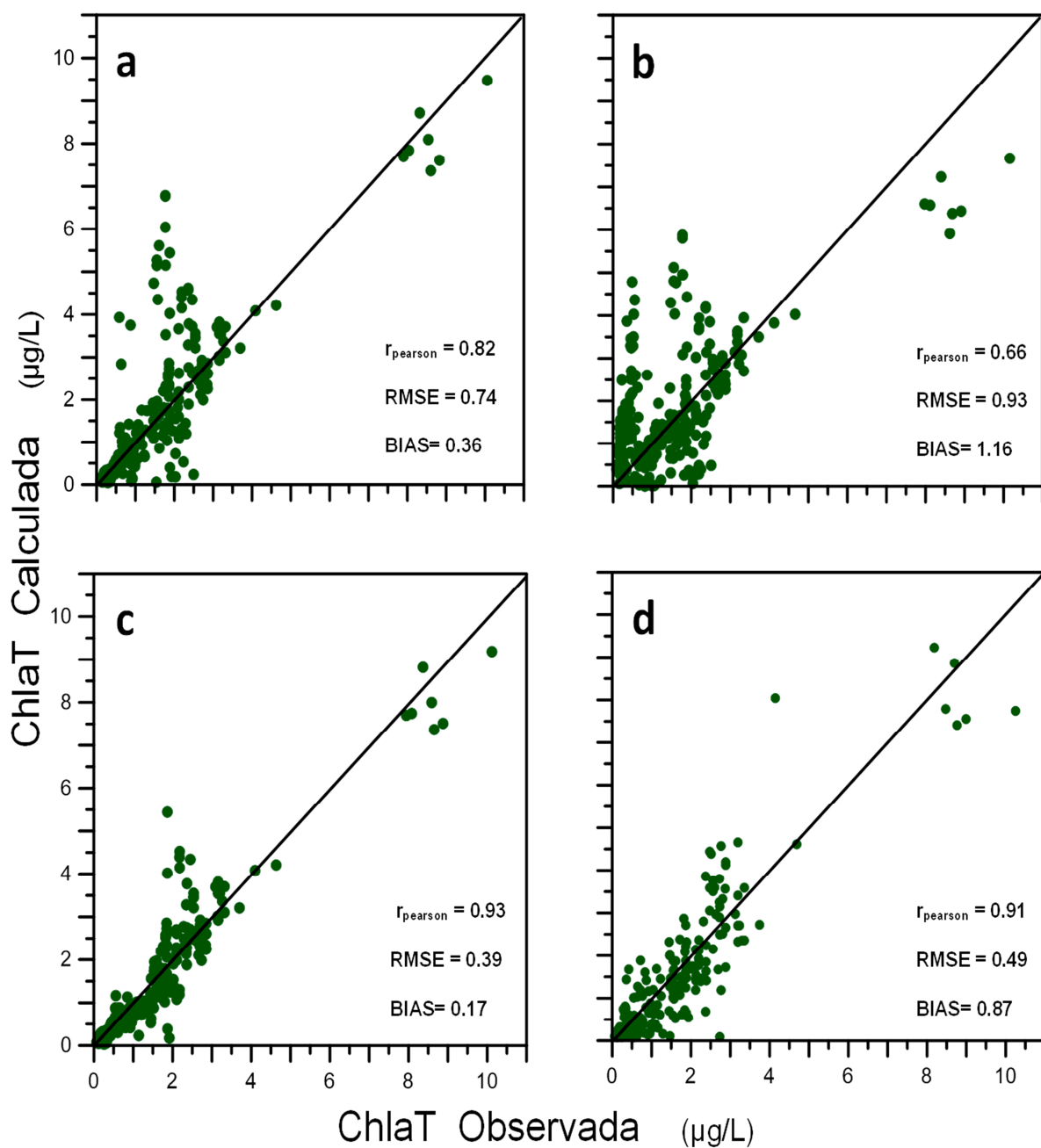


Figura. 10.- Relación entre la ChlaT observada (HPLC) y ChlaT calculada estimada a partir de los modelos propuestos con Φ_{PSII} (mg/L), $n = 232$. Las líneas diagonales a 45° representan la relación ideal 1:1. (a) ChlaT estimada a partir de la Modelacion1, (b) ChlaT estimada a partir de la Modelación 2, (c) ChlaT estimada a partir de la modelación 3 y (d) ChlaT estimada a partir de la Modelacion 4.

Tabla. VIII.- Sinopsis de los criterios de selección para cada modelación, el número de ecuaciones complementarias y los resultados de los descriptores estadísticos utilizados en el análisis *Match-up* de $\text{ChlaT}_{\text{observada}}$ (HPLC) y $\text{ChlaT}_{\text{calculada}}$ (Φ_{PSII}). Para las cuatro modelaciones propuestas. Valor crítico de $r_{\text{pearson } 0.05, 232} = 0.117$.

			Estadísticos de Comparación		
	Criterios de selección	No. de Ecuaciones	r_{Pearson}	RMSE	BIAS
Modelación 1		$\text{ChlaT} = 0.768 - 7.96\Phi_{\text{PSII-470}} + 3.31\Phi_{\text{PSII-520}} - 15.6\Phi_{\text{PSII-645}} + 26.4\Phi_{\text{PSII-665}}$	0.82	0.74	0.36
Modelación 2	Medio-Bajo ($\text{RM}_{\text{FM}} < 0.4$)	$\text{ChlaT} = 0.0628 - 0.394\Phi_{\text{PSII-470}} + 0.603\Phi_{\text{PSII-520}} + 1.67\Phi_{\text{PSII-645}} - 1.06\Phi_{\text{PSII-665}}$	0.66	0.93	1.16
	Alto ($\text{RM}_{\text{FM}} > 0.4$)	$\text{ChlaT} = 1.22 - 13.3\Phi_{\text{PSII-470}} + 6.82\Phi_{\text{PSII-520}} + 14.6\Phi_{\text{PSII-645}} - 26.5\Phi_{\text{PSII-665}}$			
Modelación 3	Bajo ($\text{RM}_{\text{FM}} < 0.36$)	$\text{ChlaT} = 0.0233 - 0.519\Phi_{\text{PSII-470}} + 0.737\Phi_{\text{PSII-520}} + 1.77\Phi_{\text{PSII-645}} - 1.12\Phi_{\text{PSII-665}}$	0.93	0.39	0.17
	Medio ($\text{RM}_{\text{FM}} = 0.36 - 0.45$)	$\text{ChlaT} = 0.688 - 1.31\Phi_{\text{PSII-470}} - 2.46\Phi_{\text{PSII-645}} + 5.50\Phi_{\text{PSII-665}}$			
	Alto ($\text{RM}_{\text{FM}} > 0.45$)	$\text{ChlaT} = 1.27 - 7.65\Phi_{\text{PSII-470}} - 21.5\Phi_{\text{PSII-645}} + 24.9\Phi_{\text{PSII-665}}$			
Modelación 4	Bajo ($\text{RM}_{\text{FM}} < 0.1$)	$\text{ChlaT} = 0.0628 - 0.517\Phi_{\text{PSII-470}} + 0.737\Phi_{\text{PSII-520}} + 1.77\Phi_{\text{PSII-645}} - 1.15\Phi_{\text{PSII-665}}$	0.91	0.49	0.87
	Medio ($\text{RM}_{\text{FM}} = 0.1 - 0.4$)	$\text{ChlaT} = 0.203 - 0.571\Phi_{\text{PSII-470}} - 0.471\Phi_{\text{PSII-645}} + 1.85\Phi_{\text{PSII-665}}$			
	Alto ($\text{RM}_{\text{FM}} > 0.4$)	$\text{ChlaT} = 1.24 - 7.43\Phi_{\text{PSII-470}} - 21.8\Phi_{\text{PSII-645}} + 28.0\Phi_{\text{PSII-665}}$			

6. DISCUSIÓN

Es un concepto generalizado que la respuesta de fluorescencia de la Chla proporciona una señal relativamente fuerte para evaluar la concentración de la Chla en el medio acuático (v.gr. Lorenzen, 1966; Jakob *et al.*, 2005). Las metodologías actuales, como la fluorescencia multiespectral por Phyto-PAM, son reconocidas como metodologías prometedoras para estimar no solo la concentración de Chla sino de otros pigmentos accesorios, característicos de algunos grupos del fitoplancton (Schreiber, 1995, 1998; Schreiber *et al.*, 1998; Beutler *et al.*, 2002; Papageorgiou y Govindjee, 2004). Sin embargo, debemos considerar que los avances más importantes en el estudio de los parámetros de fluorescencia del fitoplancton con Phyto-PAM, se han centrado en especies de aguas continentales (lagos y ríos). Los estudios en medios marinos son escasos y en algunos casos se basan exclusivamente en especies cultivadas en laboratorio (v.gr. Nicklisch y Köhler, 2001; Beutler *et al.*, 2002; Papageorgiou y Govindjee, 2004).

En especial, en aguas mexicanas se conoce muy poco de experimentos de parámetros de fluorescencia en fitoplancton de ecosistemas marinos. Los estudios existentes, se basan en la relación de los efectos del estrés de nutrientes con el rendimiento cuántico máximo del fitoplancton del Pacífico Nororiental Mexicano (ETNP, por sus siglas en inglés) (Behrenfeld *et al.*, 2006; Almazán-Becerril y García-Mendoza, 2008); pero no existen estudios que relacionen las diferentes concentraciones de ChaT con los parámetros básicos de la fluorescencia.

Este estudio tuvo el objetivo de utilizar la respuesta de fluorescencia de los grupos más conspicuos del fitoplancton marino bajo diferentes concentraciones de ChlaT y tratar de modelar esta relación, para poder calcular la ChlaT de una manera rápida, sin necesidad de un proceso de extracción. La validación de las modelaciones propuestas se basó en experimentos de campo de Phyto-PAM y su correspondiente valor de ChlaT.

En la búsqueda del mejor parámetro de fluorescencia como predictor de la concentración de ChlaT en cada grupo de fitoplancton, se realizó un análisis de significancia de los coeficientes asociado a los parámetros por canal contra la ChlaT experimentada (Tabla III). Dicho análisis mostro que en cuatro de los seis grupos (Dinofitas, Crisofitas, Cryptofitas y Prymnesiofitas) el Φ_{PSII} fue el mejor parámetro que se asoció con la ChlaT y que puede ser usado como descriptor de la misma. El resto de los grupos (Bacilariofitas y Clorofitas) obtuvieron mejor asociación con la F_m y la F_0 respectivamente (Tabla III).

Si bien es cierto, el Φ_{PSII} mostro una buena asociación en la mayoría de los grupos (Tabla III), los dos grupos restantes (Bacilariofitas y Clorofitas) son representantes muy importantes de la taxocenosis del fitoplancton marino (Falkowsky y Raven, 1997, 2007). En este camino, el no considerar una modelación con la presencia de estos dos grupos, se podría subestimar de forma importante la concentración de ChlaT en el medio natural. Algunos autores (Nicklisch y Köhler, 2001; Jakob *et al.*, 2005; Timmermans *et al.*, 2008) han encontrado relaciones altas entre los parámetros de fluorescencia y la Chla, pero

con muestras dominadas mayores a 90% por un grupo específico, como Diatomeas o Dinoflagelados.

En este sentido, si quisiéramos aplicar una modelación dependiente de la presencia y abundancia de los grupos, deberíamos conocer primeramente la taxocenosis de la muestra para poder así ponderar dicha modelación. Como segundo paso deberíamos realizar un diseño experimental, el cual considerara las fluctuaciones de presencia y dominancia de los diferentes grupos fitoplanctónicos. Ambos pasos implican una inversión de tiempo considerable, la modelación no sería sencilla y necesitaríamos saber previamente la composición fitoplanctónica, por lo cual, sería más rápido realizar una medición de ChlaT con los métodos tradicionales. Por esto, y sin saber la composición específica (y abundancia) de la muestra, el reto en este trabajo fue poder estimar la concentración de ChlaT (modelada de respuestas de diferentes especies) en una población mixta con proporciones variantes.

Debido a lo anterior, y considerando que el objetivo de este trabajo es el de poder determinar la concentración de ChlaT en poblaciones naturales (mixtas) de una manera rápida y sin conocer la taxocenosis fitoplanctónica de la muestra, se decidió unir todos los grupos fitoplanctónicos con sus respectivos valores de parámetros de fluorescencia con los cuatro canales y de ChlaT, en una base de datos única. Así, se podrá obtener una respuesta “mixta” y buscar en un primer paso si existe un parámetro de fluorescencia que mejor se asocie a la ChlaT, para posteriormente establecer la modelación más adecuada para llevar a cabo dicha estimación.

Siguiendo un procedimiento similar al usado en los resultados de la sección por grupos fitoplanctónicos, la selección del mejor parámetro de fluorescencia asociado a la ChlaT englobando todos los grupos, se basó en las significancia de los coeficientes ligados a los canales por cada parámetro. Además se consideró que el coeficiente de determinación (R^2) fuera lo más cercano a 1 y por último que el modelo fuese globalmente significativo.

Con base en los estadísticos de prueba anteriores, los resultados mostraron (Tabla III) que el parámetro que mejor asocio con la ChlaT fue el rendimiento cuántico (Φ_{PSII}). Contrario a lo reportado con los estudios que relacionan los parámetros de fluorescencia con la Chla, donde el F_0 es el mejor estimador de la concentración de la Chla, debido a que este no se ve influenciado por procesos foto-químicos (Schreiber *et al.*, 1994; Geel, 1997; Papageorgiou y Govindjee, 2004; Jakob *et al.*, 2005, entre otros). Pero para que F_0 sea usado adecuadamente, la muestra debe ser aclimatada a cierto tiempo en oscuridad y este tiempo debe garantizar la reducción de la PQ_A (Maxwell y Johnson, 2000; Nicklisch y Köhler, 2001). Maxwell y Johnson (2000) han reportado que los tiempos de aclimatación a luz actínica dependen de la capacidad fotosintética de los grupos presentes en las muestras de agua y de su historial de flujo fotónico. Esto ha sido ampliamente estudiado especialmente en las Cianofitas por la presencia de las Ficobilinas (Beutler, 2003) y en especies estresadas a diferentes regímenes de luz en condiciones de laboratorio (Nicklisch y Köhler, 2001; Jakob *et al.*, 2005). Honeywill *et al.* (2002) sugieren que el tiempo de aclimatación en oscuridad que utilizaron en las muestras que provenían de alta irradiancia ambiental (superficiales), de ~20 -

40 minutos (incluido el tiempo de oscuridad de las botellas Niskin de muestreo), no fue suficiente para reducir la PQ_A , lo que resultó en fluctuaciones de los valores de los parámetros de F_0 y F_m .

Los cultivos que se utilizaron en este estudio para modelar la relación de los parámetros de fluorescencia con la ChlaT, provienen de un historial de flujo fotónico continuo ($\sim 150 \mu E m^{-2} s^{-1}$), con ciclos de luz de 24hrs. Quizá esto pudo haber afectado los tiempos de aclimatación a la luz actínica de los parámetros F_0 y F_m y por lo tanto afectado la relación con la ChlaT, ya que no se encontró buena relación entre estas variables.

Como ya se mencionó anteriormente, el Φ_{PSII} presentó la mejor asociación con la ChlaT; pero la mayoría de los estudios actuales se han basado en los posibles efectos de los nutrientes sobre la respuesta del Φ_{PSII} , en estados de aclimatación a la luz y su relación con los parámetros de fluorescencia, bajo curvas de luz rápidas (rETR-E) (Papageorgiou y Govindjee, 2004). Muy pocos estudios han evaluado la relación del Φ_{PSII} con la ChlaT. Maxwell y Johnson (2000), mencionan que el Φ_{PSII} está relacionado con el rendimiento fotoquímico (qP), utilizado como estimador de la proporción de centros de reacción abiertos (CRIs "oxidados"). Incluso, se ha descrito que si se conoce la razón de fotones absorbidos entre los emitidos, esto puede usarse para determinar la emisión de la fluorescencia con base en la unidad de Chla (Estrada *et al.*, 1996). Lo anterior refuerza la encontrada en este trabajo, exponiendo que el Φ_{PSII} puede usarse como estimador de la ChlaT.

En la determinación del mejor parámetro, el Φ_{PSII} presento todos los canales significativos y los canales $\Phi_{PSII-470}$ y $\Phi_{PSII-645}$ presentaron signos negativos asociados a los coeficientes, es decir, se asociaron de manera inversa con la ChlaT. Lo anterior, significa que cuando la respuesta de estos canales sea menor, la concentración de ChlaT aumentara y viceversa. De la misma manera, los $\Phi_{PSII-520}$ y $\Phi_{PSII-665}$ se asociaron positivamente a la ChlaT, esto significa que cuando la señal sea alta en estos canales, se presentaron condiciones altas de ChlaT y viceversa.

Aunado a lo antepuesto, el análisis grafico basado en diagramas de dispersión de cada parámetro (eje "X") y la ChlaT (eje "Y") (Fig. 8), reforzó los resultados de la Tabla III, siendo Φ_{PSII} el que presento un patrón de dispersión definido en los cuatro canales, con forma general de hipérbola inversa (Fig. 8d).

El patrón de hipérbola inversa mostrado en la relación entre Φ_{PSII} y ChlaT (Fig. 8d), se puede describir de una manera sencilla como el incremento exponencial de la ChlaT conforme aumenta el Φ_{PSII} . La tendencia de mayor dispersión en los valores mayores de $0.4 \Phi_{PSII}$ y menor dispersión en valores menores de $0.4 \Phi_{PSII}$, está relacionada de la misma manera con la concentración de ChlaT. Cuando la concentración de ChlaT fue menor de $3 \mu\text{g/L}$, la respuesta del Φ_{PSII} fue menor a 0.4 y cuando la concentración de ChlaT fue mayor a $3 \mu\text{g/L}$, la respuesta del Φ_{PSII} mostro valores mayores a 0.4 y la dispersión de los datos aumento. Nicklisch y Köhler (2001) reportan qué cuando la concentración de Chla es elevada ($> 1.2 \mu\text{g/L}$), las respuestas de los parámetros es muy variable y se relacionan con dos fenómenos principales: (1) las altas abundancias de

fitoplancton pueden reabsorber la luz emitida por efectos de auto-sombreado; (2) la señal de fluorescencia puede provenir de compuestos degradados de Chla; y Desiderio *et al.* (1997) mencionan un tercero (3) el “efecto paquete” puede disminuir la capacidad de absorber luz de las células y por consiguiente también la eficiencia de excitación de fluorescencia. Este efecto, depende del tamaño de las células, generalmente es más extremo en presencia de células de tamaño grande, como el microplancton ($> 20\mu\text{m}$) y en células altamente pigmentadas (Morel y Bricaud, 1981). Quizá esto pudo afectar de la misma manera la relación del Φ_{PSII} en altas concentraciones de ChlaT ($> 3 \mu\text{g/L}$), lo que resultó en alta dispersión del Φ_{PSII} . La relación del Φ_{PSII} con ChlaT bajas, se ve afectan en menor grado por estos fenómenos, lo que se traduce en una menor dispersión de los datos.

Considerando que el Φ_{PSII} presentó la mejor asociación con la ChlaT, el siguiente objetivo fue usar el Φ_{PSII} como predictor de la concentración de ChlaT, lo que resultó en cuatro modelaciones finales, cuyas particularidades se discuten a continuación. El comportamiento de los coeficientes ligados a los canales que resultaron significativos, presentó una tendencia particular como predictor de la ChlaT. En todas las ecuaciones de las cuatro modelaciones, el canal $\Phi_{\text{PSII-470}}$ se asoció inversamente a la ChlaT (Tabla IX), con excepción de la ecuación de ChlaT medias-bajas de la modelación 2 que no resultó significativo (cuadro blanco, Tabla IX). Esta asociación inversa con la ChlaT se puede explicar porque en las tres condiciones de ChlaT probadas, la respuesta del canal $\Phi_{\text{PSII-470}}$ siempre responderá de manera inversa a la concentración de ChlaT.

De manera similar, cuando el canal $\Phi_{\text{PSII-520}}$ resultó significativo, presentó un patrón de asociación positiva con la ChlaT en todos los casos (Tabla IX). Esta tendencia significa que, cuando la concentración de ChlaT aumenta o disminuye, la respuesta del $\Phi_{\text{PSII-520}}$ variará de la misma manera que lo hace el dicho canal.

Tabla IX.- Resumen del análisis de significancia de los coeficientes de los canales y del coeficiente de determinación por ecuación para las cuatro modelaciones propuestos para calcular la ChlaT. Dónde: el  representa los coeficientes que resultaron con signo positivo, el  representa los coeficientes que resultaron con signo negativo, el  representa los canales que no fueron significativos en la ecuación y el  representa los coeficientes de mayor peso en cada ecuación.

	RM _{FM}	No. de Ecuaciones	R ²	Canales			
				$\Phi_{\text{PSII-470}}$	$\Phi_{\text{PSII-520}}$	$\Phi_{\text{PSII-645}}$	$\Phi_{\text{PSII-645}}$
Modelación 1	General	1	80.5				
Modelación 2	Medio-Bajo	1	78.0				
	Alto	2	80.2				
Modelación 3	Bajo	1	90.5				
	Medio	2	54.1				
	Alto	3	80.8				
Modelación 4	Bajo	1	92.5				
	Medio	2	58.0				
	Alto	3	81.0				

El análisis de significancia de los coeficientes ligados a los canales, mostro que los coeficientes de los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ resultaron complementarios, esto significa que, cuando un canal presentó signo negativo el otro presentó signo positivo (Tabla IX). De la misma manera, estos dos canales resultaron los de mayor significancia en las ecuaciones (de mayor peso) (asterisco en la Tabla IX), lo que se puede identificar por el valor del coeficiente ligado al canal en cada ecuación y significa que el comportamiento de la ChlaT puede ser explicado fundamentalmente por los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$.

Los resultados anteriores se pueden explicar comparando el espectro de absorción de la Chla (Fig. 1) con la respuesta de excitación de los cuatro canales del Phyto-PAM. Se ha observado que el espectro de absorción de la Chla (Fig. 1) presenta dos picos de mayor absorción, siendo el de mayor magnitud el cercano a los ~430nm (en la región azul del espectro de luz visible) y el segundo, en longitud de onda ~680nm (en la región roja del espectro de luz visible). Los canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$ y $\Phi_{\text{PSII-520}}$ miden la respuesta dentro de zona de menor absorción de la Chla, los cuales originalmente fueron creados para medir la respuesta de absorción de los otros pigmentos como Chl *b* y ficoeritrina respectivamente (Schreiber, 2004). Esto puede asociarse a que los canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$ y $\Phi_{\text{PSII-520}}$ sean los que menor explican el comportamiento de la ChlaT en las modelaciones. De la misma manera, la medición de los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ está más asociada al segundo pico de absorción de la Chla, lo que explica que los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ tienen el mayor peso en las ecuaciones y que son los canales que mejor describen el comportamiento de la ChlaT.

De los resultados anteriores, surgió una segunda pregunta:

¿Es posible mejorar la precisión al estimar la concentración de ChlaT si solo se utilizan el o los canales que mejor describieron el comportamiento de la ChlaT?

De acuerdo a los resultados los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ son los de mayor peso en las ecuaciones (Tabla IX) y además son los más cercanos al segundo pico de absorción de la Chla (Fig. 1). Estos dos criterios determinaron que los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ son los que mejor describieron el comportamiento de la ChlaT y ayudaron a probar la pregunta anterior.

La modelación se realizó de la misma manera que la aproximación usando los 4 canales, esto es, un análisis de regresión lineal por pasos con la técnica de eliminación hacia atrás probando la significancia de los coeficientes del canal y su asociación con la ChlaT, en particular para cada canal y otro sumando los dos canales.

Los resultados de acuerdo al análisis de regresión y los estadísticos de prueba mostraron que los valores obtenidos con los modelos simples fueron menores al modelo que considera dos canales (Tabla X), donde el modelo de dos canales obtuvo una $R^2 = 76.6\%$ y los modelos simples de $\Phi_{\text{PSII-645}}$ con una $R^2 = 46.3\%$ y el modelo de $\Phi_{\text{PSII-665}} = 58.2\%$. El modelo de dos canales presentó una $F_{\text{Calculada}}$ de 748.08 y los modelos simples $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$ de 490.59 y 708.51, respectivamente. Pero, estos resultados no fueron mejores a los resultados obtenidos en las modelaciones que consideran cuatro canales, en particular con la modelación 3 que fue la mejor modelación encontrada en este estudio (Tabla X).

Posteriormente se estimó la concentración de ChlaT con la modelación de dos canales ($\Phi_{\text{PSII-645}}$ - $\Phi_{\text{PSII-665}}$) y se analizó bajo un análisis *Match-up* con los estadísticos de prueba de RMSE y BIAS, los resultados de este análisis no fueron mejores a los resultados de las modelaciones con cuatro canales. El modelo de dos canales obtuvo una r_{pearson} del 74%, un error muy alto del 90% y un sesgo del 36% con una tendencia de sobreestimación (Fig. 11). Estos análisis probaron que al considerar un modelo con los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$, no mejora la estimación de la ChlaT y sugiere que la respuesta de los Canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$ y $\Phi_{\text{PSII-520}}$ ayuda a ajustar la precisión del cálculo de la ChlaT en las modelación que utilizan las 4 longitudes de onda de excitación.

Tabla X.- Análisis de regresión lineal para los canales $\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$, como predictores de la concentración de ChlaT, con base en los valores obtenidos de coeficiente de determinación (R^2). Significancia de la variable y la constante del modelo probada con t_{critica} $\alpha = 0.05$; n-p, la significancia global del modelo probada con F_{critica} $\alpha = 0.05$; p,n-1. Todos los análisis fueron probados con un nivel de confianza del 95%.

	Modelo de regresion lineal	Constante	Variable	Estadistico	CD	Modelo	Estadistico	No. Datos
Canal	Ecuacion	t_{cal}	t_{cal}	t_{crit}	$R^2 \%$	F_{cal}	F_{crit}	n
	ChlaT = - 0.320 + 6.20 $\Phi_{\text{PSII-665}}$	-4.02		1.96	58.2	708.51	3.85	510
$\Phi_{\text{PSII-665}}$			25.35					
	ChlaT = - 0.700+ 7.35 $\Phi_{\text{PSII-645}}$	-58.4		1.96	46.3	490.59	3.85	544
$\Phi_{\text{PSII-645}}$			22.15					
	ChlaT = 0.448 - 17.5 $\Phi_{\text{PSII-645}}$ + 23.5 $\Phi_{\text{PSII-665}}$	6.91		1.96	76.6	748.08	3.01	460
$\Phi_{\text{PSII-645}}$			-18.1					
$\Phi_{\text{PSII-665}}$			23.52					

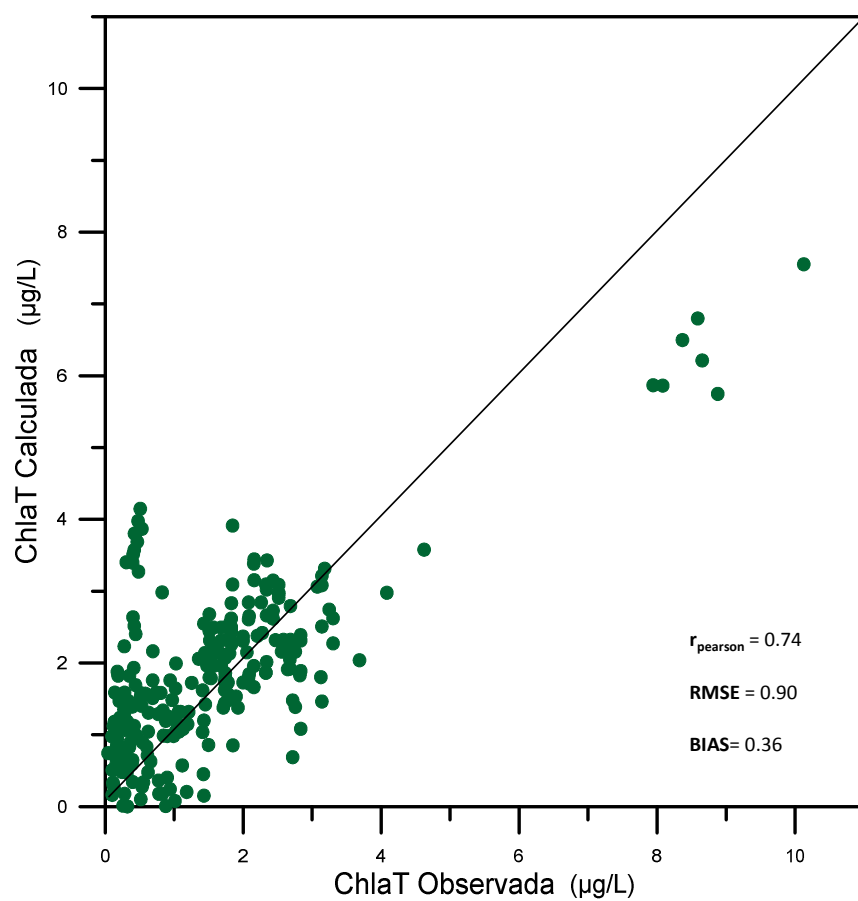


Figura. 11.- Relación entre la ChlaT observada (HPLC) y ChlaT calculada estimada a partir del modelo propuesto con dos canales ($\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$) (mg/L), $n = 232$. La línea diagonal a 450 representa la relación ideal 1:1.

Finalmente se realizó la validación de las modelaciones propuestas mediante un análisis gráfico de *Match-up* y su correspondiente valor de r_{pearson} . Los resultados del análisis *Match-up*, mostró que las modelaciones 3 y 4 presentaron el mejor ajuste a la recta 1:1, el patrón gráfico observado, fue corroborado por el r_{pearson} con valores cercanos al uno en las dos modelaciones (0.93 y 0.9, respectivamente) (Fig. 10c y 10d). Esto implica que existe una correspondencia del 93% y 90% entre las $\text{ChlaT}_{\text{Calculada}}$ y las $\text{ChlaT}_{\text{Observada}}$, respectivamente.

Las modelaciones 1 y 2 obtuvieron valores más bajos de r_{pearson} , 0.82 y 0.66 respectivamente (Fig. 10a y 10b). Santamaría-del-Ángel *et al.* (2011) consideran valores aceptables de r_{pearson} por arriba del 0.70 para un análisis de *Match-up*, lo que indica que las modelaciones 3, 4 y 1, presentan valores aceptables en las estimaciones de ChlaT. La modelación 2 presentó el ajuste más bajo con una $r_{\text{pearson}} = 0.66$ con una tendencia a sobreestimar los datos, ya que 70% de los datos se presentan por encima de la línea recta (1:1) (Fig. 10b). Es importante mencionar que todos los valores de r_{pearson} resultaron estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$), lo que significa que estas comparaciones son significativas estadísticamente.

De manera particular, los estudios que relacionan estimaciones de ChlaT con métodos de extracción (HPLC) vs estimaciones con el Phyto-PAM, presentan valores de R^2 altos por arriba del 0.95 (Murray *et al.*, 1986; Nicklisch y Köhler, 2001; Beutler *et al.*, 2003), pero la principal desventaja de estas comparaciones son el limitado número con las que han sido probadas. Jakob *et al.* (2005) utilizaron

el Phyto-PAM para estimar la concentración de Chla en condiciones de laboratorio con muestras mixtas mezclando 1:1:1 de *C. vulgaris*, *P. tricornutum* y *S. leopolensis*; ellos encontraron asociaciones lineales logarítmicas con valores de R^2 del 0.99, pero su principal desventaja fue que solo hicieron nueve comparaciones en condiciones altas de Chla (5 a 40 $\mu\text{g/L}$). En este trabajo se obtuvieron asociaciones lineales (sin transformar logarítmicamente) por arriba del 90% de R^2 para condiciones de Chla bajas. Esto demuestra que estas modelaciones son buenas estimadoras en dichas condiciones. Beutler *et al.* (2002) estimaron concentraciones de Chla en el mar Báltico con un fluorómetro de 4 longitudes de onda de excitación (4 canales) conocido comercialmente como “FluoroProbe” y modelaron la relación con la Chla calculadas por HPLC. Sus intervalos de concentración fueron muy altos, de 20 a 200 $\mu\text{g/L}$, y reportaron una buena relación entre los dos métodos bajo estas condiciones ($R^2 = 0.94$); pero su principal desventaja fue que solo compararon cinco experimentos. En este estudio se obtuvieron R^2 porcentuales mayores a 80% para condiciones que se consideraron altas, pero a diferencia del estudio de Beutler *et al.* (2002), el análisis de regresión se probó con un mayor número de datos, 593 experimentos, lo que probablemente influyo los resultados de R^2 .

Un estudio realizado alrededor de la Isla Kerguelen (Océano Antártico) durante el verano, prueba la relación del parámetro de ΦPSII con la Chla calculada con HPLC (Timmermans *et al.*, 2008). La Chla osciló entre 0.11 a 1.45 $\mu\text{g/L}$ (concentraciones de Chla bajas y medias) y obtuvieron un valor porcentual de R^2 del 53%. Los autores hacen notar que en el análisis de regresión lineal solo

utilizaron la respuesta del canal $\Phi_{PSII-470}$ (Canal “Azul”), debido a que las muestras estaban dominadas con un 95% por Dinofitas, esta análisis se realizó con un número de datos reducido ($n=17$), lo que podría estar limitando el valor de R^2 . En nuestro estudio con el análisis de regresión múltiple se obtuvo una R^2 porcentual del ~50% para condiciones de Chla medias y mayores de 90% para condiciones bajas (Tabla X) utilizando los cuatro canales como variables predictivas de la ChlaT, lo que coincide con las concentraciones medias reportadas en Timmermans *et al.* (2008), pero es mejor estimador en condiciones bajas.

Por su parte, el análisis del RMSE probó que las modelaciones 3 y 4 presentaron valores elevados (39% y 40%), respectivamente, Mignot *et al.* (2011) consideran valores aceptables de RMSE ~25% cuando se comparan métodos fluorimétricos y extractivos, lo que significa el error al estimar la ChlaT con estas modelaciones es relativamente elevado. De la misma manera, las modelaciones 1 y 2 presentaron errores aún mayores a 70%, lo que explica la tendencia de sobreestimar y subestimar observada en el análisis *Match-up* (Fig. 10a y 10b).

De acuerdo al análisis con el sesgo BIAS la modelación 3 presentó el sesgo más bajo del 17% (Fig. 10c), lo que significa, que esta modelación compensa los valores sobrestimados con los subestimados. Este resultado concuerda con lo reportado en Bastidas y Rubio (2006), donde exponen que un sesgo positivos cercano a cero muestra buen ajuste en la recta 1:1, compensando las sobreestimaciones con las subestimaciones. La modelación 1 obtuvo un sesgo positivo del 36% el segundo relativamente bajo, el cual es corroborado con lo observado en el análisis *Match-up*.

Las modelaciones 2 y 4 obtuvieron sesgos positivos muy elevados del 93% y 87%, respectivamente (Fig. 10b y 10d), estos valores representan una tendencia muy elevada de sobreestimar la ChlaT con estas modelaciones.

Así mismo, la validación de las modelaciones se logró realizar con datos de campo que provenían de diferentes condiciones de ChlaT (baja, media y alta), particularmente la estimación de ChlaT fue probada en un evento de marea roja (Barocio-León *et al.*, 2008). En este trabajo se lograron obtener 9 experimentos simultáneos de Phyto-PAM vs HPLC, los cuales oscilaron entre 6 a 12 µg/L, donde las modelaciones 1 y 3 mostraron el mejor ajuste en el análisis *Match-up* con una ligera tendencia de subestimación, esta tendencia es corroborada con los resultados del sesgo (0.36 y 0.17). Nicklisch y Köhler (2001), utilizaron el Phyto-PAM en el lago Mugeelsee (Berlín, Alemania), para estimar la Chla y la POP y reportan que cuando la concentración de Chla es elevada (>1.2 mg/L) la estimación de la Chla con el Phyto-PAM se ve afectada por fenómenos de auto-sombreado y compuestos degradados de Chla. Barocio-Leon *et al.* (2008) mencionan que el evento de marea roja, estuvo dominado por fitoplancton de gran tamaño (micro y nanoplancton) y por quistes de dinoflagelados. Estas células contribuyeron a que el espectro de absorción del fitoplancton presentara una forma inusual provocada por el efecto paquete, de la misma manera, este fenómeno pudo haber afectado la estimación del Φ_{PSII} con el Phyto-PAM y por ende la modelación de la ChlaT.

Debido a lo anterior, las estimaciones in vivo de la concentración de ChlaT en condiciones eutróficas, pueden ser menos precisas en métodos fluorimétricos, esto

coincide con lo reportado en Murray *et al.* (1986); sin embargo, los valores de R^2 de las cuatro modelaciones fueron ~80% para estas condiciones de ChlaT, lo que sugiere que el Phyto-PAM puede ser un buen estimador en dichas condiciones y representa una herramienta viable para el estudio en mareas rojas, y coincide con lo reportado con anterioridad por Timmermans *et al.* (2008).

En resumen, la modelación 3 presento los mejores valores en los estadísticos descriptivos: el valor más alto de r_{pearson} y los valores más bajos de sesgo y de RMSE. Bajo estos criterios, la modelación 4, es la siguiente mejor calificada, esta presentó un r_{pearson} de 0.91 (el segundo más alto), un RMSE de 49% (el segundo más bajo), pero un sesgo muy alto de 87% (tercero más bajo) (Tabla VIII). La modelación 1 fue calificada como la tercer mejor modelación, debido a que obtuvo un r_{pearson} de 0.82 (tercero más alto), un error muy alto de 74% y un sesgo de 36% (Tabla VIII). En contraparte, la modelación 2 presento el ajuste más bajo en los estadísticos de prueba obtuvo valor más bajo de r_{pearson} (0.66) y los valores más altos de RMSE y sesgo (0.93, 1.16, respectivamente) (Tabla VIII).

6.3. Algunas consideraciones para el uso de los parámetros de fluorescencia en la estimación de la ChlaT

La señal de fluorescencia de Chla in vivo se ha descrito como una buena estimadora de la concentración de Chla, sin embargo, hay aspectos que deben ser considerados cuando se utiliza esta aproximación. A continuación, se discutirán algunos aspectos a considerar si queremos usar el Phyto-PAM como estimador de la ChlaT.

Fuchs *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la feofitina en la respuesta de los parámetros de fluorescencia en distintas condiciones (oceánicas, costeras y en laboratorio), con ayuda de fluorímetros tipo PAM y FrrF, y reportan que la presencia de esta clorofila degradada puede reducir los valores obtenidos de los parámetros en especial del Φ_{PSII} , independientemente de la salud y del estado de adaptación a la luz de la muestra, mientras más feofitina contenga la muestras menor será el valor obtenido de Φ_{PSII} , este cambio aparente no está relacionado con los procesos foto-químicos del PSII (Fuchs *et al.*, 2002). En nuestro estudio, no se evaluó el efecto de la feofitina en los parámetros de fluorescencia, por lo que se recomienda para investigaciones futuras que la interpretación de los datos debe ser abordada tomando en cuenta este fenómeno.

Por otro lado, en mediciones con muestras provenientes de campo, el agua no solo contiene fitoplancton, sino que se compone de otras sustancias particuladas y disueltas como: la materia orgánica disuelta cromofórica (CDOM), ácidos húmicos, agentes terrígenos, y el mismo fitoplancton en descomposición, entre otros, todas estas sustancias contribuyen a la fluorescencia de la muestra

(cada una con sus particularidades), por lo tanto, si esta señal no es corregida, podríamos estar sobreestimando la señal de fluorescencia proveniente del fitoplancton.

El Phyto-PAM cuenta con una función primordial para suprimir la fluorescencia proveniente de las sustancias particuladas, llamada Zero-off (Zoff), esta función se basa en la primera lectura del Phyto-PAM, donde la muestra se filtra con un filtro de membrana de 0.2µm de poro, con el objetivo de eliminar toda material particulado (incluido el fitoplancton) y que solo quede el material disuelto en la muestra, seguido de esto, se realiza la lectura digitalmente y la respuesta de fluorescencia se almacena automáticamente en el programa en forma de 4 lecturas normalizadas con el Zoff, con cada nueva lectura el programa actualiza y guarda automáticamente los valores de Zoff, lo que le proporciona una ventaja en comparación con el resto de los fluorímetros in vivo, ya que estas correcciones de señal de fondo no son capaces de realizarse con los fluorímetros simples in vivo (Schreiber, 2004).

Otro aspecto a considerar cuando se realizan lecturas con el Phyto-PAM son los espectros de referencia de los canales de excitación. Autores como Schreiber, *et al.* (1994); Nicklisch y Köhler, (2001); Jakob *et al.* (2005); entre otros, recomiendan que para obtener mejor resultados en las estimaciones de los parámetros de fluorescencia es necesario crear particulares espectros de referencias para cada zona de estudio y condición de concentración de ChlaT-Taxocenosis. En el presente estudio se utilizaron los espectros de referencia originales, por lo que se recomienda que en futuras investigaciones realizar

espectros de referencia para cada nueva zona de estudio y evaluar comparativamente la respuesta de los parámetros de fluorescencia entre estas referencias.

Finalmente, es importante hacer notar que el presente estudio no pretende sustituir a las metodologías tradicionales para estimar la concentración de Chla y tampoco exime de realizar estimaciones de ChlaT con métodos más precisos como HPLC, sino que pretender ser una herramienta de apoyo en investigaciones donde no se obtenga un valor de ChlaT o bien apoyar en la toma de decisiones de manera relativamente rápida.

7. CONCLUSIONES

El Phyto-PAM presenta una opción viable para estimar de manera rápida la concentración de ChlaT en las tres condiciones de ChlaT probada, donde la validación de la estimación de ChlaT probó que el Phyto-PAM estima con mayor precisión en condición de concentración bajas de ChlaT.

El análisis de los coeficientes asociados a los parámetros de fluorescencia, mostro que el Φ_{PSII} fue el mejor parámetro que se asoció a la ChlaT, siendo todos los canales significativos y el R^2 de 80.5%.

La validación de las cuatro modelaciones propuestas, determino que la modelación 3 fue la que mejor estimo la concentración de ChlaT bajo las tres condiciones de ChlaT probadas, esta modelación se compone de las siguientes ecuaciones:

1.
$$ChlaT = 0.0233 - 0.519 \Phi_{PSII-470} + 0.737 \Phi_{PSII-520} + 1.77 \Phi_{PSII-645} - 1.12 \Phi_{PSII-665}$$
2.
$$ChlaT = 0.688 - 1.31 \Phi_{PSII-470} - 2.46 \Phi_{PSII-645} + 5.50 \Phi_{PSII-665}$$
3.
$$ChlaT = 1.27 - 7.65 \Phi_{PSII-470} - 21.5 \Phi_{PSII-645} + 24.9 \Phi_{PSII-665}$$

Estas se deben utilizar bajo los criterios siguientes: cuando se obtenga un RM_{FM} menor a 0.36, se aplica la primera ecuación, cuando el RM_{FM} sea entre 0.36 a 0.45, se aplica la ecuación 2 y cuando el RM_{FM} sea mayor de 0.45 se aplica la ecuación 3.

Particularmente la modelación 3 demostró ser buen estimador de la concentración de ChlaT en eventos de marea roja, lo que sugiere que el Phyto-PAM puede ser un buen estimador en dichas condiciones y representa una herramienta viable para el estudio en mareas rojas.

El análisis de la significancia de los canales probó que el considerar un modelo con dos canales ($\Phi_{\text{PSII-645}}$ y $\Phi_{\text{PSII-665}}$), no mejora la estimación de la ChlaT y sugiere que la respuesta de los Canales $\Phi_{\text{PSII-470}}$ y $\Phi_{\text{PSII-520}}$ ayuda a ajustar la precisión del cálculo de la ChlaT en las modelación que utilizan los 4 canales de excitación.

7. LITERATURA CITADA

- Almazan-Becerril A. y Garcia-Mendoza E. (2008). Maximum efficiency of charge mseparation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: A nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas*. 34(1): 29–43p.
- Barocio-Leon O., Roberto Millán-Núñez, Eduardo Santamaría-del-Ángel, Adriana Gonzalez-Silvera, Charles C. Trees, Elizabeth Orellana-Cepeda. (2008). Bio-optical characteristics of a phytoplankton bloom event off Baja California Peninsula (30–31N). *Continental Shelf Research*. 28. doi:10.1016/j.csr.2007.12.002. 672–681p.
- Barocio-Leon O.C. (2006). Variabilidad Espacial y Temporal del Coeficiente de Absorción y Pigmentos del Fitoplancton en la Corriente de California. tesis doctoral. FCM-UABC.Mx.174p.
- Bastidas M y Rodriguez-Rubio E. (2006). Validación de la concentración de clorofila a generada por el sensor modis-aqua con datos in situ en el pacífico colombiano. *Revista de la Sociedad Colombiana de Física*, ISSN-e 0120-2650, Vol. 38, N°. 2, 774-777p.

- Behrenfeld M. J, Worthington K., Sherrell R. M, Chavez F. P, Strutton P, McPhaden M & M. Shea D. (2006) Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics. *Nature* 442, 1025-1028p. doi:10.1038/nature05083.
- Beutler M, Wiltshire KH, Arp M, Kruse J, Reineke C, Moldaenke C and Hansen U-P. (2003). A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the in situ detection of cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1604: 33–46p.
- Beutler M, Wiltshire KH, Meyer B, Moldaenke C, Lüring C, Meyerhofer M, Hansen U-P and Dau H., (2002). A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth Res* 72: 39–53p.
- Bricker, T. and L. Frankel (2002). The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. *Photosynthesis Research* 72: 131-146p.
- Büchel, C. and C. Wilhelm (1993). In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochemistry and Photobiology* 58: 137-148p.
- Carpentier, R. (1997). Influence of high light intensity on photosynthesis: photoinhibition and energy dissipation. In, *Handbook of Photosynthesis* (Ed. M. Pessarakli). Marcel Dekker, Inc., New York. 443-450p.
- Cosgrave J.J. (2007). Marine phytoplankton primary production and ecophysiology using chlorophyll-a fluorescence. Thesis of doctor of philosophy MU. 231p.
- Critchley, C. (1997). The structure and function of Photosystem II. In, *Handbook of Photosynthesis* (Ed. M. Pessarakli). Marcel Dekker, Inc., New York. 231-240p.
- Desiderio, R. A., C. Moore, C. Lantz and T. J. Cowles, (1997). Multiple excitation fluorometer for in situ oceanographic applications. *Applied Optics* 36: 1289–1296p.
- Djavidnia S, Mélin F, Hoepffner N., (2006) Analysis of Multi-Sensor Global and Regional Ocean Colour Products. MERSEA - IP Marine Environment and Security for the European Area – Integrated Project Report on Deliverable D.2.3.5 European Commission - Joint Research Centre Ref: MERSEAWP02-JRC-STR-0001-01A.pdf. 228p.
- Draper, N. R. and H. Smith (1981), *Applied Regression Analysis*, John Wiley and Sons, USA. 736p.

- Estrada, M., C. Marrasé and Salat J.,(1996). In vivo fluorescence/Chlorophyll a ratio as an ecological indicator in oceanography. In, Underwater Light and Algal Photobiology (Eds. F. L. Figueroa, C. Jiménez, J. L. Pérez-Lloréns and F. X. Niell). Pp. 317-325. International Centre for Coastal Resources Research, Barcelona.
- Falkowski P., Barber R. and Smetace k.V. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science.281, 200-206p.
- Falkowski, P. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. Photosynthesis Research 39: 235-258p.
- Falkowski, P. G. and Z. S. Kolber (1993). Estimation of phytoplankton photosynthesis by active fluorescence. ICES Marine Science Symposia 197: 92-103p.
- Falkowski, P.G. and J.A Raven, (2007). Aquatic Photosynthesis. Second edition, Princeton University Press. 375p.
- Falkowski, P.G. and J.A. Raven(1997). Aquatic Photosynthesis. Massachusetts, Blackwell Science. 375p.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. and Falkowski, P., (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science 237-281p. doi:10.1126/science.281.5374.237.
- Fuchs E., Zimmerman R. C. y Jaffe Jules S. (2002). The effect of elevated levels of phaeophytin in natural water on variable fluorescence measured from phytoplankton. Journal of Plankton Research. Vol. 24-11. 1221-1229p.
- Geel C, Versluis W, Snel JFH (1997) Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow. Photosynth Res 51:61–70p.
- Geider, R., J. La Roche, R. Greene and M. Olaizola (1993b). Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate or iron limitation. Journal of Phycology 29: 755-766p.
- Greene, R., R. Geider and P. Falkowski (1991). Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. Limnology and Oceanography 36: 1772-1782p.
- Greene, R., R. Geider, Z. Kolber and P. Falkowski (1992). Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion process in eukaryotic marine algae. Plant Physiology 100: 565-575p.

- Guillard, R. R., (1975). Cultures of phytoplankton for feeding of marine invertebrates. In Smith, W. L. & M. H. Chanley, (eds), Culture of Marine Invertebrate Animals. New York, Plenum: 29–60p.
- Holm_Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holms, R.W. and Strickland, J.D.H. (1965). Fluorometric Determination of Chlorophyll. J. Cons.perm.int Explor. Mer. 30: 3-15p.
- Holm-Hansen, O., and B. Rieman. (1978). Chlorophyll a determination: improvements in methodology. Oikos, 30: 438-447p.
- Honeywill Cl., Paterson D. and Hagerthey S., (2002). Determination of microphytobenthic biomass using pulse-amplitude modulated minimum fluorescence, European Journal of Phycology, 37:4, 485-492p, DOI: 10.1017/S0967026202003888.
- Jakob, T., U. Schreiber, V. Kirchesch, U. Langner and C. Wilhelm (2005). Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. Photosynthesis Research 83: 343-361p.
- Jeffrey SW. Simon W. Wright and Zapata M. (2011). Microalgal clases and their signature pigments. En: Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy, and applications in oceanography Edit: Suzanne Roy, Carole A. Llewellyn, Einar y Skarstad Egeland. Cambridge Univ. press. 3-45p.
- Jeffrey, S.W., Mantoura R.F.C. and Wright [eds]. (1997). Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods (monographs on oceanographic methodology no. 10). UNESCO. 661p
- Kiefer D A. and Chamberlin W. S. (1989). Natural fluorescence of chlorophyll & I: Relationship to photosynthesis and chlorophyll concentration in the western South Pacific gyre. Limnol. Oceanogr., 34(5), 1989, 868-881p.
- Kolbowski, J. and U. Schreiber, (1995). Computer-controlled phytoplankton analyzer based on a 4-wavelength PAM Chl fluorometer. In Mathis, P. (ed.), Photosynthesis: From Light to Biosphere, Vol. V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London: 825–828p.
- Kooten Van, O. and J. Snel (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynthesis Research 25: 147-150p.

- Krause, G. and E. Weis (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349p.
- Kromkamp, J. and R. Forster (2003). The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology* 38: 103-113p.
- Kroon, B., Prézelin B. and Schofield. O., (1993). Chromatic regulation of quantum yields for photosystem II charge separation, oxygen evolution, and carbon fixation in *Heterocapsa pygmaea* (Pyrrophyta). *Journal of Phycology* 29: 453-462p.
- Kulandaivelu G. and Daniell H., (1980). Dichlorophenyl dimethylurea (DCMU) induced increase in chlorophyll a fluorescence intensity - An index of photosynthetic oxygen evolution in leaves, chloroplasts and algae. *Physiologia Plantarum* 48: 385-388p.
- Lewis M.R., (1992). Satellite ocean color observations of global biogeochemical cycles pages. 139-154 In: P.G. Falkowski and A.D. Woodhead (eds) *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum Press N.Y. 550 p.
- Lorenzen C.J., (1966). A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res* 13: 223–227p.
- Lorenzen, C.J., (1967). Determination of chlorophylls and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol.Oceanogr.* 12: 343–346p.
- Lüring, M. and Verschoor, A.M., (2003). F0-spectra of chlorophyll fluorescence for the determination of zooplankton grazing. *Hydrobiologia*, 491, 145–157p.
- Maxwell K. and Johnson G.N., (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51 (345): 659-668p.
- Mignot A., Claustre H., Ortenzio F.D., Xing X., Poteau A. and Ras J., (2011). From the shape of the vertical profile of in vivo fluorescence to Chlorophyll-a concentration. *Biogeosciences*, 8, 2391–2406p.
- Morel A, Bricaud A. (1981). Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Res.* 28: 1375–1393p.

- Murray A.P, Gibbs C.F. and Longmore A.R. (1986). Determination of Chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. *Marine Chemistry*. 19: 211-227p.
- Nicklisch A y Köhler J., (2001). Estimation of primary production with Phyto-PAM-fluorometry. *Ann Report Inst Freshw Ecol Inland Fish Berlin* 13: 47-60p.
- Papageorgiou, G. and Govindjee, Eds., (2004). Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*, Vol.19. Dordrecht, Springer. 818 p.
- Pielke Sr., R.A., (2002). Mesoscale meteorological modeling. 2nd Edition, Academic Press, San Diego, CA, 676 p.
- Platt T. and Sathyendranath S., (1988). Estimation of primary production for interpretation of remotely sensed data on ocean color. *Journal Geophysical Research*.98:14561-14576p.
- Rowan K. S., (1989). Photosynthetic pigments of alga. University of Cambridge print. Library of congress catalogin. USA. 226p.
- Santamaría-del-Ángel E., Millán-Núñez, A. González-Silvera y Cajal-Medran R., (2011). Comparison of In Situ and Remotely-Sensed Chl-a Concentrations: A Statistical Examination of the Match-up Approach. En: Morales, J., Stuart, V., Platt, T., Sathyendranath, S. (Eds.) (2011). *Handbook of Satellite Remote Sensing Image Interpretation: Applications for Marine Living Resources Conservation and Management*, EU PRESPO and IOCCG, Dartmouth, Canada. 241-258p.
- Schreiber U., (2004). Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC and Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Springer, Dordrecht, 279-319p.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C., (1994). Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecological Studies*.100. 49-70p.
- Schreiber, U., (1998). Chlorophyll Fluorescence: New Instruments for Special Applications. In: Garab G. Ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Wurzburg, Germany. 5: 4253-4258p.

- Schreiber, U., Hormann H., Neubauer C. and Klughammer C.,(1995c). Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 209-220p.
- Schreiber, U., Endo T., Mi H. and Asada K.,(1995b).Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* 36: 873-882p.
- Schreiber, U., Bilger W., Hormann H. and Neubauer C., (1998). Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In, *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (Ed. A. Raghavendra). Cambridge University Press. 320-335p.
- Segura-Soto Y., (2013). Grupos, Espectros de absorción y Pigmentos del Fitoplancton, durante ciclos diurnos y mareas vivas, en una estación fija en Bahía San Quintín, B.C. (junio 2006).Tesis maestría. UABC.172p.
- Timmermans K. R., Hendrik, van der Woerd J. Marcel, Wernand, Merijn Sligting, Julia Uitz, Hein J. W. de Baar. (2008). In situ and remote-sensed Chlorophyll fluorescence as indicator of the physiological state of phytoplankton near the Isles Kerguelen (Southern Ocean). *Polar Biol.* 31:617–628p. DOI 10.1007/s00300-007-0398-4
- Trees C.C., Clark D.K., Bidigare R.R, Oundrusek M.E. and Muller J.L., (2000). Accessory pigments versus chlorophyll a concentrations within the euphotic zone: A ubiquitous relationship. *Limnology and Oceanography*. 45(5): 1130-1143p.
- Trissl, H., Gao Y. and Wulf k., (1993). Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. *Biophysical Journal* 64: 974-988p.
- Valenzuela-Espinoza E., R. Millán-Núñez, C. C. Trees, E. Santamaría-del-Ángel and Núñez-Cebrero F., (2007). Growth and accessory pigments to chlorophyll a ratios of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) cultured under different irradiances. *Hidrobiológica* 17 (3): 249-255p.
- Vittadello M.; Gorbunov M.; Mastrogiovanni D.; Wielunski L.; Garfunkel E.; Guerrero E.; Kirilovsky D.; Sugiura M.; Rutherford A. W.; Safari A.; Falkowski P.G., (2010). Photoelectron Generation by Photosystem II Core Complexes Tethered to Gold Surfaces. *ChemSusChem*. Volume 3, Issue 4, 393p.

- Wright SW., Jeffry W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeta D. and Welschmeyer N., (1991). Improved HPLC method for chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: Marine Ecology Progress series. 77:183-196p.
- Yentsch, C.S., (1980). Light attenuation and phytoplankton photosynthesis. In, The Physiological Ecology of Phytoplankton, (Ed. I. Morris). University of California Press, Berkeley. 95-127p.

