

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



BIOGEOQUÍMICA DE CADMIO Y FOSFATO Y SU RELACIÓN CON EL
DINOFLAGELADO *Lingulodinium polyedrum* EN LA BAHÍA DE TODOS
SANTOS, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

T E S I S

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

ERICA GUTIÉRREZ MEJÍA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

BIOGEOQUÍMICA DE CADMIO Y FOSFATO Y SU RELACIÓN CON EL
DINOFLAGELADO *Lingulodinium. polyedrum* EN LA BAHÍA DE TODOS
SANTOS, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

T E S I S

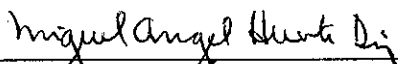
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

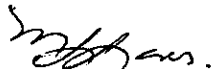
DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

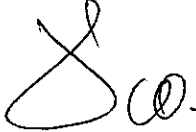
PRESENTA

ERICA GUTIÉRREZ MEJÍA

Aprobada por:


Dr. Miguel Ángel Huerta Díaz
Co-Director de tesis


Dra. María Lucila del Carmen
Lares Reyes
Co-Directora de tesis


Dr. Francisco Delgadillo
Hinojosa
Sinodal


Dra. M. del Pilar Sánchez
Saavedra
Sinodal


Dr. José Luis Peña Manjarrez
Sinodal

RESUMEN GENERAL

Los florecimientos algales de dinoflagelados (FAD) se han incrementado durante los últimos 20 años en las costas de Baja California y la especie dominante de estos florecimientos ha sido *Lingulodinium polyedrum* Stein (Dodge, 1983). En este trabajo se estudió la relación de Cd y PO_4^{3-} en la columna de agua con los florecimientos algales de este dinoflagelado, así como su capacidad para remover Cd y PO_4^{3-} del medio en cultivos de laboratorio y, se evaluó la posible transferencia de Cd hacia los sedimentos a través del material particulado producido durante los FAD. Se presenta la variabilidad espacial y temporal de las concentraciones de Cd particulado (Cd_p), Cd disuelto (Cd_d), y PO_4^{3-} en la columna de agua (a 1 m y 5 m de la superficie, y a 1-2 m del fondo) durante dos FAD de *L. polyedrum* que se presentaron en los otoños de 2011 y 2012 en la Bahía de Todos Santos (BTS). *L. polyedrum* siempre se concentró en la superficie; sin embargo, en el FAD-2011 la abundancia de células ($[10.0 \pm 8.0] \times 10^5$ células L^{-1}) fue dos veces mayor que en el FAD-2012 ($[5.0 \pm 4.4] \times 10^5$ células L^{-1}). Durante el FAD-2011 el Cd_p se incrementó significativamente (hasta 1.02 ± 0.99 nmol kg^{-1}) y se correlacionó positivamente ($r = 81$) con la abundancia de *L. polyedrum*, sugiriendo que este dinoflagelado es capaz de asimilar y concentrar Cd_d . Para los cultivos de *L. polyedrum*, se utilizaron concentraciones de Cd y PO_4^{3-} semejantes a las observadas en el FAD-2011, así como otras reportadas en la BTS durante y en ausencia de FAD. Los resultados obtenidos indicaron que *L. polyedrum* tiene la capacidad de remover Cd y PO_4^{3-} del medio sin limitar su crecimiento, alcanzando abundancias celulares similares a las de los FAD ($> 10^6$ células L^{-1}). El Cd se removió principalmente durante las primeras 24 horas de exposición, mientras el PO_4^{3-} se removió durante el tiempo del cultivo. De manera similar al Cd_p , durante los FAD en la BTS, la concentración promedio de Cd_d también se incrementó (hasta 0.71 ± 0.99 nM, FAD-2011) en los días de mayor abundancia celular. Estos incrementos de Cd_d y Cd_p se atribuyen a la asimilación y subsecuente regeneración de Cd_d , como resultado de la remineralización de la gran cantidad de material orgánico particulado producido durante el florecimiento, así como por la presencia de ligandos orgánicos que podrían mantener al Cd en solución. Durante el FAD-2011 la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ exhibió una gran variabilidad vertical y temporal en los primeros 5 m de la columna de agua (0.129 ± 0.068 a 2.08 ± 0.51 nM/ μM), pero permaneció prácticamente constante cerca del fondo (0.105 ± 0.025 a 0.190 ± 0.020 nM/ μM), sugiriendo un desacople dependiente de la profundidad entre estos dos componentes disueltos. Este desacople podría ser ocasionado no sólo por las características particulares de la bahía, sino posiblemente por la presencia de florecimientos de dinoflagelados. Debido a las diferencias en la variabilidad vertical y temporal de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-} en la columna de agua entre los dos FAD, se propone la existencia de un umbral de abundancia de 10^6 células L^{-1} de *L. polyedrum*, sugerido por el estudio de campo, en la columna de agua durante los FAD y por los resultados de los experimentos de laboratorio. Con abundancias superiores, la magnitud de los florecimientos de *L. polyedrum* produce incrementos importantes de Cd_d y Cd_p en las aguas superficiales y de PO_4^{3-} en las aguas cercanas al fondo, así como en la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$. También se presentan las concentraciones de Cd total (Cd_T), Cd asociado al HCl (Cd_{HCl}), a la pirita ($\text{Cd}_{\text{Pirita}}$) y Cd reactivo ($\text{Cd}_{\text{FR}} = \text{Cd}_{\text{HCl}} + \text{Cd}_{\text{Pirita}}$) en un núcleo de sedimento recolectado en el Puerto de Ensenada (PE) y en muestras de sedimento

superficial, recolectadas durante los FAD al norte de la BTS (N-BTS) y en el PE. Los resultados se compararon con datos generados en ausencia de florecimientos algales, durante el otoño de 2013. Si bien los sedimentos recolectados en zonas en donde se registraron altas abundancias de *L. polyedrum* en la columna de agua durante los FAD (N-BTS y PE) coincidieron con altas concentraciones de Cd_d y Cd_p en aguas superficiales, los sedimentos analizados no se encuentran enriquecidos en Cd (factor de enriquecimiento, $FE_{Cd} \leq 1$), con relación a los valores de referencia de sedimentos de la corteza terrestre. El Cd se encontró preferentemente en su forma reactiva ($\geq 60\%$) con relación al Cd_T ($< 3.4 \text{ nmol g}^{-1}$) y estuvo asociado principalmente a la fracción HCl (82 – 95% del Cd_{FR}), lo que sugiere que la removilización de Cd desde los sedimentos, por efectos de remoción, no tendría un efecto considerable sobre los organismos en las zonas del N-BTS y del PE. El grado de piritización (DOP) y el DOP del Cd (DOP-Cd) fueron relativamente bajos ($\leq 17\%$), confirmando que el Cd en general no presenta una alta afinidad por la pirita. De forma general, durante los FAD de *L. polyedrum*, se registraron las mayores concentraciones promedio de Cd en el PE, en las diferentes fracciones (en nmol g^{-1}): Cd_{HCl} (2.45 ± 0.45), Cd_{Pirita} (0.330 ± 0.012), Cd_{FR} (2.78 ± 0.44) y Cd_T (3.05 ± 0.29), así como los más altos valores de FE_{Cd} (1.04 ± 0.11), DOP ($17 \pm 1\%$) y DTMP-Cd ($12 \pm 2\%$). Estos resultados sugieren que durante los FAD posiblemente hay una transferencia de Cd desde la columna de agua hacia los sedimentos. La información generada en este trabajo es relevante para el estudio de la biogeoquímica del Cd y el PO_4^{3-} y su relación con los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum* en zonas costeras marinas.

DEDICATORIA

A mi hermosa familia, compañeros incondicionales

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dra. Lucila Lares y Dr. Miguel Ángel Huerta por su dedicación y apoyo académico incondicional durante estos cinco años. Gracias por sus buenos consejos y esfuerzos para guiarme por el mejor camino como profesional. Aprendí de las innumerables revisiones y versiones de los escritos, al final resulta emocionante. Gracias por toda la retroalimentación, me siento inmensamente agradecida.

Dr. Francisco Delgadillo, Dra. M. del Pilar Sánchez y Dr. José Luís Peña, por todas las discusiones, sugerencias y comentarios constructivos surgidos durante el desarrollo de este trabajo. A todo mi comité, por hacer de esta tesis un trabajo cada vez más enriquecedor, aprendí de ustedes, diferentes formas de pensar, a ver más allá, a explorar y sobre todo de la emocionante y gran tarea de escribir.

Agradezco a las instituciones que apoyaron esta investigación y me facilitaron sus instalaciones para los análisis: IIO (Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC) y CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada). Dra. Lucila Lares, Dra. M. del Pilar Sánchez y Dr. Helmut Maske gracias por permitirme trabajar en sus laboratorios, donde desarrollé gran parte de este trabajo.

Al grupo de investigadores del cuerpo académico que hicieron parte de esta experiencia doctoral, contribuyendo con su conocimiento y experiencias a lo largo de mi permanencia en el Posgrado. Al Dr. José Martín Hernández Ayón, resulta gratificante escuchar consejos profesionales que dan ánimo y nos impulsan a ser mejores.

A los técnicos de laboratorio, fueron parte fundamental de este trabajo: Andrea Santa Ríos, Juan Carlos Pérez, Pamela Ocampo, Arturo Siqueiros, César Almeda, infinitas gracias por su apoyo en el campo y en el laboratorio, en especial durante los últimos meses de mi embarazo, juntos lo logramos. Dra. Mary Carmen Ruiz y Dr. Ricardo Cruz su apoyo incondicional y buenos consejos resultaron enriquecedores. Ena Gámez gracias por tu amistad y apoyo.

A la UABC y al Posgrado de Oceanografía Costera por permitirme desarrollar mis estudios de doctorado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca para realizar mis estudios. Al apoyo de la SEP-CONACYT por su financiamiento proporcionado para el presente estudio bajo el proyecto No. 133420.

Por último doy gracias a mi familia en Colombia, son y serán lo más importante en mi vida, son mi gran pilar y mi ejemplo a seguir. A mi familia en Ensenada, gracias por todos estos años de compañía, a mi esposo y a mi hijo por su apoyo, comprensión y por todo el amor recibido, mis éxitos los compensaran con el tiempo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
TABLA DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
Introducción General	1
Referencias	4
Capítulo 1. Variabilidad de cadmio y fosfato durante florecimientos algales del dinoflagelado <i>Lingulodinium polyedrum</i> en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México	8
1.1. Introducción	8
1.2. Área de estudio	11
1.3. Materiales y métodos	11
1.3.1. Limpieza del material	11
1.3.2. Diseño de muestreo	13
1.3.3. Análisis de Cd y PO_4^{3-}	14
1.3.4. Abundancia de fitoplancton	15
1.3.5. Análisis estadístico	15
1.4. Resultados	16
1.4.1. Variación espacial y temporal de la abundancia de <i>L. polyedrum</i>	16
1.4.2. Variación espacial y temporal de Cd_p , Cd_d , PO_4^{3-} y $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ durante florecimientos de <i>L. polyedrum</i>	17
1.4.3. Relación entre la abundancia de <i>L. polyedrum</i> y las concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-}	20
1.5. Discusión	20
1.5.1. Efecto de los florecimientos de <i>L. polyedrum</i> en las	

concentraciones de Cd y PO_4^{3-}	20
1.5.2. $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$	24
1.6. Conclusión	29
1.7. Referencias	30
Capítulo 2. Remoción de cadmio y fosfato por <i>Lingulodinium polyedrum</i> bajo condiciones representativas del medio natural	35
2.1. Introducción	35
2.2. Materiales y métodos	37
2.2.1. Limpieza del material	37
2.2.2. Microalga seleccionada y condiciones de cultivo	37
2.2.3. Diseño experimental	39
2.2.4. Crecimiento de los cultivos de <i>L. polyedrum</i>	40
2.2.5. Remoción de Cd y PO_4^{3-}	40
2.2.6. Análisis estadístico	42
2.3. Resultados	43
2.3.1. Crecimiento de <i>L. polyedrum</i>	43
2.3.2. Remoción de Cd	44
2.3.3. pH	46
2.3.4. Remoción de PO_4^{3-}	46
2.3.5. Relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en los cultivos de <i>L. polyedrum</i>	48
2.4. Discusión	50
2.5. Conclusión	59
2.6. Referencias	60
Capítulo 3. Cadmio en sedimentos de la Bahía de Todos Santos y del Puerto de Ensenada y su relación con florecimientos algales de <i>Lingulodinium polyedrum</i>	65
3.1. Introducción	65

3.2.	Área de estudio	67
3.3.	Materiales y métodos	69
3.3.1.	Limpieza del material y preparación de soluciones	69
3.3.2.	Recolección de las muestras	69
3.3.3.	Extracción secuencial de las fracciones HCl y pirita	70
3.3.4.	DOP y DTMP	71
3.3.5.	Extracción de metales totales	71
3.3.6.	Factor de enriquecimiento	72
3.3.7.	Análisis estadístico	73
3.4.	Resultados	73
3.4.1.	Cd en las fracciones HCl, pirita y reactiva	73
3.4.2.	DOP y DTMP	76
3.4.3.	Concentración de Cd total y normalización con Al	77
3.4.4.	Factor de enriquecimiento	78
3.5.	Discusión	79
3.5.1.	Cd en las fracciones HCl, pirita y reactiva	79
3.5.2.	DOP y DTMP	82
3.5.3.	Cd total y factor de enriquecimiento	83
3.6.	Conclusión	84
3.7.	Referencias	85
	Conclusiones Generales	88
	Referencias	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1.	Intervalos, promedios o valores puntuales (en negrillas) de concentraciones superficiales de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} reportadas para el interior y exterior (Punta Banda) de la Bahía de Todos Santos (BTS), comparados con los reportados para otras áreas del Pacífico Noreste; costas de Baja California (BC) y California (CA). Las concentraciones en la etapa final de un florecimiento de <i>Lingulodinium polyedrum</i> (FAD) están marcadas con un asterisco.	10
1.2.	Análisis de control de calidad de Cd disuelto (Cd_d , $n = 5$) y particulado (Cd_p , $n = 8$) obtenidos con materiales de referencia certificados para agua de mar (CASS 5, Canadian Research Council of Canada) y plancton (BCR 414, Community Bureau of Reference). También se incluyen valores de los blancos de procedimiento y límites de detección.	15
1.3.	Porcentajes de abundancia y abundancias celulares promedio (rango en negrillas) de <i>Lingulodinium polyedrum</i> en muestras superficiales durante dos florecimientos algales de dinoflagelados (FAD-2011 y FAD-2012) y en ausencia de florecimientos (R-2013) en la Bahía de Todos Santos.	16
2.1.	Composición del medio de cultivo "L1" (Guillard y Hargraves, 1993) utilizado en los cultivos de <i>L. polyedrum</i> . Se indica la cantidad necesaria para preparar 1 L de agua de mar y la concentración final del medio.	38
2.2.	Condiciones experimentales promedio ($\pm$ una desviación estándar; $n = 3$) al inicio del experimento de remoción de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} por <i>Lingulodinium polyedrum</i> . El agua de mar con la que se preparó el medio de cultivo tenía una concentración de Cd = 0.121 ± 0.005 nM ($n = 3$). FAD = florecimiento algal del dinoflagelado <i>L. polyedrum</i> .	39
2.3.	Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar; $n = 3$) de los parámetros de las curvas de crecimiento de <i>L. polyedrum</i> , abundancia celular inicial (A_i), final (A_f), tasas de crecimiento (μ) y días en fase exponencial; así como de las variables medidas: Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} total removidos, acumulados, y tasas de remoción de Cd_d y PO_4^{3-} .	

	Tratamientos con diferentes concentraciones iniciales de Cd_d (nM) y PO_4^{3-} (μM): 0.357 y 23.1 (Medio L1), 0.690 y 0.922 (FAD-2011), 0.99 y 3.746 (Intermedio), y 1.62 y 6.18 (FAD-2005). FAD: florecimiento algal de <i>L. polyedrum</i> . Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).	44
2.4.	Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar) de las tasas de remoción de Cd y PO_4^{3-} calculadas en cultivos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> , comparadas con las reportadas para la Bahía de Todos Santos (BTS), así como en ausencia y presencia de florecimientos algales (FA) de diatomeas en el Canal de la Mancha y en una zona de surgencias en Costa Rica.	56
3.1.	Análisis de control de calidad de metales totales (Cd_T y Al_T) obtenidos con los materiales de referencia certificados para sedimento marino PACS-2 ($n = 2$) y MESS-3 ($n = 2$) del National Research Council of Canada.	72
3.2.	Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar) y rango de concentraciones (en negrillas) de Cd en las fracciones HCl (Cd_{HCl}), pirita (Cd_{Pirita}), reactiva ($Cd_{FR} = Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$) y total. Se muestran también los factores de enriquecimiento (FE), grados de piritización de Cd (DTMP-Cd) y grados de piritización (DOP) en sedimentos superficiales de la zona norte de la Bahía de Todos Santos (N-BTS) y el Puerto de Ensenada (PE). Las muestras fueron tomadas durante florecimientos algales de <i>Lingulodinium polyedrum</i> (FAD) y en su ausencia (no FAD). Se incluyen datos del núcleo del Puerto de Ensenada (PE).	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1.	Ubicación de la Bahía de Todos Santos (BTS) y de las estaciones de muestreo durante dos florecimientos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> , que se presentaron en años consecutivos (FAD-2011 y FAD-2012), y un año después en su ausencia (R-2013).	12
1.2.	Series de tiempo de promedios por día ($\pm$ un error estándar) y por evento de (a) abundancia de células de <i>Lingulodinium polyedrum</i> , (b) Cd particulado (Cd_p), (c) Cd disuelto (Cd_d), (d) PO_4^{3-} y (e) Cd_d/PO_4^{3-} durante dos florecimientos algales de dinoflagelados (FAD-2011 y FAD-2012) y en ausencia de florecimientos (R-2013) en la Bahía de Todos Santos (a 1 m y 5 m de profundidad, y a 1-2 m del fondo). La línea horizontal punteada en (a) indica la abundancia de <i>L. polyedrum</i> (10^5 células L^{-1}) por arriba de la cual se considera que hay presencia de un florecimiento y la línea discontinua indica el umbral de abundancia propuesto (10^6 células L^{-1}). La línea punteada en (e) representa la razón Cd_d/PO_4^{3-} calculada de datos superficiales reportados frente a las costas de Baja California y California (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996).	18
1.3.	Relación entre el promedio ($\pm$ un error estándar) de la concentración por día de (a,b) Cd disuelto (Cd_d), (c,d) Cd particulado (Cd_p), (e,f) PO_4^{3-} y la abundancia de células de <i>Lingulodinium polyedrum</i> en la columna de agua (a 1 m y 5 m de profundidad, y a 1-2 m del fondo) durante dos florecimientos de esta especie (FAD-2011 y FAD-2012) en la Bahía de Todos Santos. Los datos en ausencia de florecimientos (R-2013) se muestran para fines comparativos.	21
1.4.	Relación entre las concentraciones de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} durante dos florecimientos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> (a) FAD-2011 y (b) FAD-2012 en la Bahía de Todos Santos, comparados con datos superficiales (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996) reportados frente a las costas de Baja California (BC) y California (CA). La línea discontinua representa la regresión lineal para aguas superficiales costeras ($Cd_{d(costa)}$) de BC y CA, mientras que la línea punteada representa la regresión lineal para los datos de Cd_d y PO_4^{3-} a 1-2 m del fondo durante el FAD-2011. Se muestran las ecuaciones de las líneas de regresión, sus	25

	coeficientes de correlación (r), niveles de significancia (P) y números de muestras (n).	
2.1.	Curvas de crecimiento de <i>L. polyedrum</i> con diferentes concentraciones de Cd disuelto (Medio L1: 0.357 nM, FAD-2011: 0.690 nM, Intermedio: 0.99 nM y FAD-2005: 1.62 nM) y PO_4^{3-} (FAD-2011: 0.922 μM , Intermedio: 3.746 μM , FAD-2005: 6.18 μM y Medio L1: 23.1 μM) en función del tiempo. Valores promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$); FAD: florecimiento algal de <i>L. polyedrum</i> . Las letras indican diferencias significativas en la abundancia celular entre tratamientos, al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).	43
2.2.	Concentraciones promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de (a) Cd disuelto (Cd_d), y (b) Cd removido acumulado en función del tiempo, en cultivos de <i>L. polyedrum</i> expuestos a diferentes concentraciones de Cd: 0.357 nM (Medio L1), 0.690 nM (FAD-2011), 0.99 nM (Intermedio) y 1.62 nM (FAD-2005). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).	45
2.3.	Cantidad de Cd removida promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) por célula en función del tiempo, en cultivos de <i>L. polyedrum</i> expuestos a diferentes concentraciones iniciales de Cd: 0.357 nM (Medio L1), 0.690 nM (FAD-2011), 0.99 nM (Intermedio) y 1.62 nM (FAD-2005). Representado en (a) escala lineal y en (b) escala logarítmica.	46
2.4.	Concentración promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de (a) PO_4^{3-} en el medio y (b) PO_4^{3-} removido acumulado en cultivos de <i>L. polyedrum</i> expuestos a diferentes concentraciones de PO_4^{3-} : 0.922 μM (FAD-2011), 3.746 μM (Intermedio), 6.18 μM (FAD-2005) y 23.1 μM (Medio L1) en función del tiempo. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).	47
2.5.	Cantidad de PO_4^{3-} removida promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) por célula en función del tiempo, en cultivos de <i>L. polyedrum</i> expuestos a diferentes concentraciones iniciales de PO_4^{3-} : 0.922 μM (FAD-2011), 3.746 μM (Intermedio), 6.18 μM (FAD-2005) y 23.1 μM (Medio L1).	48
2.6.	Valores promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) diario de la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en función del tiempo calculada en cultivos de <i>L. polyedrum</i> expuestos a diferentes concentraciones de Cd y PO_4^{3-} , representativas de condiciones reportadas en el medio natural (FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) y utilizadas en el cultivo de microalgas (Medio-L1). La línea punteada horizontal discontinua indica la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ calculada a partir de las	49

	concentraciones superficiales de Cd_d y PO_4^{3-} reportadas para las costas de California y del Pacífico de Baja California (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996).	
2.7.	Relación entre el promedio diario ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de la razón Cd_d/PO_4^{3-} y la abundancia de células de <i>L. polyedrum</i> en tres tratamientos (FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) expuestos a diferentes concentraciones de Cd y PO_4^{3-} representativas de condiciones reportadas en el medio natural.	50
2.8.	Relación entre las concentraciones promedio diarias, de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} en (a) tratamientos expuestos a concentraciones representativas del medio natural (tratamientos FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) y, (b) datos superficiales de tres florecimientos algales de <i>L. polyedrum</i> (FAD) en la BTS (FAD de 2005; Lares et al., 2008, FAD-2011 y 2012; Gutierrez-Mejia et al., 2016), comparados con datos superficiales reportados frente a las costas de Baja California y California (Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996). La línea discontinua representa la regresión lineal obtenida para aguas superficiales en las costas de Baja California y California, y la línea continua para el tratamiento Intermedio. Se muestran las ecuaciones de las líneas de regresión, sus coeficientes de correlación (r), niveles de significancia (P) y número de muestras (n).	58
3.1.	Ubicación de las estaciones de muestreo en (a) la Bahía de Todos Santos (BTS) y (b) el Puerto de Ensenada (PE). Muestras de sedimento superficial (círculos) tomadas durante florecimientos de <i>Lingulodinium polyedrum</i> en la BTS y el PE así como en su ausencia (sólo en el PE). La ubicación del núcleo de sedimento recolectado está representado por el triángulo.	68
3.2.	Perfiles verticales de las concentraciones de Cd asociado a las fracciones (a) HCl (Cd_{HCl}) y reactiva ($Cd_{FR} = Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$) y a la fracción (b) pirita (Cd_{Pirita}) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.	75
3.3.	Relación entre la concentración de Cd en la fracción (a) HCl (Cd_{HCl}) y (b) pirita (Cd_{Pirita}) con la profundidad en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.	75
3.4.	Perfiles verticales de las concentraciones de Fe asociado a las fracciones (a) HCl (Fe_{HCl}) y pirita (Fe_{Pirita}) y (b) fracción reactiva	76

($Fe_{FR} = Fe_{HCl} + Fe_{pirita}$) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.

- 3.5. Perfiles verticales del (a) grado de piritización (DOP) y, (b) grado de piritización de metal traza para el Cd (DTMP-Cd) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada. 77
- 3.6. Perfiles verticales de la (a) concentración de Cd total (Cd_T) y, (b) razón molar Cd_T/Al_T para el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada. La línea discontinua en (b) indica la razón $(Cd_T/Al_T)_{corteza}$ calculada a partir de los datos de Turekian y Wedepohl (1961) y Li y Schoonmaker (2005). 78
- 3.7. Factores de enriquecimiento de Cd ($FE_{Cd} = [Cd_T/Al_T]_{muestra}/[Cd_T/Al_T]_{corteza}$) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada. La razón Cd_T/Al_T en la corteza terrestre fue calculada a partir de los datos de Turekian y Wedepohl (1961) y Li y Schoonmaker (2005). 79

Introducción General

Los florecimientos algales (FA), en especial los de dinoflagelados, se han incrementado durante los últimos 20 años en las costas Baja California y California. En estas costas y en particular en la Bahía de Todos Santos (BTS), los FA generalmente se presentan durante primavera y verano, siendo la especie dominante el dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* en la columna de agua (Knauer y Martin, 1973; Kudela y Cochland, 2000; Peña-Manjarrez et al., 2005; Shipe et al., 2008), reflejándose en altas abundancias de quistes de reposo en los sedimentos (Peña-Manjarrez et al., 2001, 2005, 2009). Florecimientos de esta especie también se han reportado en otras partes del mundo, como Columbia Británica (Mudie et al., 2002), Marruecos (Bennouna et al., 2002), Noruega (Sætre et al., 1997) y Costa Rica (Morales Ramírez et al., 2001).

El ciclo de vida de *L. polyedrum* comprende una fase planctónica (célula vegetativa móvil) y una fase bentónica (periodo de latencia). Al igual que otros dinoflagelados, *L. polyedrum* produce quistes de reposo, los cuales se acumulan en el sedimento, en donde pueden permanecer durante un tiempo relativamente largo (vida media de 2-10 años, viables hasta por 20 años; Persson y Smith, 2009), hasta que se presentan las condiciones ambientales propicias para desarrollarse nuevamente. En la BTS, los florecimientos de *L. polyedrum* se han incrementado en extensión y frecuencia y su desarrollo está asociado a incrementos en irradiancia, periodos de luz, temperaturas entre 17 y 23 °C, estratificación de la columna de agua, y formación de una termoclina superficial estacional (Peña-Manjarrez et al., 2005, 2009). Los estudios realizados sobre la distribución de Cd en la BTS indican que su principal fuente son las aguas de surgencia, por lo que las mayores concentraciones de este elemento encontradas en algunos estudios realizados en agua y sedimento superficial, se han atribuido a enriquecimientos de tipo natural (Romero-Vargas-Márquez, 1995; Sandoval-Salazar, 1999; Lares et al., 2008; Salamanca-Quevedo, 2013; Delgadillo-Hinojosa et al., 2015), a la resuspensión del sedimento por efectos de dragado (Mandujano-Velasco, 2007) y, en menor grado, a descargas de contaminantes (Muñoz-Arriola, 1994).

Se conoce poco sobre el comportamiento de metales traza durante los FA, los cuales se han enfocado principalmente al Fe por su papel como elemento limitante (Wells et al., 1991; Hutchins et al., 1998) y como inductor en la formación de ácido domóico por diatomeas (Trick et al., 2010), junto con otros elementos (Cu y Ni; Kudela et al., 2010). Otros trabajos se han enfocado a estudiar los efectos de los FA en el ciclo de los nutrientes y otros metales traza; sin embargo, han sido estudios realizados con diatomeas, en los que se reportan disminuciones en las concentraciones de algunos metales disueltos y nutrientes: Cd, Ni, Zn, PO_4^{3-} (Luoma et al., 1998), Mn, Co, Zn, Ni, Pb, NO_3^- , NO_2^- (Luengen et al., 2007), Cd, PO_4^{3-} y NO_3^- (Kudo y Matsunaga, 1998). En el caso de los florecimientos algales de dinoflagelados (FAD), los trabajos en relación al comportamiento de metales traza y nutrientes es limitado. En estudios de campo y

laboratorio se ha reportado que existen diferencias significativas en la composición elemental entre los diferentes grupos fitoplanctónicos e incluso entre especies; estas diferencias están relacionadas con la fisiología que produce cambios en su composición química (Ho et al., 2003). Por ejemplo, algunas especies de dinoflagelados tienen altas concentraciones de Cu, Co y Mo en comparación con otras especies de fitoplancton (Ho et al., 2003), mientras que algunas diatomeas están enriquecidas en Ni, Mn y Zn en comparación con los dinoflagelados (Twining et al., 2004). En estos estudios se indica que la relación Cd:P en el fitoplancton puede variar hasta por dos órdenes de magnitud, mientras que para otros elementos (Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo) esta relación puede variar hasta 20 veces (Ho et al., 2003). Quigg et al. (2003) reportaron altas razones Cd-Co-Mo:P y bajas razones de Fe-Mn-Cu:P en dinoflagelados con clorofila *a* (como *L. polyedrum*) en comparación con otras especies de fitoplancton. El estudio de Lares et al. (2008) reportó concentraciones de metales disueltos (Ag, Cd, Co, Cu, Ni y Zn) y nutrientes (PO_4^{3-} , NO_3^- , H_4SiO_4) en la BTS al final de un FAD *L. polyedrum* que duró seis meses, uno de los más largos desde el primer reporte en la BTS realizado en el 2000 (Peña-Manjarrez et al., 2005). De los metales y nutrientes analizados por Lares et al. (2008), únicamente Cd y PO_4^{3-} presentaron altas concentraciones, alcanzando valores promedio de 1.38 ± 0.72 nM y 1.4 ± 1.2 μM , respectivamente (máximo de 2.15 nM y 5.11 μM , respectivamente). Estos valores son casi un orden de magnitud y cuatro veces, respectivamente, mayores que las concentraciones reportadas en la BTS en ausencia de FAD (Cd_d : 0.05 – 0.50 nM; PO_4^{3-} : 0.3 – 1.1 μM ; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1996; Lares y Marinone, 2009; Mendoza-Lavaniegos, 2010; Salamanca-Quevedo, 2013; Delgadillo-Hinojosa et al., 2015).

El Cd no es un elemento esencial para los organismos marinos, aunque sus concentraciones están controladas por la actividad biológica del fitoplancton, como lo demuestra su comportamiento tipo nutriente y su fuerte correlación con el PO_4^{3-} (Bruland et al., 1991). De esta manera, el Cd es removido junto con el PO_4^{3-} en la zona fótica (Noriki et al., 1985) y, posteriormente, es liberado durante los procesos de oxidación de la materia orgánica en su trayecto hacia el fondo del mar (Sunda, 2012). Las altas concentraciones de Cd y PO_4^{3-} observadas por Lares et al. (2008) sugieren que *L. polyedrum* podría tener una alta capacidad de asimilación de estas dos especies disueltas, seguido de su subsecuente liberación por la remineralización de la gran cantidad de materia orgánica producida durante el FAD (Lares y Marinone, 2009). Una vez que los metales son removidos del agua de mar y son incorporados a las partículas biogénicas, van a ser transportados a través de la columna de agua y, eventualmente, hacia los sedimentos (Blake et al., 2004). Dentro de estas partículas biogénicas que son transportadas al sedimento se encuentran también los quistes de dinoflagelados, particularmente abundantes durante los FAD (Peña-Manjarrez et al., 2001). Si las células de *L. polyedrum* (principal componente del material particulado durante los

FAD) y los quistes, se encontraran enriquecidos en algunos elementos (e.g., Cd), podría darse un transporte neto de metales a los sedimentos, en donde podrían ser enterrados y preservados o liberados nuevamente a la columna de agua. Un antecedente de que los dinoflagelados pueden incorporar y transportar una mayor cantidad de metales en comparación a otras especies y, en especial Cd, se presenta en un estudio realizado durante florecimientos algales de diatomeas y dinoflagelados en la Bahía Funka (Japón, Noriki et al., 1985). Estos autores encontraron que el Cd fue el elemento que se incorporó en mayor grado a las células, reportando incrementos en las concentraciones de Cd en el material particulado a 1 m de profundidad durante el florecimiento de diatomeas (promedio 350 ppb = 3.11 nmol g^{-1}) y los más altos valores cuando predominaron los dinoflagelados (promedio 1,425 ppb = $12.68 \text{ nmol g}^{-1}$). García-Hernández et al. (2005) reportaron altas concentraciones de Cd en los sedimentos ($4.0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} = 36 \text{ nmol g}^{-1}$) durante un FA nocivo de varias especies de dinoflagelados en la Bahía Kun Kaak (Sonora), con valores seis veces mayores que los reportados para una zona cercana no afectada por el FA y que fue considerada como referencia ($0.62 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} = 5.5 \text{ nmol g}^{-1}$). Con base en estos antecedentes, se propuso estudiar la relación entre Cd, PO_4^{3-} , y los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum* en la columna de agua, la capacidad de remoción de estas dos especies disueltas en condiciones de experimentación en laboratorio, y la posible transferencia de Cd hacia los sedimentos durante los FAD.

El primer capítulo tuvo como objetivo estudiar la influencia de los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum* sobre la variabilidad espacial y temporal de Cd y PO_4^{3-} en la BTS. En este capítulo se presentan series de tiempo de 30 a 40 días de duración de la concentración de Cd disuelto (Cd_d), Cd particulado (Cd_p) y PO_4^{3-} , así como de las relaciones $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ asociadas con la ocurrencia de dos florecimientos algales de *L. polyedrum* que se presentaron en los otoños de 2011 y 2012. Finalmente se comparan con datos en ausencia de florecimientos en el otoño de 2013. Se discute la relación de la abundancia de células de *L. polyedrum* con las concentraciones de Cd, así como los incrementos en las concentraciones de Cd_d y Cd_p en aguas superficiales y de PO_4^{3-} principalmente en aguas cercanas al fondo. Con estos resultados se sugiere que el comportamiento del Cd y PO_4^{3-} en la BTS es bastante complejo, por una parte por las características específicas de la bahía, como son: morfología de la costa, baja profundidad (entre 10 y 50 m), patrones de circulación superficial (Mateos et al., 2009), comportamiento como centro de retención (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015) y, finalmente, por la presencia e intensidad de los florecimientos algales, especialmente durante florecimientos densos de *L. polyedrum* ($> 10^6 \text{ células L}^{-1}$).

El objetivo del segundo capítulo fue conocer la capacidad de remoción de Cd y PO_4^{3-} por el dinoflagelado *L. polyedrum* bajo condiciones de laboratorio y representativas del medio natural. Con base en el objetivo planteado, se presentan los resultados

obtenidos de tres tratamientos en cultivos batch donde las células fueron expuestas a concentraciones de Cd y PO_4^{3-} similares a las reportadas en la BTS durante el desarrollo de florecimientos algales de *L. polyedrum* y un cuarto tratamiento con concentraciones similares a las utilizadas en el cultivo de dinoflagelados. Con los resultados de este capítulo, se comprobó que, a pesar de las concentraciones de Cd y PO_4^{3-} disponibles en el medio, *L. polyedrum* tiene la capacidad de remover Cd y PO_4^{3-} sin limitar su crecimiento, alcanzando abundancias similares a las reportadas durante FAD en la BTS. En el tratamiento FAD-2005 en donde *L. polyedrum* fue expuesto a altas concentraciones de Cd y PO_4^{3-} (1.62 ± 0.18 nM y 6.18 ± 0.16 μM , respectivamente) fue donde se dio la mayor remoción, donde las células tuvieron la mayor tasa de crecimiento (μ), y alcanzaron la más alta abundancia celular (similar al FAD-2011 en la BTS). Estos resultados son un avance en el conocimiento del ciclo del Cd y el PO_4^{3-} en las zonas costeras marinas.

Por último, con el objetivo de identificar si los florecimientos de *L. polyedrum* podrían estar asociados con la transferencia de Cd hacia el sedimento; en el tercer capítulo se reportan las concentraciones de Cd en los sedimentos, durante y en ausencia de FAD en los lugares en donde se registraron las mayores abundancias de células de *L. polyedrum* en los FAD de 2011 y 2012 (zona norte de la BTS y Puerto de Ensenada). Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren una posible transferencia de Cd hacia los sedimentos estudiados durante los FAD, pero no indican un enriquecimiento en Cd y, en general, sugieren una disminución de las concentraciones reportadas en años anteriores. A pesar de que el Cd asociado a la fracción reactiva (Cd_{FR} , biodisponible) representó más del 60% del Cd total (Cd_{T}), las bajas concentraciones de Cd_{FR} (1.18 a 3.09 nmol g^{-1}), comparadas con los valores reportados en sedimentos anóxicos de otras zonas de estudio (~ 4.0 a 30 nmol g^{-1} ; Huerta-Díaz y Morse, 1992; Nava-López y Huerta-Díaz, 2001; Huerta-Díaz et al., 2011), sugieren que en el PE la contribución relativa de Cd biodisponible sería relativamente baja.

Referencias

- Bennouna, A., B. Berland, J. El Attar, O. Assobhei. 2002. *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge red tide in shellfish areas along Doukkala coast (Moroccan Atlantic). *Oceanol. Acta* 25: 159-170.
- Blake, A.C., Chadwick, D.B., Zirino, A., Rivera-Duarte, I. 2004. Spatial and temporal variations in copper speciation in San Diego Bay. *Estuaries* 27: 437-447.
- Bruland, K.W., Donat, J.R., Hutchins, D.A., 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* 36: 1555-1577.
- Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Díaz, M.A., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S.G., Segovia, J.A., Peña-Manjarrez, J.L.,

- García-Mendoza, E., Castro, R. 2015. Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO₄ ratio in Todos Santos Bay: a retention site of upwelled waters in the Baja California península, México. *Mar. Chem.* 168: 37-48.
- García-Hernández, J., García-Rico, L., Jara-Marini, M.E., Barraza-Guardado, R., Hudson Weaver, A. 2005. Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 733-739.
- Huerta-Diaz, M.A., Morse, J.W. 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56: 2681-2702.
- Huerta-Diaz M.A., Delgadillo-Hinojosa F., Otero X.L., Hernández-Ayón J.M., Segovia-Zavala J.A., Galindo-Bect, M.S., Amaro-Franco E. 2011. Iron and trace metals in microbial mats and underlying sediments: results from Guerrero Negro saltern, Baja California Sur, México. *Aquat. Geochem.* 17: 603-628.
- Hutchins, D., DiTullio, G., Zhang, Y., Bruland, K., 1998. An iron limitation mosaic in the California upwelling regime. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1037-1054.
- Ho, T.Y., Quigg, A., Finkel, Z.V., Milligan, A.J., Wyman, K., Falkowski, P.G., Morel, F.M.M., 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. *J. Phycol.* 39: 1145-1159.
- Knauer, G.A., Martin, J.H., 1973. Seasonal variations of cadmium, copper, manganese, lead, and zinc in water and phytoplankton in Monterey Bay, California. *Limnol. Oceanogr.* 18: 597-604.
- Kudela R.M., Cochlan, W.P. 2000. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off southern California. *Aquat. Microb. Ecol.* 21: 31-47.
- Kudela, R., Seeyave, S., Cochlan, W.P. 2010. The role of nutrient in regulation and promotion of harmful algal blooms in upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 55: 122-135.
- Kudo, I., Matsunaga, K., 1998. Behavior of Cu, Ni and Cd during nutrient depletion in a spring bloom in Funka Bay. *J. Oceanogr.* 54: 619-627.
- Lares, M.L., Marinone, S.G., Rivera-Duarte, I., Beck, A., Sañudo-Wilhelmy, S. 2008. Spatial variability of trace metals and inorganic nutrients in surface waters of Todos Santos Bay, México in summer of 2006 during a red tide bloom. *Arch. Environ. Con. Tox.* 56: 707-716.
- Lares, M.L., Marinone, S.G., 2009. Comparison of cadmium and phosphate concentrations during red tide versus no red tide conditions. *J. Coastal Res.* 56: 832-835.
- Luengen, A.C., Raimondi, P.T., Flegal, A.R. 2007. Contrasting biogeochemistry of six trace metals during the rise and decay of a spring phytoplankton bloom in San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.* 52: 1112-1130.
- Luoma, S.N., van Geen, A., Lee, B.G., Cloern, J.E. 1998. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in South San Francisco Bay: Implications for metal cycling in estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1007-1016.
- Mandujano-Velasco, M.R. 2007. Distribución espacial y enriquecimiento de metales pesados en sedimento superficial de la Bahía de Todos Santos, B.C., México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México. 64 p.

- Mateos, E., S.G., Marinone, A., Pares-Sierra. 2009. Towards the numerical simulation of the summer circulation in Todos Santos bay, Ensenada, B.C. Mexico. *Ocean Model* 27: 107-112.
- Mendoza-Lavaniegos, V. 2010. Variabilidad espacio-temporal de cobre y cadmio en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, en el período verano 2001 – primavera 2002. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 74 p.
- Morales-Ramírez, A., R. Viquez, K. Rodríguez y M. Vargas-Montero. 2001. Marea roja producida por *Lingulodinium polyedrum* (Peridinales, Dinophyceae) en Bahía Culebra, Golfo de Papagayo, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 49: 19-23.
- Mudie, P.J., A.E. Rochon y E. Levac. 2002. Palynological records of red tide-producing species in Canada: past trends and implications for the future. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 180: 159-186.
- Muñoz-Arriola, F. 1994. Variabilidad de Cd, Cu y Pb en los aportes de aguas residuales del arroyo El Gallo a la Bahía de Todos Santos durante el periodo mayo-diciembre de 1991. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México. 69 p.
- Noriki, S., Ishimori, N., Harada, K., Tsunogai, S. 1985. Removal of trace metals from seawater during a phytoplankton bloom as study with sediment traps in Funka Bay, Japan. *Mar. Chem.* 17: 75-89.
- Nava-López, C., Huerta-Díaz, M.A. 2001. Degree of trace metal pyritization in sediments from the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Rev. Cienc. Mar.* 27: 289-309.
- Peña-Manjarrez, J.L, Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., Orellana-Cepeda, E., 2001. Cysts of *Lingulodinium polyedrum*, red tide producing organism in the Todos Santos Bay (winter-spring, 2000). *Cienc. Mar.* 27: 543-558.
- Peña-Manjarrez, J. L., Helenes, J., Gaxiola, G. Orellana, E., 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay. *Cont. Shelf Res.* 25: 1375-1393.
- Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Environmental factors influencing the variability of *Lingulodinium polyedrum* and *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) cyst production. *Cienc. Mar.* 35: 1-14.
- Persson, A., Smith, B.C. 2009. Consumption of *Scrippsiella lachrymosa* resting cysts by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Shellfish Res.* 28: 221-225.
- Quigg, A., Finkel, Z.V., Irwin, A.J., Rosenthal, Y., Tung-Yuan, H., Reinfelder, J.R., Schofield, O.E., Morel, F.M.M., Falfowski, P.G. 2003. The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton. *Nature* 425: 290-294.
- Romero-Vargas-Márquez, I.P. 1995 Metales pesados y sus fracciones químicas en sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México. 86 p.
- Sætre, M.L.L., Dale, B., Abdullah, M.I. Sætre, G.P. 1997. Dinoflagellate cysts as possible indicators of industrial pollution in a Norwegian fjord. *Mar. Environ. Res.* 44: 167-189.
- Salamanca-Quevedo, E. 2013. Distribución y variabilidad temporal de cadmio en la Bahía de Todos Santos: una región influenciada por la corriente de California y el fenómeno de surgencias. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México, 89 p.

- Sandoval-Salazar, G. 1999. Metales pesados en sedimentos superficiales de la cuenca de las californias: frontera México-E.U.A. a Bahía Todos Santos, Ensenada, Baja California, México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México. 55 p.
- Sañudo-Wilhelmy, S., Flegal, A.R. 1996. Trace metal concentrations in the surf zone and in coastal waters off Baja California, México. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1575-1580.
- Shipe, R.F., Leinweber, A., Gruber, N., 2008. Abiotic controls of potentially harmful algal blooms in Santa Monica Bay, California. *Cont. Shelf Res.* 28: 2584-2593.
- Sunda, W. 2012. Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* 3: 204.
- Trick, C.G., Bill, B.D., Cochlan, W.P., Wells, M.L., Trainer, V.L., Pickell, L.D. 2010. Iron enrichment stimulates toxic diatom production in High Nitrate Low Chlorophyll areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 5887-5892.
- Twining, B.S., Baines, S.B., Fisher, N.S., 2004. Element stoichiometries of individual plankton cells collected during the Southern Ocean iron experiment (SOFEX). *Limnol. Oceanogr.* 49: 2115-2128.
- Wells, M.L., Mayer, L.M., Gillard, R.R.L., 1991. Evaluation of iron as a triggering factor for red tide blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69: 93-102.

Capítulo 1. Variabilidad de cadmio y fosfato durante florecimientos algales del dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México

1.1. Introducción

La frecuencia de eventos de florecimientos algales (FA) en las zonas costeras ha aumentado durante los últimos 20 años. En las costas de Baja California y sur de California, el dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (Stein, 1883) Dodge 1989 ha sido la especie dominante de estos florecimientos (Knauer y Martin, 1973; Kudela y Cochlan, 2000; Peña-Manjarrez et al., 2005; Shipe et al., 2008; Ruiz-de la Torre et al., 2013). Los florecimientos costeros de dinoflagelados se encuentran generalmente restringidos a periodos de aguas cálidas y bajo estrés del viento, cuando prevalece la estratificación térmica (Ryan et al., 2008) y patrones de circulación retentiva que favorecen la agregación las células (Pitcher et al., 2010). Existe evidencia de que las aguas enriquecidas en nutrientes pueden estimular los FAD, pero en general no se considera que una alta concentración de nutrientes sea requerida para su desarrollo (Glibert et al., 2008) debido a su capacidad de migrar a aguas más profundas para obtener los nutrientes (Ryan et al., 2008). En el caso de *L. polyedrum*, Shipe et al. (2008) mencionan que es una especie que florece bajo condiciones de bajos nutrientes.

En la Bahía de Todos Santos (BTS) los florecimientos de *L. polyedrum* generalmente se presentan a finales de primavera e inicio de verano (junio-julio) y su aparición está asociada a cambios en las condiciones ambientales; como incrementos en irradiancia, períodos de luz, temperaturas superficiales entre 17 y 23 °C, estratificación de la columna de agua y formación de una termoclina superficial estacional (Peña-Manjarrez et al., 2005, 2009). Se ha reportado que en la BTS estos FAD se mantienen por la convergencia de corrientes superficiales y por el viento, que induce el transporte de las células que se concentran en la superficie hacia la costa (Ruiz-de la Torre et al., 2013). Se sabe que el fitoplancton juega un papel importante en el reciclamiento de algunos metales (en especial los esenciales), por lo que cambios en la biomasa fitoplanctónica, como sería el caso de los FAD, podrían afectar el ciclo de estos metales.

Los estudios sobre metales relacionados con FA se han enfocado principalmente al Fe debido a su papel como agente limitante (Wells et al., 1991; Hutchins et al., 1998) y como inductor de la producción de ácido domóico por diatomeas (Trick et al., 2010), junto con otros metales (Cu y Ni; Kudela et al., 2010). Pocos estudios se han enfocado a estudiar los efectos de los FA en el ciclo de los nutrientes y metales traza; sin embargo, estudios realizados con diatomeas reportan una disminución en las concentraciones de algunos metales disueltos. Por ejemplo, en la Bahía de San Francisco (EUA) durante un FA de diatomeas se reportaron disminuciones de Cd, Ni,

Zn (Luoma et al., 1998), Mn, Co, Zn, Ni y Pb (Luengen et al., 2007), además de la reducción en los niveles de nutrientes. Kudo y Matsunaga (1998) también observaron una disminución de Cd y PO_4^{3-} durante un FA de diatomeas en la Bahía Funka (Japón). Sin embargo, para el caso de los florecimientos de dinoflagelados, no existen trabajos publicados que relacionen el comportamiento de los metales y nutrientes, excepto el de Lares et al. (2008), quienes reportaron concentraciones, tanto de metales disueltos (Ag, Cd, Co, Cu, Ni y Zn) como de nutrientes (PO_4^{3-} , NO_3^- , H_4SiO_4), relacionados con un FAD de *L. polyedrum*. Este estudio fue realizado en la BTS al final de un FAD que duró seis meses, el más prolongado desde el primer registro en la BTS (Peña-Manjarrez et al., 2005). De los metales y nutrientes analizados por Lares et al. (2008) sólo el Cd (1.38 ± 0.72 nM) y el PO_4^{3-} (1.4 ± 1.2 μM) presentaron altas concentraciones, alcanzando valores máximos de 2.15 nM y 5.11 μM , respectivamente. Estos valores son casi un orden de magnitud y cuatro veces, respectivamente, mayores que las concentraciones reportadas en la BTS en ausencia de FA (Cd: 0.05 – 0.50 nM; PO_4^{3-} : 0.3 – 1.1 μM ; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1996; Lares y Marinone, 2009; Mendoza-Lavaniegos, 2010; Salamanca-Quevedo, 2013; Delgadillo et al. 2015; Tabla 1.1). Se ha reportado que una vez que el agua ingresa a la bahía, hay un proceso de añejamiento que conlleva una disminución en las concentraciones de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} debido al consumo por el fitoplancton (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015). Finalmente y como resultado de este proceso, las concentraciones en el interior llegan a ser menores (promedios de 0.15 ± 0.02 nM y 0.51 ± 0.03 μM , respectivamente) que en el exterior (promedios de 0.30 ± 0.04 nM y 0.97 ± 0.06 μM , respectivamente).

El Cd no es un elemento esencial para los organismos marinos, aunque sus concentraciones están controladas por la actividad biológica del fitoplancton, como lo demuestra su comportamiento tipo nutriente y su fuerte correlación con el PO_4^{3-} (Bruland et al., 1991). De esta manera, el Cd es removido junto con el PO_4^{3-} en la zona fótica (Noriki et al., 1985) y posteriormente es liberado durante los procesos de oxidación de la materia orgánica en su trayecto hacia el fondo del mar (Sunda, 2012). Las altas concentraciones de Cd y PO_4^{3-} observadas por Lares et al. (2008) sugieren que *L. polyedrum* podría tener una alta capacidad de asimilación de estas dos especies disueltas, seguido de su subsecuente liberación al final del florecimiento debido a la remineralización de la gran cantidad de materia orgánica producida por el FAD (Lares y Marinone, 2009). El objetivo de este capítulo fue estudiar la influencia de los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum* sobre la variabilidad espacial y temporal de Cd y PO_4^{3-} en la BTS. Se presentan series de tiempo de 30 a 40 días de duración de la concentración de Cd disuelto (Cd_d), Cd particulado (Cd_p) y PO_4^{3-} , así como de la relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ asociadas con la ocurrencia de dos florecimientos algales de *L. polyedrum* que se presentaron en los otoños de 2011 y 2012; estos datos fueron comparados con las mismas variables medidas en ausencia de florecimientos en el otoño de 2013. La BTS representa una zona muy adecuada para el estudio de la

relación entre los metales traza y los FA, en especial los de *L. polyedrum*, ya que se han incrementado considerablemente en frecuencia y extensión durante los últimos 20 años (Peña-Manjarrez et al., 2001, 2009). Por otra parte, las más altas concentraciones de Cd en las costas de Baja California y California se reportaron en la BTS en el 2005 que coincidió con la etapa final de un florecimiento de *L. polyedrum* (Lares et al., 2008).

Tabla 1.1. Intervalos, promedios o valores puntuales (en negrillas) de concentraciones superficiales de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} reportadas para el interior y exterior (Punta Banda) de la Bahía de Todos Santos (BTS), comparados con los reportados para otras áreas del Pacífico Noreste; costas de Baja California (BC) y California (CA). Las concentraciones en la etapa final de un florecimiento de *Lingulodinium polyedrum* (FAD) están marcadas con un asterisco.

Cd_d (nM)	PO_4^{3-} (μM)	Área de estudio	Referencias
0.41 ± 0.26 0.147 – 0.916	0.37 ± 0.22 0.095 – 0.954	BTS	FAD 2011, este estudio
0.170 ± 0.047 0.123 – 0.350	0.72 ± 0.30 0.283 – 1.379	BTS	FAD 2012, este estudio
0.129 ± 0.058 0.079 – 0.192	0.631 ± 0.009 0.620 – 0.637	BTS	No FAD, este estudio
0.15 ± 0.018	0.51 ± 0.034	BTS	Delgadillo-Hinojosa et al. (2015)
0.05 – 0.23	0.34 – 1.11	BTS	Salamanca-Quevedo (2013)
0.049 – 0.488	---	BTS	Mendoza-Lavaniegos (2010)
---	0.83	BTS	Peña-Manjarrez et al. (2009)
0.35 ± 0.19	0.45 ± 0.17	BTS	Lares y Marinone (2009)
1.38 ± 0.72*	1.4 ± 1.2*	BTS	Lares et al. (2008)
---	0.5 – 0.7	BTS	Espinosa-Carreón et al. (2001)
0.10 y 0.16	0.53 y 0.94	BTS	Sañudo-Wilhelmy y Flegal (1996)
0.30 ± 0.036	0.97 ± 0.061	Punta Banda	Delgadillo-Hinojosa et al. (2015)
0.13 – 0.68	0.55 – 1.72	Punta Banda	Salamanca-Quevedo (2013)
0.17 – 0.069	---	Punta Banda	Mendoza-Lavaniegos (2010)
0.1 – 0.9	0.3 – 1.5	Punta Banda	Takesue et al. (2004)
0.15	0.52	Punta Banda	Sañudo-Wilhelmy y Flegal (1991)
---	0.35 – 1.25	Punta Banda	González-Morales y Gaxiola Castro (1991)
0.03 – 0.17	0.25 – 0.75	Costa de BC	Segovia-Zavala et al. (1998)
0.1 – 0.26	0.43 – 1.9	Costa de BC	Sañudo-Wilhelmy y Flegal (1996)
0.1 – 0.8	0.5 – 2.5	Corriente de CA	Van Geen y Husby (1996)
0.425 – 0.716	---	Costa de CA	Biller y Bruland (2013)
0.193 – 0.897	0.10 – 2.35	San Francisco	Van Geen y Luoma (1993)
0.002 – 0.16	0.01 – 0.60	Pacífico Noreste	Bruland (1980)
0.039 – 0.205	0.21 – 0.78	Pacífico Noreste	Bruland et al. (1978)

1.2. Área de estudio

La Bahía de Todos Santos se ubica en el noroeste de la Península de Baja California, aproximadamente a 110 km al sur de la frontera México-Estados Unidos (Figura 1.1). La bahía tiene un área de aproximadamente 250 km² y se comunica directamente con el océano Pacífico por medio de dos entradas: una al norte, entre Punta San Miguel y las Islas de Todos Santos, y la otra al sur, entre Punta Banda y las Islas. La profundidad varía entre 10 y 50 m desde la entrada norte a la costa, con una profundidad máxima de 300 m en el cañón submarino localizado en la entrada sur (Argote-Espinosa et al., 1991). A lo largo del año, el agua de la bahía presenta una temperatura superficial entre 12.7 y 22.8 °C, con los valores más elevados durante el verano (Cruz-Colín, 1997; Peña-Manjarrez et al., 2009). Sin embargo, existe una diferencia entre las temperaturas promedio dentro (17.74 ± 0.42 °C) y fuera (14.67 ± 0.52 °C) de la BTS, indicando su naturaleza retentiva, una característica que podría afectar la distribución espacial y la variación temporal de la concentración de los metales traza y los nutrientes (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015). Durante primavera y verano se presentan con mayor intensidad eventos de surgencia en el exterior de la bahía; eventualmente, esta agua subsuperficial fría y rica en nutrientes se transporta al interior de la BTS (Mancilla-Peraza y Martínez, 1991). Una vez en el interior, el agua se calienta rápidamente como consecuencia de la recirculación y del tiempo de retención, promoviendo la intensificación de la productividad biológica (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015).

La circulación superficial en el interior de la bahía depende de diversos factores, tales como: dirección y estacionalidad del viento (Argote-Espinoza et al., 1991), flujo de calor, circulación costera en el exterior de la bahía, vientos locales y remolinos ciclónicos y/o anticiclónicos (Mateos et al., 2009). Estos factores, que promueven el tiempo de permanencia del agua en el interior, favorecen la retención de organismos planctónicos, la estratificación de la columna de agua (especialmente en primavera-verano), producen cambios en las comunidades fitoplanctónica e influye en el desarrollo y mantenimiento de FA (en especial de *L. polyedrum*), como ha sido reportado en ésta y otras zonas costeras en donde se favorece la retención de las masas de agua (Graham y Largier, 1997; Ryan et al., 2008).

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Limpieza del material

El material utilizado para la recolección y análisis de metales se preparó utilizando técnicas de ultralimpieza (Bruland et al., 1979). Este proceso involucró el lavado del material con jabón libre de fosfatos (Citranox) al 2% (v/v), seguido de tres enjuagues

con agua destilada y desionizada (ADD) grado Milli-Q ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, el material se dejó en un baño de HCl grado reactivo al 50%, seguido de otro baño de HNO_3 OmniTrace al 0.5%; en cada paso el material en ácido se calentó a 60°C en un horno durante 24 h seguido de tres enjuagues con ADD. El material se secó a temperatura ambiente en una campana con flujo laminar en el interior de un cuarto ultralimpio Clase-100. Finalmente el material se guardó en doble bolsa de plástico Ziploc® hasta su uso posterior. El material utilizado para el análisis de fosfatos se preparó como se mencionó anteriormente, pero eliminando el paso con HNO_3 . Las botellas Niskin-X para la recolección de muestras de agua involucró un lavado con jabón Citranox al 2% (v/v) y posterior limpieza con HCl grado reactivo al 10%. Las botellas se mantuvieron en cada una de estas soluciones durante cuatro días y al final, se enjuagaron con ADD.

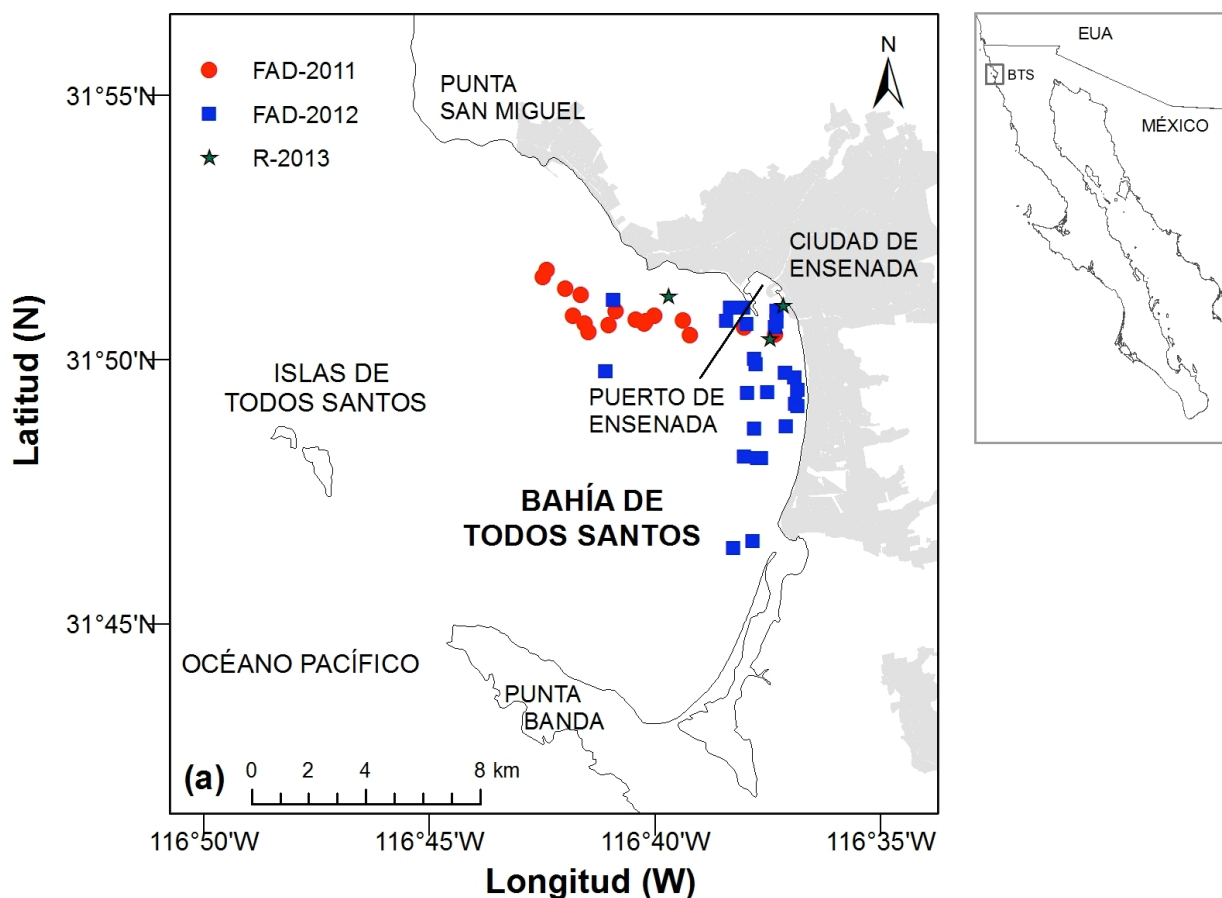


Figura 1.1. Ubicación de la Bahía de Todos Santos (BTS) y de las estaciones de muestreo durante dos florecimientos de *Lingulodinium polyedrum*, que se presentaron en años consecutivos (FAD-2011 y FAD-2012), y un año después en su ausencia (R-2013).

1.3.2. Diseño de muestreo

Los florecimientos de *L. polyedrum* en la BTS generalmente se presentan en primavera-verano (Peña-Manjarrez et al., 2005, 2009), sin embargo en este capítulo se presentan los resultados de dos FAD que ocurrieron en la región noroeste de la BTS en el otoño de 2011 y 2012 (Figura 1.1). Además, debido a que no existen criterios definidos para la definición de un FAD en la BTS, en este trabajo se consideró arbitrariamente que un FA de *L. polyedrum* se presenta cuando la abundancia excede de 10^5 células L^{-1} , este valor es 10 veces el límite superior de la concentración reportada para esta especie en la BTS en ausencia de florecimientos ($10^2 - 10^4$ células L^{-1} ; Peña-Manjarrez et al., 2009). Así, este estudio incluye datos de tres diferentes periodos de muestreo: los primeros dos durante la ocurrencia de dos FA de *L. polyedrum* (octubre – noviembre 2011 y noviembre 2012 – enero 2013) y una tercera, con propósitos comparativos, en ausencia de FA (noviembre 2013).

La ubicación de las estaciones de muestreo se determinó visualmente, seleccionando aquellos lugares en donde se consideró que había altas y bajas abundancias de *L. polyedrum*. Dado que este dinoflagelado tiende a formar parches, una tonalidad rojiza del agua fue indicativa de altas abundancias (Peña-Manjarrez et al., 2009). Durante el florecimiento de 2011 (2012) se recolectaron muestras de agua y fitoplancton a los 4, 6, 11, 18, 28 y 34 (3, 9, 16, 26, 41) días de iniciado el florecimiento, mientras que en noviembre de 2013 las muestras se recolectaron en un solo día (Figura 1.1). De ahora en adelante, los periodos de muestreo realizados durante los florecimientos de *L. polyedrum* se denominarán “FAD” (FAD-2011 y FAD-2012), mientras que el muestreo en ausencia de FA se denominará de referencia (R-2013).

En cada estación, se recolectaron muestras de agua para el análisis de Cd, PO_4^{3-} y material particulado a tres diferentes profundidades (1 m, 5 m y a 1-2 m del fondo), utilizando botellas Niskin-X con resorte externo y recubrimiento de Teflón® (General Oceanics modelo 1010X). En total se recolectaron 46 muestras a 1 m, 25 a 5 m y 25 cercanas al fondo; la diferencia en el número de muestras a las diferentes profundidades obedece a que en algunas estaciones sólo se tomaron muestras superficiales. Las muestras de agua para el análisis de Cd fueron transferidas de la botella Niskin-X, a botellas de polietileno de baja densidad con capacidad de 1 L (LDPE), tomando todas las precauciones necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación. Las botellas con las muestras se guardaron en doble bolsa Ziploc® y se mantuvieron en hielo durante su traslado al laboratorio. Para el análisis de PO_4^{3-} se transfirieron 60 mL de agua directamente de la botella Niskin-X a una jeringa de plástico, se filtraron a través de filtros GF/F (0.45 μm y 25 mm de diámetro, previamente calcinados a 450 °C durante 6 h), se almacenaron en botellas de LDPE y se congelaron para su análisis posterior. Las muestras de agua para identificar y cuantificar las especies de fitoplancton se transfirieron de las botellas Niskin-X a

botellas oscuras de polietileno de alta densidad con capacidad de 250 mL y se fijaron con 1 mL de lugol-acetato concentrado para inmovilizar y preservar las células.

1.3.3. Análisis de Cd y PO_4^{3-}

Las muestras de agua de mar para el análisis de Cd fueron filtradas dentro de las siguientes 24 horas bajo condiciones de atmosfera positiva en el interior de un laboratorio ultralimpio, utilizando filtros Nuclepore® de policarbonato (0.45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro), previamente lavados con HCl al 30% (OmniTrace), HNO_3 al 1% (OmniTrace Ultra) y abundante ADD. En algunos casos, cuando era visible una gran cantidad de material particulado, se realizó un prefiltrado utilizando filtros de 1 μm de tamaño de poro. Las muestras de agua filtrada se acidificaron con 1.0 mL de HNO_3 concentrado (OmniTrace Ultra) por cada litro de agua ($\text{pH} < 2$) y se guardaron en doble bolsa Ziploc®. Los filtros con el material particulado se colocaron en cajas Petri de plástico dentro de doble bolsa Ziploc® y se congelaron a -8°C hasta su análisis.

El Cd disuelto (Cd_d) fue preconcentrado utilizando una resina de intercambio iónico Chelex-100® (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), siguiendo la técnica descrita por Bruland et al. (1979). Para el caso del Cd asociado al material particulado (Cd_p), los filtros se digirieron utilizando 8 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2 concentrados (OmniTrace®), de acuerdo a la técnica recomendada para digerir plancton de Quevauviller et al. (1993). La digestión se realizó durante 4 horas en botellas cerradas de Teflón® en un horno de microondas (Modelo ETHOS TC, Milestone con control de temperatura), para asegurar la digestión del material biológico, principal componente del material particulado recolectado durante los FAD. La solución resultante se vertió en un vaso de precipitado de vidrio y se evaporó casi a totalidad en una plancha a 80°C dentro del cuarto ultralimpio. Finalmente el residuo resultante se redisolvió con 10 mL de HNO_3 al 0.2% (OmniTrace®) y se transfirió a botellas de LDPE.

El Cd_d y Cd_p se cuantificaron en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS; Perkin-Elmer AAnalyst 600), utilizando el método de adición estándar para compensar por efectos de matriz. La exactitud y precisión de los métodos analíticos se evaluaron utilizando los materiales de referencia certificados CASS-5 (Canadian Research Council of Canada) y BCR 414 (Community Bureau of Reference) para agua de mar y plancton, respectivamente. El porcentaje de recuperación para Cd_d y Cd_p fue de $93 \pm 4\%$ y $100 \pm 10\%$, respectivamente, con una precisión en ambas fracciones en el rango 5.6 – 10% (Tabla 1.2). Los blancos de procedimiento fueron sujetos al mismo procesamiento que se siguió con las muestras de agua de mar, pero utilizando ADD y filtros limpios para Cd_d y Cd_p , respectivamente. Los límites de detección se calcularon como tres veces la desviación estándar del blanco de procedimiento (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Análisis de control de calidad de Cd disuelto (Cd_d , $n = 5$) y particulado (Cd_p , $n = 8$) obtenidos con materiales de referencia certificados para agua de mar (CASS 5, Canadian Research Council of Canada) y plancton (BCR 414, Community Bureau of Reference). También se incluyen valores de los blancos de procedimiento y límites de detección.

Parámetro	Cd_d	Cd_p
	CASS 5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BCR 414 (mg kg^{-1})
Valor certificado	0.0215 ± 0.0018	0.383 ± 0.014
Concentración medida	0.0197 ± 0.0008	0.385 ± 0.039
Recuperación (%)	93 ± 4	100 ± 10
Precisión (%)	5.6	10
	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(nmol kg^{-1})
Blanco de procedimiento	0.013 ± 0.012	0.007 ± 0.004
Límite de detección	0.038	0.011

Las concentraciones de PO_4^{3-} se determinaron utilizando el método del ácido ascórbico descrito por Strickland y Parsons (1972). Se tomaron 12.5 mL de agua de mar y se le agregaron 1.25 mL de reactivo mixto, el cual es una mezcla de ácido sulfúrico, tartrato de antimonio-potasio, molibdato de amonio y ácido ascórbico. La reacción produjo un color azul cuya absorbancia fue medida a 885 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Varian modelo Cary 50.

1.3.4. Abundancia de fitoplancton

El conteo de *L. polyedrum* y de los principales grupos de fitoplancton se realizó por el método descrito por Utermöhl (1958), utilizando cámaras de sedimentación con columnas de 50 mL. Cada muestra se homogenizó por agitación manual e inmediatamente se transfirió a uno de los tubos, tapándolo y evitando la inclusión de burbujas de aire. Las cámaras se dejaron en reposo en una superficie plana durante 10 horas para asegurar la sedimentación de toda la muestra. Pasado este tiempo se retiró el cilindro, la cámara de sedimentación se tapó con un cubreobjetos de vidrio y se realizó el conteo de células utilizando un microscopio invertido Olympus CK-2 con contraste de fase. Los conteos se hicieron por transectos en 365 campos y el resultado se extrapoló al total de los 730 campos de la cámara de sedimentación.

1.3.5. Análisis estadístico

Con el fin de estudiar la influencia de los FAD de *L. polyedrum* respecto al comportamiento de cada una de las variables químicas analizadas (Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-}), se compararon los valores promedio medidos en cada profundidad (1 m, 5 m y 1-2 m del fondo) entre florecimientos y en su ausencia (Kruskal-Wallis ANOVA de una vía por rangos). Este mismo análisis se realizó, para identificar posibles diferencias entre

profundidades, para cada una de las variables medidas y para cada evento por separado (FAD-2011, FAD-2012) y en su ausencia (R-2013). Para ver donde radicaban las diferencias, cuando éstas se detectaron, se utilizó una prueba de comparaciones múltiples (Dunn's). Para evaluar posibles asociaciones entre las concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-} con la abundancia de células de *L. polyedrum* en cada florecimiento, se realizaron análisis de correlación simples. Por último, se evaluó la posible relación Cd_d vs. PO_4^{3-} en cada florecimiento y se compararon con datos medidos en las costas de Baja California y California. Los análisis se realizaron con el programa SigmaStat considerando al nivel de probabilidad $P \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

1.4. Resultados

1.4.1. Variación espacial y temporal de la abundancia de *L. polyedrum*

Las mayores abundancias de fitoplancton durante los FAD-2011 y FAD-2012 se registraron en aguas superficiales y fueron variables durante el tiempo de permanencia de cada florecimiento. La comparación de la abundancia relativa del fitoplancton en las muestras superficiales mostró que *L. polyedrum* fue consistentemente la especie más abundante en los dos FAD, representando entre 56 – 96% (FAD-2011) y 39 – 95% (FAD-2012) de la abundancia total, mientras que en ausencia de FA representó $\leq 5.0\%$ (R-2013, Tabla 1.3). La abundancia celular de este dinoflagelado en muestras superficiales fue mayor a 10^5 células L^{-1} durante los FAD, mientras en su ausencia se registró una abundancia máxima de 0.049×10^5 células L^{-1} , lo cual es evidencia clara de florecimientos de *L. polyedrum* en la BTS durante los otoños de 2011 y 2012.

Tabla 1.3. Porcentajes de abundancia y abundancias celulares promedio (rango en negrillas) de *Lingulodinium polyedrum* en muestras superficiales durante dos florecimientos algales de dinoflagelados (FAD-2011 y FAD-2012) y en ausencia de florecimientos (R-2013) en la Bahía de Todos Santos.

Eventos de FAD y no FAD	Dinoflagelados		Diatomeas	Otros organismos planctónicos
	<i>L. polyedrum</i>	Otros		
FAD-2011 (%)	56 – 96	3 – 34	0 – 17	0 – 9
FAD-2011 (células L^{-1})	$(10.0 \pm 8.0) \times 10^5$ $(0.9 - 22.5) \times 10^5$	----	$(0.14 \pm 0.11) \times 10^5$	----
FAD-2012 (%)	39 – 95	3 – 28	1 – 44	0 – 2
FAD-2012 (células L^{-1})	$(5.0 \pm 4.4) \times 10^5$ $(0.7 - 19.3) \times 10^5$	----	$(0.43 \pm 0.29) \times 10^5$	----
R-2013 (%)	0.4 – 5.0	41 – 72	13 – 46	2 – 11
R-2013 (células L^{-1})	$(0.02 \pm 0.02) \times 10^5$ $(0.004 - 0.049) \times 10^5$	----	$(0.28 \pm 0.08) \times 10^5$	----

Durante el FAD-2011, las máximas abundancias promedio de *L. polyedrum* en la superficie se registraron entre los días 4 y 18 ($[13.0 \pm 7.5 - 14.4 \pm 8.3] \times 10^5$ células L^{-1} , respectivamente) de haber iniciado el FAD; para el día 28, la abundancia mostró una disminución del 80% ($[2.9 \pm 1.5] \times 10^5$ células L^{-1}), indicando que el florecimiento estaba decayendo, desapareciendo completamente 34 días después de haber sido detectado (Figura 1.2a). En contraste, las abundancias promedio de *L. polyedrum* a los 5 m y 1-2 m del fondo fueron significativamente menores ($[1.9 \pm 1.3$ y $0.4 \pm 0.8] \times 10^5$ células L^{-1} , respectivamente) que las registradas en muestras superficiales (Figura 1.2a).

Durante el FAD-2012, las máximas abundancias de *L. polyedrum* se observaron entre los días 3 y 26 ($[6.1 \pm 3.3 - 6.4 \pm 5.8] \times 10^5$ células L^{-1}) de haber iniciado el FAD, pero para el día 41 el FAD había decaído a $(1.3 \pm 0.1) \times 10^5$ células L^{-1} (Figura 1.2a). De manera similar al FAD-2011, las abundancias promedio de *L. polyedrum* en el FAD-2012 a 5 m y a 1-2 m del fondo ($[2.3 \pm 1.9$ y $0.8 \pm 1.2] \times 10^5$ células L^{-1} , respectivamente) fueron menores que las abundancias superficiales (Figura 1.2a). Una característica que resalta de los dos florecimientos fue la gran variabilidad espacial observada en los días de mayor abundancia de células, indicando que *L. polyedrum* estaba distribuido en parches o de forma espacialmente heterogénea a pesar de las altas abundancias celulares observadas durante el florecimiento.

1.4.2. Variación espacial y temporal de Cd_p , Cd_d , PO_4^{3-} y Cd_d/PO_4^{3-} durante florecimientos de *L. polyedrum*

De manera similar a la abundancia de *L. polyedrum* durante el FAD-2011, las más altas concentraciones de Cd_p promedio por día (0.37 ± 0.41 a 1.02 ± 0.99 nmol kg^{-1}) se registraron en las muestras superficiales (Figura 1.2b) y estuvieron asociadas a las mayores abundancias celulares de *L. polyedrum*. Posteriormente, cuando el florecimiento decayó el día 34, los niveles de Cd_p disminuyeron hasta 0.090 ± 0.028 nmol kg^{-1} . Al igual que la abundancia de *L. polyedrum*, las concentraciones de Cd_p promedio disminuyeron con la profundidad a los 5 m y cerca del fondo (0.19 ± 0.21 y 0.063 ± 0.050 nmol kg^{-1} , respectivamente; Figura 1.2b) y presentaron menor variabilidad a lo largo del periodo del florecimiento. En contraste, los niveles de Cd_p durante el FAD-2012 (0.100 ± 0.061 nmol kg^{-1}), fueron significativamente menores que los medidos en el FAD-2011 (0.49 ± 0.60 nmol kg^{-1}). Las concentraciones de Cd_p en el FAD-2012 se mantuvieron relativamente constantes durante todo el florecimiento y, aunque no hubo diferencias significativas entre las concentraciones promedio medidas en la superficie, a los 5 m y a 1-2 m del fondo (Figura 1.2b), si se observó un ligero incremento en los niveles de Cd_p durante los días de mayor abundancia de *L. polyedrum*. Finalmente, los valores más bajos de Cd_p en este estudio (0.006 ± 0.009 nmol kg^{-1}) se registraron en ausencia de florecimientos algales en el otoño de 2013 y no se observaron diferencias significativas en las concentraciones medidas en las diferentes profundidades.

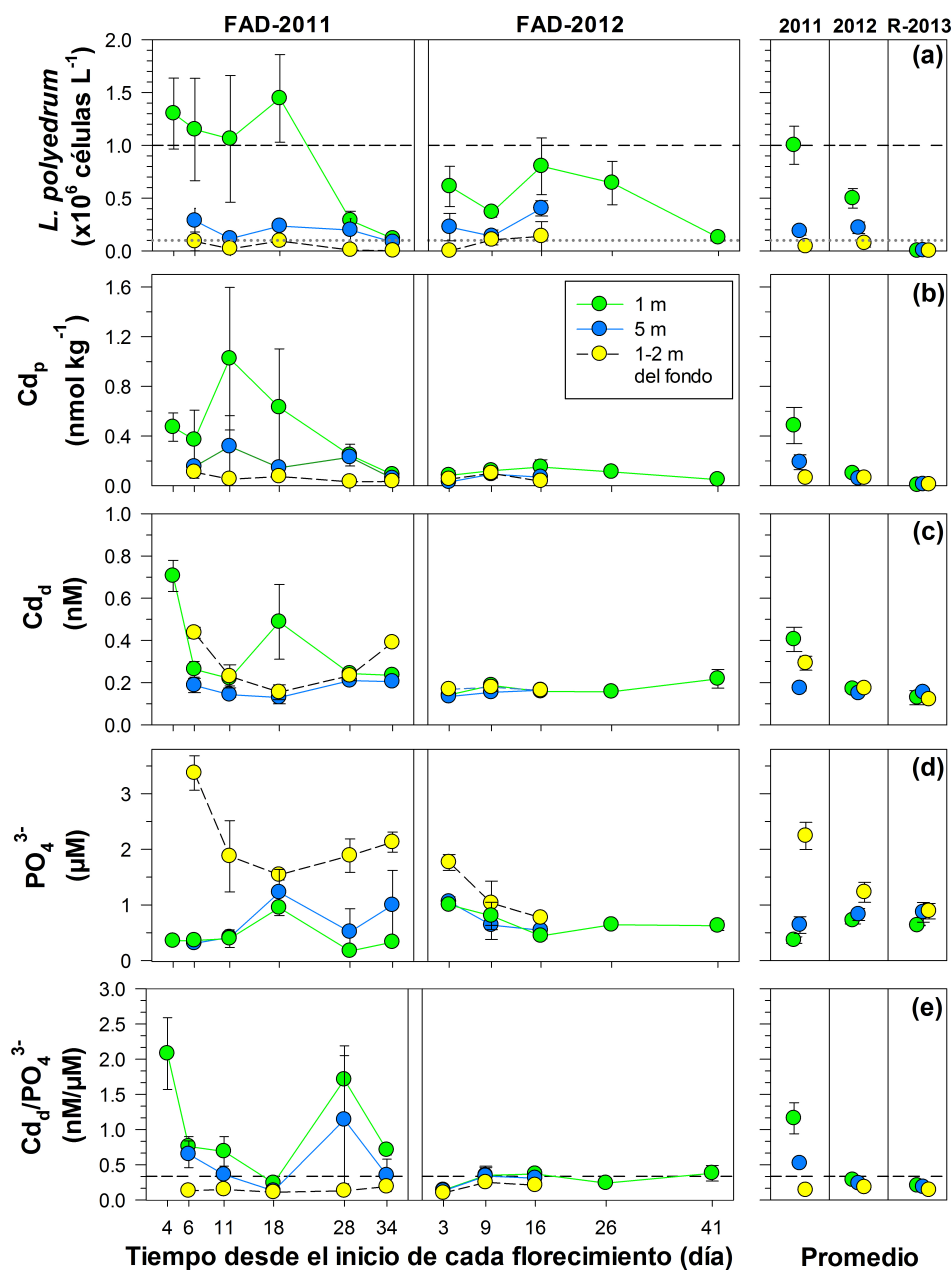


Figura 1.2. Series de tiempo de promedios por día ($\pm$ un error estándar) y por evento de (a) abundancia de células de *Lingulodinium polyedrum*, (b) Cd particulado (Cd_p), (c) Cd disuelto (Cd_d), (d) PO₄³⁻ y (e) Cd_d/PO₄³⁻ durante dos florecimientos algales de dinoflagelados (FAD-2011 y FAD-2012) y en ausencia de florecimientos (R-2013) en la Bahía de Todos Santos (a 1 m y 5 m de profundidad, y a 1-2 m del fondo). La línea horizontal punteada en (a) indica la abundancia de *L. polyedrum* (10⁵ células L⁻¹) por arriba de la cual se considera que hay presencia de un florecimiento y la línea discontinua indica el umbral de abundancia propuesto (10⁶ células L⁻¹). La línea punteada en (e) representa la razón Cd_d/PO₄³⁻ calculada de datos superficiales reportados frente a las costas de Baja California y California (0.336 $\pm$ 0.026 nM/μM; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996).

Durante el FAD-2011 se registraron altas concentraciones de Cd_d en la superficie ($0.220 \pm 0.061 - 0.71 \pm 0.17$ nM, Figura 1.2c). Los valores promedio máximos diarios coincidieron con los días de mayor abundancia de *L. polyedrum* (4 y 18), con una disminución del 69% en la concentración de Cd_d (hasta 0.220 ± 0.061 nM) observada en esos 14 días, pero sin disminución en la abundancia de células. Posteriormente, cuando el florecimiento decayó, los niveles de Cd_d disminuyeron nuevamente. De manera similar al Cd_p , las concentraciones de Cd_d disminuyeron a los 5 m (0.173 ± 0.044 nM) y a 1-2 m del fondo (0.29 ± 0.12 nM, Figura 1.2c), aunque cerca del fondo se observaron mayores valores promedio al inicio y al final del florecimiento (0.437 ± 0.045 y 0.390 ± 0.014 nM, respectivamente). En contraste, las concentraciones de Cd_d durante el FAD-2012 (0.170 ± 0.047 nM) fueron significativamente menores que las medidas en el florecimiento del año anterior (0.41 ± 0.26 nM). Los valores de Cd_d en la superficie prácticamente no variaron durante el desarrollo del FAD-2012 (Figura 1.2c) y no fueron significativamente diferentes de los medidos a los 5 m de profundidad (0.149 ± 0.015 nM) y cerca del fondo (0.169 ± 0.025 nM), ni al de los medidos en ausencia de FA (0.129 ± 0.058 nM, Figura 1.2c).

Contrario al Cd_d , las concentraciones superficiales de PO_4^{3-} fueron generalmente bajas en el florecimiento de 2011 (promedios diarios: $0.170 \pm 0.082 - 0.39 \pm 0.27$ μM ; Figura 1.2d). Las concentraciones de PO_4^{3-} aumentaron con la profundidad, con valores promedio en la superficie (0.37 ± 0.22 μM) y a los 5 m (0.64 ± 0.52 μM) significativamente diferentes de los medidos cerca del fondo (2.24 ± 0.85 μM), en donde se registraron los valores más altos de toda la columna de agua (Figura 1.2d). La mayor concentración promedio cerca del fondo (3.37 ± 0.54 μM) se presentó al inicio del florecimiento de 2011, con la más baja (1.54 ± 0.13 μM) coincidiendo con la mayor abundancia de células de *L. polyedrum* ($[13.0 \pm 7.5] \times 10^5$ células L^{-1}). Durante el FAD-2012, las concentraciones superficiales de PO_4^{3-} presentaron una tendencia contraria a la observada en el año anterior: los mayores valores fueron registrados al inicio del florecimiento (1.001 ± 0.098 μM) y los menores (0.443 ± 0.096 μM , Figura 1.2d) el día de mayor abundancia de células. Las concentraciones promedio de PO_4^{3-} fueron menores en la superficie (0.72 ± 0.30 μM) y se incrementaron con la profundidad (como en el FAD-2011), hasta alcanzar un valor promedio de 1.19 ± 0.59 μM cerca del fondo (Figura 1.2d). En ausencia de florecimientos, también se midieron mayores concentraciones cerca del fondo (1.049 ± 0.041 μM), y fueron significativamente menores que las medidas en el FAD-2011 (2.24 ± 0.85 μM).

La relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ diaria en muestras superficiales varió entre 0.240 ($n = 1$) a 2.1 ± 1.1 nM/ μM en el FAD-2011, presentando una gran variabilidad temporal y un rango de valores similares a los calculados a los 5 m de profundidad ($0.35 \pm 0.32 - 1.1 \pm 1.3$ nM/ μM , Figura 1.2e). Por el contrario, cerca del fondo la relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ permaneció prácticamente constante a lo largo del tiempo ($0.105 \pm 0.035 - 0.190 \pm 0.028$ nM/ μM),

con valores relativamente bajos que estuvieron por debajo de la razón calculada para aguas costeras de Baja California y California (0.336 ± 0.026 nM/ μ M, Pacífico Nororiental; Figura 1.2e). Los valores promedios de la relación Cd_d/PO_4^{3-} fueron mayores en la superficie (1.37 ± 0.86 nM/ μ M) mostrando una fuerte tendencia a disminuir con la profundidad (e.g., 0.137 ± 0.033 nM/ μ M, cerca del fondo; Figura 1.2e). Durante el FAD-2012, la relación Cd_d/PO_4^{3-} en la columna de agua permaneció prácticamente constante, con los valores en la superficie (promedios diarios: $0.143 \pm 0.012 - 0.38 \pm 0.23$ nM/ μ M) y a los 5 m ($0.128 \pm 0.017 - 0.34 \pm 0.21$ nM/ μ M) presentando ligeras fluctuaciones durante el desarrollo del florecimiento, pero con valores significativamente menores que los calculados en el evento del año anterior (Figura 1.2e). Los valores promedio de la relación Cd_d/PO_4^{3-} en la superficie en ausencia de florecimientos fueron bajos (0.203 ± 0.089 nM/ μ M), sin observar diferencias significativas entre profundidades.

1.4.3. Relación entre la abundancia de *L. polyedrum* y las concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-}

Las Figuras 1.3a y 1.3c muestran que durante el FAD-2011 las abundancias de células de *L. polyedrum* estuvieron correlacionadas con el Cd_p ($r = 0.81$, $P < 0.001$) y Cd_d ($r = 0.57$, $P = 0.022$), mientras en el FAD-2012 solo el Cd_p presentó una correlación significativa ($r = 0.67$, $P = 0.024$) con la abundancia celular (Figura 1.3b). En contraste, las concentraciones promedio de PO_4^{3-} no se correlacionaron con la abundancia de células de *L. polyedrum* en ninguno de los dos florecimientos (Figura 1.3e, f).

1.5. DISCUSIÓN

1.5.1. Efecto de los florecimientos de *L. polyedrum* en las concentraciones de Cd y PO_4^{3-}

Las altas abundancias de *L. polyedrum* en aguas superficiales durante los FAD, fueron consistentes con lo reportado previamente para esta especie sobre su tendencia a concentrarse en la capa superficial de la columna de agua durante las horas del día (Ruiz-de la Torre et al., 2013). Las diferencias en las abundancias promedio entre el FAD-2011 y FAD-2012 ($[10.0 \pm 8.0$ y $5.0 \pm 4.4] \times 10^5$ células L^{-1} , respectivamente; Figura 1.2a), sugiere que el primero fue más intenso y de mayor magnitud. Además, la gran variabilidad espacial observada, en especial durante el FAD-2011, indica que durante un mismo florecimiento *L. polyedrum* no se distribuye de forma homogénea, sino que se agrega en parches con mayor o menor abundancia de células, influenciado por el esfuerzo del viento (Peña-Manjarrez, 2001; Ruiz-de la Torre et al., 2013). Debido a las altas concentraciones reportadas al final del FAD de 2005 (Lares et al., 2008), la hipótesis inicial de este capítulo consideraba que durante los florecimientos, *L.*

polyedrum tendría la capacidad de asimilar Cd_d del medio el cual sería puesto nuevamente en solución al final del florecimiento. Sin embargo, en este estudio no se observaron altas concentraciones de Cd_d al final de los florecimientos (Figura 1.2c); por el contrario, durante el FAD-2011 las altas concentraciones de Cd_d (0.71 ± 0.17 y 0.49 ± 0.35 nM) se presentaron durante los periodos de mayor abundancia de células. Sin embargo, el incremento en el Cd_p durante los florecimientos, particularmente en el FAD-2011, apoyan la idea de que *L. polyedrum*, la especie dominante del fitoplancton, está incorporando y concentrando Cd.

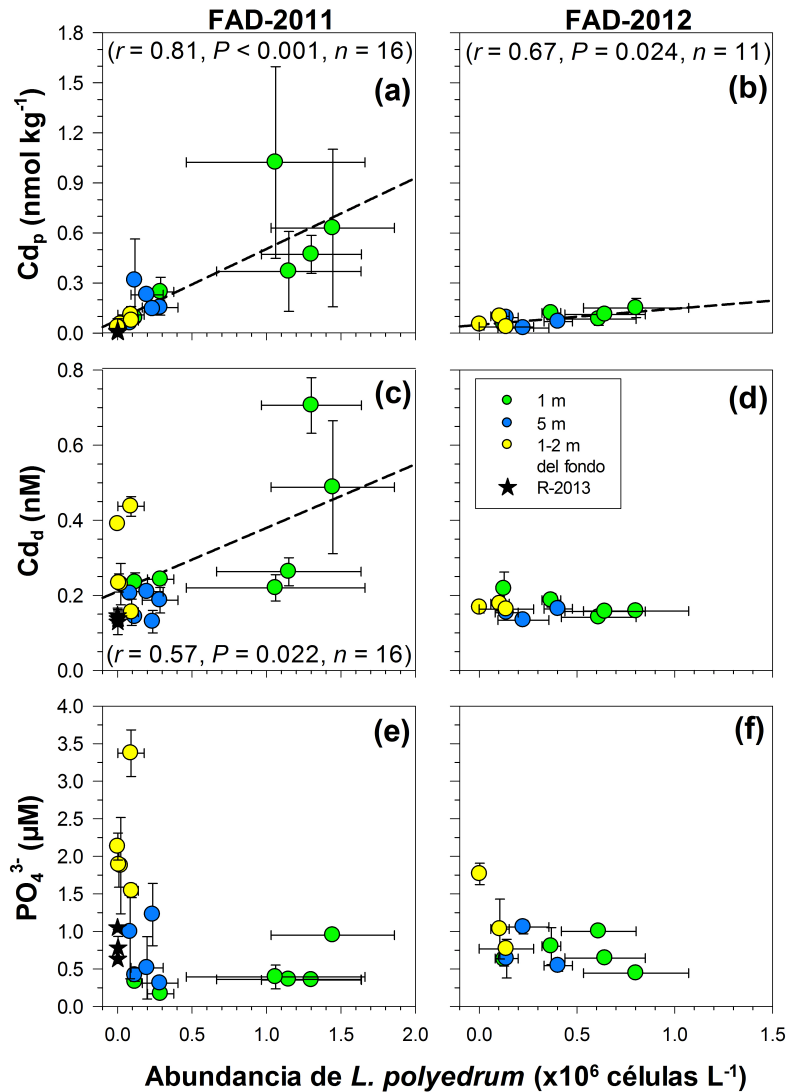


Figura 1.3. Relación entre el promedio ($\pm$ un error estándar) de la concentración por día de (a,b) Cd disuelto (Cd_d), (c,d) Cd particulado (Cd_p), (e,f) PO_4^{3-} y la abundancia de células de *Lingulodinium polyedrum* en la columna de agua (a 1 m y 5 m de profundidad, y a 1-2 m del fondo) durante dos florecimientos de esta especie (FAD-2011 y FAD-2012) en la Bahía de Todos Santos. Los datos en ausencia de florecimientos (R-2013) se muestran para fines comparativos.

Las diferencias en las concentraciones de Cd_p y de Cd_d en la superficie durante los dos florecimientos sugieren que *L. polyedrum* no fue el único factor que afectó el comportamiento de este elemento; dependiendo de la abundancia de células, *L. polyedrum* influyó también en la química del agua, como se observó en el FAD-2011, cuando se registraron las mayores abundancias y las más altas concentraciones de Cd_p y Cd_d . Con base en lo anteriormente expuesto, se hipotetiza que existe un umbral de abundancia de aproximadamente 10^6 células L^{-1} (Figura 1.3) a partir del cual la asimilación no es el único proceso importante, sino que además existen otros procesos que ponen en solución al Cd y, posiblemente, al PO_4^{3-} .

Existen varios mecanismos que, combinados, podrían explicar el incremento de Cd_p en *L. polyedrum*, todos ellos relacionados con la anhidrasa carbónica (AC). Esta enzima ha sido identificada en *L. polyedrum* (Lapointe et al. 2008) y es utilizada por el fitoplancton para asimilar carbono inorgánico, ya que cataliza la formación de CO_2 a partir de HCO_3^- (Price y Morel, 1990). Por ejemplo, el Cd puede ser utilizado de forma alterna sustituyendo al Zn en la AC-Zn cuando este elemento se vuelve limitante (Price y Morel, 1990; Lee et al., 1995; Xu et al., 2008) o puede ser utilizado directamente como una enzima específica (AC-Cd; Cullen et al., 1999). De esta manera, incrementos en la actividad de la AC podrían explicar los aumentos de Cd en el fitoplancton observados durante los periodos de alta productividad, como sería el caso del FAD-2011, ya que conforme disminuye la presión parcial del CO_2 (pCO_2) se incrementa la utilización de esta enzima y, por lo tanto, la asimilación de Cd (Cullen et al., 1999; Lane y Morel, 2000; Cullen y Sherell, 2005; Lane et al., 2009). Otro mecanismo que ha demostrado incrementar la concentración de Cd intracelular es la limitación en la disponibilidad de Fe disuelto (Fe_d), el cual puede actuar de dos maneras diferentes: (1) disminuyendo la tasa de crecimiento del fitoplancton, pero manteniendo la tasa de asimilación de Cd constante (Cullen et al., 2003) o, (2) incrementando la tasa de asimilación de Cd a través de transportadores no específicos de Fe(II) (Lane et al., 2009).

A pesar de que no se midieron las variables antes mencionadas (pCO_2 y Fe_d), los mecanismos que involucran disminución de pCO_2 y limitación por Fe podrían explicar el incremento de Cd_p durante el FAD-2011 (0.49 ± 0.60 nmol kg^{-1}). De esta manera, la presión ejercida por las altas abundancias de *L. polyedrum* (hasta 2.25×10^6 células L^{-1}) podría reducir las concentraciones superficiales de CO_2 y Fe_d . Estas disminuciones incrementan a su vez la necesidad y capacidad de asimilar Cd_d , en un proceso similar al que se ha demostrado que ocurre durante florecimientos de diatomeas (Cullen et al., 1999; Takesue y van Geen, 2002; Lane et al., 2009) y, muy posiblemente, durante los FAD de este estudio. Los incrementos en las concentraciones de Cd_p durante el FAD-2011 y la alta correlación observada con la abundancia de *L. polyedrum* en el FAD-2011 ($r = 0.81$; $P \leq 0.001$), así como en el FAD-2012 ($r = 0.67$; $P = 0.024$) indican que,

efectivamente, los florecimientos algales de este organismo juegan un papel fundamental en controlar los niveles de Cd en el agua de mar.

Las concentraciones superficiales de Cd_d y PO_4^{3-} (0.123 – 0.916 nM y 0.095 – 1.38 μM , respectivamente) estuvieron por lo general dentro del rango de concentraciones reportadas para la BTS y para las costas del Pacífico Norte (Tabla 1.1). Es interesante notar que las altas concentraciones de Cd_d al inicio del FAD-2011 (0.71 ± 0.17 nM, día 4; Figura 1.2c) excedieron los valores reportados en ausencia de florecimientos algales así como los obtenidos en este estudio (hasta 0.192 nM, R-2013), pero no fueron tan elevados como los registrados por Lares et al. (2008). En este trabajo el incremento de Cd_p no se reflejó precisamente como una disminución en la fase disuelta, como se ha observado en otros estudios realizados durante florecimientos fitoplanctónicos (e.g., Knauer y Martin, 1973; Luoma et al., 1998; Kudo y Matsunaga, 1998; Cassis et al., 2011), sino por el contrario, se manifestó como elevadas concentraciones de Cd_d en la superficie que coincidieron con los días de mayor abundancia de células (FAD-2011, Figura 1.2a, c). Esta tendencia es contraria a lo que se esperaría durante un florecimiento fitoplanctónico, ya que la elevada asimilación por *L. polyedrum* debería reducir las concentraciones de Cd_d , como se observó en los días 6 y 11.

Las altas concentraciones de Cd_d en la superficie pueden ser explicadas por la incorporación y subsecuente regeneración de Cd producto de la remineralización de la gran cantidad de material orgánico particulado producido constantemente durante los FAD, junto con la posible presencia de ligandos orgánicos secretados por *L. polyedrum*, los cuales podrían mantener en solución al Cd (Figura 1.2c). Se ha reportado que cantidades importantes de Cd (hasta el 70%; Bruland, 1992) pueden estar complejadas orgánicamente en las capas superficiales de la columna de agua del Pacífico Norte (Bruland, 1992), del Subantártico (Ellwood, 2004) y del Atlántico Oriental (Helmets, 1994). Se descarta el posible aporte de Cd_d proveniente de aguas de surgencias del exterior de la BTS, por varias razones: 1) aunque las surgencias ocurren a lo largo del año, son más frecuentes e intensas en primavera-verano, mientras que los FAD de 2011 y 2012 se desarrollaron en otoño; 2) el estudio de Ruiz-de la Torre et al. (2013) realizado en la BTS durante los días 4 a 18 de haber iniciado el FAD-2011, reportaron temperaturas superficiales altas (17.5 – 19 °C), lo que no coincide con aguas frías y ricas en nutrientes recién surgidas; 3) además, se ha reportado que una vez que el agua ingresa a la BTS hay un proceso de “añejamiento”, que conlleva a una disminución en las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} debido al consumo por el fitoplancton (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015).

La distribución tipo nutriente del PO_4^{3-} durante los FAD y en ausencia de florecimientos sugiere que las concentraciones son controladas por la asimilación del fitoplancton en la capa superficial y que la concentración de PO_4^{3-} se incrementa con la profundidad debido a la remineralización de la materia orgánica (de Baar et al., 1994),

aunque otros procesos también podrían ser relevantes. De esta manera, el incremento en las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} cerca del fondo (Figura 1.2c, d) podría ser explicado por la remineralización de la materia orgánica producida por la lluvia de material producto del FAD, en especial durante el FAD-2011 que fue el evento de mayor abundancia fitoplanctónica (Figura 1.2a). Sin embargo, los incrementos en las concentraciones disueltas también podrían ser ocasionados por flujos advectivos y/o difusivos desde los sedimentos hacia la columna de agua. Estos flujos pueden resultar de la oxidación del excedente de materia orgánica producto del FAD, que posiblemente no alcanza a degradarse en su totalidad en la columna de agua antes de llegar al fondo, debido a la poca profundidad de la zona de muestreo (~ 25 m). En general, el Cd_d dominó en la columna de agua, aportando más del 55% del Cd total ($\text{Cd}_T = \text{Cd}_d + \text{Cd}_p$). Sin embargo, en el FAD-2011, en donde se presentaron las mayores abundancias de *L. polyedrum*, se observaron los menores porcentajes de Cd_d a 1 y 5 m de profundidad (56 y 55%, respectivamente). En contraste, cerca del fondo se presentaron altos porcentajes de Cd_d durante los dos FAD (82 y 75%, FAD-2011 y FAD-2012 respectivamente), pero fueron menores a los del R-2013 (93%). La diferencia en los porcentajes de la fracción disuelta puede ser explicada por la materia orgánica producida, que no alcanza a remineralizarse y llega al fondo; este comportamiento contrasta con la casi completa remineralización de la materia orgánica en ausencia de florecimientos.

La diferencia entre la variabilidad en las concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-} en la columna de agua entre el FAD-2011 y el FAD-2012, podría ser explicada por la mayor abundancia de *L. polyedrum* en la superficie durante el primer evento (Figura 1.2a-d). Durante el FAD-2011, las concentraciones superficiales de Cd_d y Cd_p se incrementaron, pero las concentraciones de PO_4^{3-} disminuyeron. Estos resultados sugieren que la presencia de FAD de *L. polyedrum* afecta los niveles de Cd y PO_4^{3-} y refuerzan la hipótesis de que existe un umbral de abundancia, a partir del cual la magnitud del florecimiento afecta la química del agua. Las correlaciones de las abundancias de *L. polyedrum* con las concentraciones de Cd_d ($r = 0.57$) y Cd_p ($r = 0.81$) en el FAD-2011 y con el Cd_p ($r = 0.67$; Figura 1.3) en el FAD-2012, dan apoyo adicional a la hipótesis propuesta de que existe un umbral de abundancia (10^6 células L^{-1}), a partir del cual, las concentraciones de Cd_d y Cd_p se incrementan significativamente.

1.5.2. $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$

En el océano, el Cd_d presenta una distribución característica "tipo nutriente" que está fuertemente correlacionada con el PO_4^{3-} , esto es, valores bajos en la superficie que se incrementan con la profundidad (Bruland, 1980). Este comportamiento implica que las concentraciones de ambas especies químicas son controladas por su asimilación por el fitoplancton en aguas superficiales y por procesos de remineralización de la materia orgánica en aguas profundas (de Baar et al., 1994; Takesue y van Geen, 2002). La

relación positiva entre el Cd_d y el PO_4^{3-} (en nM/ μ M) ha sido ampliamente estudiada y reportada para todos los océanos (de Baar et al., 1994; van Geen y Husby, 1996; Takesue y van Geen, 2002; Cullen, 2006). En el caso particular del Pacífico Noreste (Bruland, 1980) esta relación está representada por la ecuación:

$$[Cd_d] = -(0.068 \pm 0.017) + (0.347 \pm 0.007)[PO_4^{3-}] \quad (1.1)$$

$(r = 0.99, P \leq 0.001, n = 45)$

Adicionalmente, a partir de datos de Cd_d y PO_4^{3-} reportados para aguas superficiales de las costas de Baja California y California (Figura 1.4a; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996) se obtuvo la siguiente ecuación:

$$[Cd_d] = (0.011 \pm 0.022) + (0.336 \pm 0.026)[PO_4^{3-}] \quad (1.2)$$

$(r = 0.83, P \leq 0.001, n = 75)$

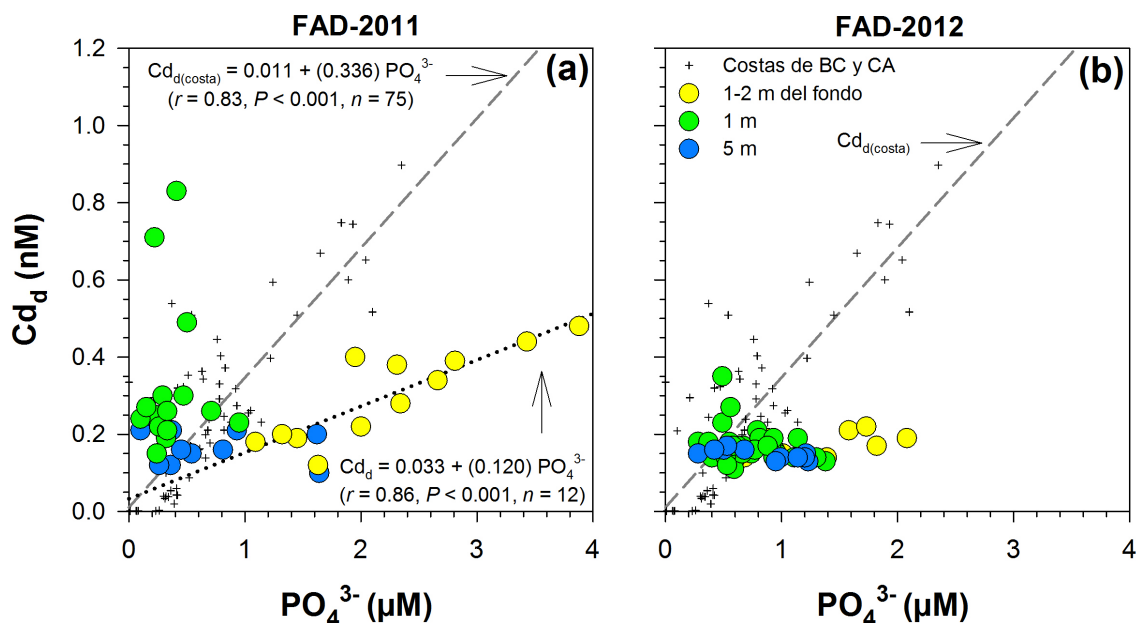


Figura 1.4. Relación entre las concentraciones de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} durante dos florecimientos de *Lingulodinium polyedrum* (a) FAD-2011 y (b) FAD-2012 en la Bahía de Todos Santos, comparados con datos superficiales (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996) reportados frente a las costas de Baja California (BC) y California (CA). La línea discontinua representa la regresión lineal para aguas superficiales costeras ($Cd_{d(costa)}$) de BC y CA, mientras que la línea punteada representa la regresión lineal para los datos de Cd_d y PO_4^{3-} a 1-2 m del fondo durante el FAD-2011. Se muestran las ecuaciones de las líneas de regresión, sus coeficientes de correlación (r), niveles de significancia (P) y números de muestras (n).

La semejanza en las pendientes de las ecuaciones (1.1) y (1.2) indica que existe una constancia en la razón Cd_d/PO_4^{3-} para aguas oceánicas y superficiales del Pacífico Noreste. Sin embargo, a pesar de que las aguas que ingresan a la BTS provienen del Pacífico Noreste (Mancilla-Peraza y Martínez, 1991; Mateos et al., 2009) y poseen una razón Cd_d/PO_4^{3-} constante, en este estudio y a diferencia de lo reportado en la literatura, no se observó una correlación significativa entre el Cd_d y el PO_4^{3-} en ninguno de los florecimientos ($P > 0.05$, Figura 1.4a, b), indicando que los valores de la relación Cd_d/PO_4^{3-} fueron muy variables durante estos FAD. La Figura 1.2e muestra que la relación promedio Cd_d/PO_4^{3-} , para las tres diferentes profundidades durante los FAD y en ausencia de florecimientos, presentó una tendencia a disminuir con la profundidad. Sin embargo, durante el FAD-2011 los valores a 1 y 5 m de profundidad (1.16 ± 0.85 y 0.52 ± 0.54 nM/ μ M, respectivamente) fueron mayores que la razón reportada para aguas costeras del Pacífico Nororiental (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; ecuación 1.2). Las Figuras 1.2e y 1.4 sugieren que existen diferentes procesos en la columna de agua que producen un comportamiento diferencial entre Cd_d y PO_4^{3-} , unos que se presentan en la parte superior de la columna de agua (1 y 5 m) y otros cerca del fondo (1-2 m del fondo), en especial en el FAD-2011. En la Figura 1.4a se puede observar que, por lo general, los datos superficiales de Cd_d/PO_4^{3-} se encuentran por encima de la curva obtenida para aguas oceánicas y costeras del Pacífico Nororiental (ecuaciones 1.1 y 1.2), mientras todos los datos a 1-2 m del fondo estuvieron por debajo de esta curva. Como resultado de ese comportamiento diferencial, cerca del fondo se observó una correlación altamente significativa ($r = 0.86$, $P \leq 0.001$) entre Cd_d y PO_4^{3-} , solo durante el FAD-2011.

La variabilidad en las concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-} en aguas superficiales puede ser explicada como consecuencia de la elevada productividad biológica producida durante los FAD, la cual se concentró casi en su totalidad en la superficie (Figura 1.2a). Como resultado de la alta productividad durante el FAD-2011, es posible que *L. polyedrum* esté reduciendo las concentraciones de PO_4^{3-} disponible en el medio, lo cual podría estar reflejando una asimilación preferencial de PO_4^{3-} o una menor asimilación de Cd, como lo sugiere la Figura 1.4a. Este mismo comportamiento también se ha reportado en poblaciones naturales de diatomeas en las costas de Oregon (EUA, Takesue y van Geen, 2002), así como en cultivos de estos mismos organismos (Kudo et al., 1996). La baja pendiente Cd_d/PO_4^{3-} obtenida en el FAD-2011 para aguas cercanas al fondo (0.120 ± 0.022 nM/ μ M, Figura 1.4a) apoya la hipótesis de la posible limitación por Fe en la BTS durante el periodo de estudio. Algunos autores han reportado razones similares para zonas donde existe limitación por Fe, como sería el caso de las aguas intermedias del Antártico (0.10 nM/ μ M, Loscher et al., 1998) y el Mar de Bering (0.21 ± 0.03 nM/ μ M, Cullen, 2006). Para aguas superficiales de la BTS Delgadillo-Hinojosa et al. (2015), reportaron que los más altos valores de Cd_d/PO_4^{3-} (0.87 ± 0.12 nM/ μ M), que ocurrieron durante primavera, estuvieron fuertemente

correlacionados con la productividad del fitoplancton ($r = 0.80$; $P < 0.001$). Estos autores sugieren que la intensidad de la actividad biológica tiene un impacto en la dinámica estacional de la razón Cd_d/PO_4^{3-} en la BTS. Sin embargo, en este estudio sólo los valores de la relación Cd_d/PO_4^{3-} durante el FAD-2011 se correlacionaron positivamente con la abundancia de fitoplancton ($r = 0.53$; $P \leq 0.001$), lo que nos sugiere que esta razón no sólo es afectada por la presencia del florecimiento, sino también por su intensidad y, posiblemente, también por la especie de fitoplancton involucrada. Estos resultados son consistentes con los bajos valores de la relación Cd_d/PO_4^{3-} (0.203 ± 0.089 nM/ μ M) registradas en la superficie en ausencia de florecimientos, en el otoño de 2013 (R-2013), y con la presencia de bajas abundancias fitoplanctónicas.

El comportamiento observado en la relación Cd_d/PO_4^{3-} cerca del fondo, así como los incrementos en las concentraciones de PO_4^{3-} y, en menor grado, de Cd_d a esta misma profundidad (Figuras 1.2c, d, e) podrían ser explicados por dos procesos:

Proceso 1: remineralización de la materia orgánica en la columna de agua. La distribución tipo nutriente del PO_4^{3-} refleja su asociación con la materia orgánica (Figura 1.2d), en donde las concentraciones promedio se incrementan gradualmente con la profundidad, en especial durante el FAD-2011. Los incrementos en Cd_d y PO_4^{3-} pueden ser explicados por procesos de oxidación del exceso de materia orgánica producto de los FAD, exportada al fondo de la columna de agua. Este proceso se presentó particularmente durante el FAD-2011, cuando se observaron las más altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} cerca del fondo (Figura 1.2c, d). Sin embargo, si la remineralización fuera el único proceso responsable entonces: (1) no se obtendría el comportamiento diferencial observado entre las razones Cd_d/PO_4^{3-} para la parte superior de la columna de agua y la cercana al fondo (Figura 1.4a); y (2) se esperaría que el Cd tuviera el mismo comportamiento tipo nutriente del PO_4^{3-} , lo cual no fue el caso, como se puede observar en la Figura 1.2c. El desacople observado en la Figura 1.4a sugiere la existencia de otros procesos que pudieran modificar las concentraciones de Cd y PO_4^{3-} .

Proceso 2: flujos bentónicos. El incremento en las concentraciones promedio de Cd y PO_4^{3-} cerca del fondo (Figuras 1.2c, d) también podría ser explicado por flujos bentónicos de estos dos componentes disueltos producidos por la mineralización de la materia orgánica en los sedimentos, producto de la lluvia de material orgánico particulado. Por otro lado, la Figura 1.4a sugiere que si estos flujos están presentes, entonces habría una liberación preferencial de PO_4^{3-} hacia la columna de agua o una retención preferencial de Cd en los sedimentos, ya que los valores de la razón Cd_d/PO_4^{3-} cercanos al fondo se encuentran por debajo de la curva obtenida para aguas superficiales costeras de Baja California y California. La presencia de bajas profundidades en la BTS (entre 10 y 50 m; Argote-Espinosa et al., 1991) y alta

productividad durante gran parte del año y en especial durante los FAD, aumentan las posibilidades de enterramiento de materia orgánica sumamente lábil en los sedimentos y, por lo tanto, la presencia de flujos bentónicos importantes hacia la columna de agua. Una vez que la materia orgánica es enterrada en los sedimentos, durante los procesos de oxidación se libera Cd y PO_4^{3-} al agua intersticial los cuales, por procesos difusivos o advectivos, pueden emigrar hacia la parte más profunda (anóxica a anóxica-sulfídica) del sedimento o hacia la interfase agua-sedimento. Para el caso específico del Cd, este elemento puede coprecipitar con los sulfuros de Fe (e.g. Huerta-Díaz y Morse, 1992) o precipitar como CdS (Davies-Colley et al., 1985) en la zona anóxica-sulfídica del sedimento. Para el caso de la fracción de Cd y PO_4^{3-} que emigra hacia la interfase agua-sedimento, estas dos especies disueltas pueden llegar a estar asociadas con los oxi(hidróxi)dos de Fe y Mn (e.g., Gadde y Laitinen, 1974; Fu et al., 1991; Tessier et al., 1996) que se encuentran presentes en la zona óxica del sedimento. Como resultado de los procesos antes mencionados, podría entonces darse una liberación preferencial de PO_4^{3-} ocasionada por la oxidación de la materia orgánica y/o una retención preferencial de Cd por sulfuros y oxi(hidróxi)dos de Fe y Mn.

De esta manera los diferentes comportamientos de Cd_d y PO_4^{3-} en la columna de agua pueden asociarse a la presencia de varios procesos: en la parte superior de la columna de agua representados por la asimilación biológica y la remineralización de la materia orgánica; y cerca del fondo principalmente por la remineralización de la materia orgánica y posiblemente por flujos bentónicos ocasionados por procesos diagenéticos que ocurren dentro de los sedimentos.

Los resultados del presente estudio sugieren, la existencia de un desacople en el comportamiento del Cd y el PO_4^{3-} en el interior de la BTS durante el periodo de estudio, principalmente a causa del desarrollo de florecimientos de *L. polyedrum*. Sin embargo, este desacople también podría estar relacionado con las características particulares de la bahía, tales como la morfología costera, la poca profundidad (entre 10 y 50 m), el patrón de circulación superficial (presencia de giros ciclónicos y anticiclónicos), y su comportamiento como centro de retención (Mateos et al., 2009; Delgadillo-Hinojosa et al., 2015). Estas características hacen que los procesos biológicos tengan un papel relevante y puedan a su vez ejercer un control más efectivo sobre los ciclos de los nutrientes y metales traza. De ser así, entonces las razones $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ reportadas para la BTS deberían ser en general diferentes a las reportadas para las aguas oceánicas y superficiales del Pacífico Noreste (Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996). Este es efectivamente el caso; por ejemplo, Salamanca-Quevedo (2013) obtuvo una razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ promedio de 0.24 nM/ μM para la columna de agua en un ciclo anual, con los menores valores en otoño (0.12 nM/ μM) y los mayores en primavera (0.21 nM/ μM). Por otro lado, en aguas superficiales de la BTS, Lares et al. (2008) calcularon una razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ de $0.36 \pm$

0.13 nM/ μ M durante la etapa final de un FAD de *L. polyedrum* en el 2005; sin embargo, el siguiente año esta razón se incrementó a 0.98 ± 0.16 nM/ μ M en ausencia de florecimientos (Lares y Marinone, 2009). Estos autores sugieren que las diferencias en la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ pueden estar reflejando la remoción preferencial de Cd vs. PO_4^{3-} por el fitoplancton, el cual fue más abundante en el 2005 que en el 2006.

Si bien los diferentes autores explicaron las variaciones en las razones $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ dentro de la BTS como una consecuencia de la influencia de la actividad biológica y aunque los datos obtenidos en esta investigación indican que existe una relación significativa entre la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ y la abundancia del fitoplancton durante el FAD-2011 ($r = 0.53$, $P < 0.001$), los datos obtenidos también sugieren que otros procesos pudieran ser importantes. Se ha propuesto que cambios en la biomasa así como en las especies del fitoplancton tienen un efecto complejo en el ciclo de algunos nutrientes y metales traza (Luengen et al., 2007), como se propone aquí para el Cd y el PO_4^{3-} . Por otra parte, la gran variabilidad en las razones $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ observadas para la BTS, una zona en donde la estacionalidad y el tiempo de retención del agua producen cambios en la química del agua y crean una variedad de escenarios, sugieren que la utilización del Cd y el PO_4^{3-} en esta bahía es bastante compleja.

Lo anterior demuestra que la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ además de variar con la edad de la masa de agua, como se ha observado para los diferentes océanos (de Baar et al., 1994) o para las zonas High Nutrient Low Chlorophyll (HNLC) (Loscher et al., 1998; Cullen, 2006), también puede variar por otros procesos como los sugeridos en este estudio. De ser así, el desacople del Cd y el PO_4^{3-} observado en la BTS sugiere que la relación Cd vs. PO_4^{3-} utilizada como proxy de la utilización de PO_4^{3-} en aguas superficiales del pasado histórico debe ser manejada con cautela, ya que supone que ambas variables permanecen constantes en el tiempo y el espacio (Elderfield y Rickaby, 2000), lo cual no sucede en la BTS. Por lo tanto, el uso de esta relación para reconstruir condiciones pasadas de la utilización de nutrientes no permitiría una estimación válida, así como ha sido propuesto para aguas altamente productivas recientemente afloradas en California (Cullen y Sherrell, 2005) y para aguas superficiales del Subantártico (Gault-Ringold et al., 2012).

1.6. Conclusión

Se estudió la influencia de los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum* en el comportamiento de Cd y PO_4^{3-} en la columna de agua de la BTS, una bahía localizada al noroeste de la Península de Baja California. De manera general se observó que existe una gran variabilidad espacial en la abundancia de *L. polyedrum* dentro de un mismo florecimiento y en un mismo día, así como en las concentraciones

de Cd_d , sugiriendo una distribución por parches de *L. polyedrum* y cambios asociados con esta distribución. Las altas concentraciones de Cd_d , Cd_p y PO_4^{3-} en la superficie especialmente durante el FAD-2011, sugieren que la abundancia de *L. polyedrum* es la responsable de modificar las concentraciones de estos componentes. Por lo tanto, se propone que existe un umbral de abundancia de aproximadamente 10^6 células L^{-1} , a partir del cual la magnitud del FAD afecta significativamente la química del agua. La relación entre Cd_d y PO_4^{3-} sugiere que existen diferentes procesos en la columna de agua que producen un comportamiento diferencial entre Cd_d y PO_4^{3-} : en la parte superior de la columna de agua procesos de asimilación biológica y remineralización; y en aguas cercanas al fondo, procesos de remineralización y flujos bentónicos ocasionados por la oxidación de gran cantidad de materia orgánica y procesos diagenéticos que ocurren en los sedimentos. Finalmente, los resultados del presente estudio, la gran variabilidad en la razón Cd_d/PO_4^{3-} observada en la BTS, y las diferencias observadas con aguas adyacentes del Pacífico Noreste, sugieren un desacople en el comportamiento de Cd y el PO_4^{3-} en el interior de la BTS ocasionado, no solo por las características particulares de la bahía, sino también por la presencia de florecimientos de dinoflagelados.

1.7. Referencias

- Argote-Espinoza, M.L., Gavidia-Medina, F.J., Amador-Buenrostro, A. 1991. Wind-induced circulation in Todos Santos bay, B.C., México. *Atmósfera* 4: 101-115.
- Biller, D.V., Bruland, K.W. 2013. Sources and distributions of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, and Cd relative to macronutrients along the central California coast during the spring and summer upwelling season. *Mar. Chem.* 155: 50-70.
- Bruland, K.W. 1980. Oceanography distribution of cadmium, zinc, nickel and copper in the north Pacific. *Earth Planet. Sc. Letters* 47: 176-198.
- Bruland, K.W. 1992. Complexation of cadmium by natural organic ligands in the central North Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1008-1017.
- Bruland, K.W., Knauer, G.A., Martin J.H. 1978. Cadmium in the northeast Pacific waters. *Limnol. Oceanogr.* 23: 618-625.
- Bruland, K.W., Franks, R.P., Knauer, G.A., Martin, J.H., 1979. Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in seawater. *Anal. Chem. Acta* 105: 203-245.
- Bruland, K.W., Donat, J.R., Hutchins, D.A., 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.* 36: 1555-1577.
- Cassis, D., Lekhi, P., Pearce, C.M., Ebell, N., Orians, K., Maldonado, M.T. 2011. The role of phytoplankton in the modulation of dissolved and oyster cadmium concentrations in Deep Bay, British Columbia, Canada. *Sci. Total Environ.* 409: 4415-4424.

- Cruz-Colín, M.E. 1997. Variabilidad de temperatura del mar en la Bahía de Todos Santos, B. C., México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México, 98 p.
- Cullen, J.T. 2006. On the nonlinear relationship between dissolved cadmium and phosphate in the modern global ocean: could chronic iron limitation of phytoplankton growth cause the kink? *Limnol. Oceanogr.* 51: 1369-1380.
- Cullen, J.T., Lane, T.W., Morel, F.M.M., Sherrell, R.M. 1999. Modulation of cadmium uptake in phytoplankton by seawater CO₂ concentration. *Nature* 402: 165-167.
- Cullen, J.T., Chase, Z., Coale, K.H., Fitzwater, S.E., Sherrell, R.M. 2003. Effect of iron limitation on the cadmium to phosphorus ratio of natural phytoplankton assemblages from the Southern Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 48: 1079-1087.
- Cullen, J.T., Sherrell, R.M. 2005. Effects of dissolved carbon dioxide, zinc, and manganese on the cadmium to phosphorus ratio in natural phytoplankton assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1193-1204.
- Davies-Colley R.J., Nelson, P.O., Williamson K.J. 1985. Sulfide control of cadmium and copper concentrations in anaerobic estuarine sediments. *Mar. Chem.* 16: 173-186.
- de Baar, H.J.W., Saager, P.M., Notling, R.F., van der Meer, J. 1994. Cadmium versus phosphate in the world ocean. *Mar. Chem.* 46: 261-281.
- Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Díaz, M.A., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S.G., Segovia, J.A., Peña-Manjarrez, J.L., García-Mendoza, E., Castro, R. 2015. Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO₄ ratio in Todos Santos Bay: a retention site of upwelled waters in the Baja California Península, México. *Mar. Chem.* 168: 37-48.
- Elderfield, H., Rickaby, R.E.M. 2000. Oceanic Cd/P ratio and nutrient utilization in the glacial Southern Ocean. *Nature* 405: 305-310.
- Ellwood, M.J. 2004. Zinc and cadmium speciation in subantarctic waters east of New Zealand. *Mar. Chem.* 87: 37-58.
- Espinosa-Carreón, T.L., Gaxiola-Castro, G., Robles-Pacheco, J.M., Nájera Martínez, S., 2001. Temperature, salinity, nutrients and chlorophyll a in coastal waters of the southern California Bight. *Cienc. Mar.* 27: 397-422.
- Fu, G., Allen, H.E., Cowan, C.E. 1991. Adsorption of cadmium and copper by manganese oxide. *Soil Sci.* 152: 72-81.
- Gadde, R.R., Laitinen, H.A. 1974. Heavy metal adsorption by hydrous iron and manganese oxides. *Anal. Chem.* 46: 2022-2026.
- Gault-Ringold, M., Adu, T., Stirling, C.H., Frew, R.D., Hunter, K.A. 2012. Anomalous biogeochemical behavior of cadmium in subantarctic surface waters: Mechanistic constraints from cadmium isotopes. *Earth Planet. Sc. Lett.* 341-344: 94-103.
- Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Granéli, E., Anderson, D.M. 2008. HAB and eutrophication. *Harmful Algae* 8: 1-188.
- Graham, W.M., Largier, J.L. 1997. Upwelling shadows as nearshore retention sites: the example of northern Monterey Bay. *Cont. Shelf Res.* 17: 509-532.
- González-Morales, A.T., Gaxiola Castro, G. 1991. Daily variation of physico-chemical characteristics, biomass and phytoplankton primary production in an upwelling coastal zone of Baja California. *Cien. Mar.* 17: 21-37.
- Helmers, E. 1994. Speciation of cadmium in seawater - a direct voltammetric approach. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350: 62-67.

- Huerta-Diaz, M.A., Morse, J.W. 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56: 2681-2702.
- Hutchins, D., DiTullio, G., Zhang, Y., Bruland, K., 1998. An iron limitation mosaic in the California upwelling regime. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1037-1054.
- Knauer, G.A., Martin, J.H., 1973. Seasonal variations of cadmium, copper, manganese, lead, and zinc in water and phytoplankton in Monterey Bay, California. *Limnol. Oceanogr.* 18: 597-604.
- Kudela, R.M., Cochlan, W.P. 2000. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off southern California. *Aquat. Microb. Ecol.* 21: 31-47.
- Kudela, R., Seeyave, S., Cochlan, W.P. 2010. The role of nutrient in regulation and promotion of harmful algal blooms in upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 55: 122-135.
- Kudo, I., Matsunaga, K., 1998. Behavior of Cu, Ni and Cd during nutrient depletion in a spring bloom in Funka Bay. *J. Oceanogr.* 54: 619-627.
- Kudo, I., Kokubun, H., Matsunaga, K. 1996. Chemical fractionation of phosphorus and cadmium in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Chem.* 52: 221-231.
- Lane, T.W., Morel, F.M.M. 2000. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiol.* 123: 345-352.
- Lane, E.S., Semeniuk, D.M., Strzepek, R.F., Cullen, J.T., Maldonado, M.T. 2009. Effects of iron limitation on intracellular cadmium of cultured phytoplankton: implications for surface dissolved cadmium to phosphate ratios. *Mar. Chem.* 115: 155-162.
- Lapointe, M., MacKenzie, T.D., Morse, D. 2008. An external d-Carbonic Anhydrase in a free-living marine dinoflagellate may circumvent diffusion-limited carbon acquisition. *Plant Physiol.* 147: 1427-1436.
- Lares, M.L., Marinone, S.G., Rivera-Duarte, I., Beck, A., Sañudo-Wilhelmy, S. 2008. Spatial variability of trace metals and inorganic nutrients in surface waters of Todos Santos Bay, México in summer of 2006 during a red tide bloom. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 707-716.
- Lares, M.L., Marinone, S.G., 2009. Comparison of cadmium and phosphate concentrations during red tide versus no red tide conditions. *J. Coastal Res.* 25: 832-835.
- Lee, J.G., Roberts, S.B., Morel, F.M.M. 1995. Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1056-1063.
- Loscher, B.M., de Jong, J.T.M., de Baar, H.J.W. 1998. The distribution and preferential biological uptake of cadmium at 6°W in the Southern Ocean. *Mar. Chem.* 62: 259-286.
- Luengen, A.C., Raimondi, P.T., Flegal, A.R. 2007. Contrasting biogeochemistry of six trace metals during the rise and decay of a spring phytoplankton bloom in San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.* 52: 1112-1130.
- Luoma, S.N., van Geen, A., Lee, B.G., Cloern, J.E. 1998. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in South San Francisco Bay: Implications for metal cycling in estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1007-1016.

- Mancilla-Peraza, M., Martínez, G.M. 1991. Variación estacional de la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la Bahía de Todos Santos, B.C. México (marzo de 1986 a junio de 1987). *Revista de Investigaciones Científicas* 2: 33-45.
- Mateos E., Marinone, S.G., Parés-Sierra, A. 2009. Towards the numerical simulation of the summer circulation in Todos Santos Bay, Ensenada, B.C. México. *Ocean Modelling* 27: 107-112.
- Mendoza-Lavaniegos, V. 2010. Variabilidad espacio-temporal de cobre y cadmio en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, en el periodo verano 2001 – primavera 2002. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 74 p.
- Noriki, S., Ishimori, N., Harada, K., Tsunogai, S. 1985. Removal of trace metals from seawater during a phytoplankton bloom as study with sediment traps in Funka Bay, Japan. *Mar. Chem.* 17: 75-89.
- Peña-Manjarrez, J.L, Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., Orellana-Cepeda, E., 2001. Cysts of *Lingulodinium polyedrum*, red tide producing organism in the Todos Santos Bay (winter-spring, 2000). *Cienc. Mar.* 27: 543-558.
- Peña-Manjarrez, J. L., Helenes, J., Gaxiola, G. Orellana, E., 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay. *Cont. Shelf Res.* 25: 1375-1393.
- Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Environmental factors influencing the variability of *Lingulodinium polyedrum* and *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) cyst production. *Cienc. Mar.* 35: 1-14.
- Pitcher, G.C., Figueiras, F.G., Hickey, B.M., Moita, M.T. 2010. The physical oceanography of upwelling systems and the development of harmful algal blooms. *Prog. Oceanogr.* 85: 5-32.
- Price, N.M., Morel, F.M.M. 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344: 658-660.
- Quevauviller, P., Vercoutere, K., Muntau, H., Griepink, B., 1993. Certified reference material (CRM 414) for the quality control of trace element analysis in plankton. *Fresenius J. Anal. Chem.* 345: 12-17.
- Ruiz-de la Torre, M.C., Maske, H., Ochoa, J., Almeda-Jauregui, C.O. 2013. Maintenance of coastal surface blooms by surface temperature stratification and wind drift. *PLoS ONE* 8, e58958.
- Ryan, J.P., Gower, J.F.R., King, S.A., Bissett, W.P., Fisher, A.M., Kudela, R.M., Zbigniew Kolber, Mazzillo, F., Rienecker, E.V., Chavez, F.P. 2008. A coastal ocean extreme bloom incubator. *Geophys. Res. Lett.* 35: L12602.
- Salamanca-Quevedo, E. 2013. Distribución y variabilidad temporal de cadmio en la bahía de Todos Santos: una región influenciada por la corriente de California y el fenómeno de surgencias. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México, 89 p.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Flegal, A.R. 1991. Trace element distribution in coastal waters along the US-Mexican boundary: relative contribution of natural processes vs anthropogenic inputs. *Mar. Chem.* 33: 371-392.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Flegal, A.R. 1996. Trace metal concentrations in the surf zone and in coastal waters off Baja California, México. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1575-1580.

- Segovia-Zavala, J.A., Delgadillo-Hinojosa, F., Alvarez-Borrego, S. 1998. Cadmium in the coastal upwelling area adjacent to the California-México border. *Estuar. Coast Shelf S.* 46: 475-481.
- Shipe, R.F., Leinweber, A., Gruber, N. 2008. Abiotic controls of potentially harmful algal blooms in Santa Monica Bay, California. *Cont. Shelf Res.* 28: 2584-2593.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd Ed. Fish. Res. Board of Canada, Ottawa. 310 p.
- Sunda, W. 2012. Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* 3: 204.
- Takesue, R.K., van Geen, A. 2002. Nearshore circulation during upwelling inferred from the distribution of dissolved cadmium off the Oregon coast. *Limnol. Oceanogr.* 47: 176-185.
- Takesue, R.K., van Gean, A., Carriquiri, J.D., Ortiz, E., Godínez-Horta, L., Granados, I., Saldivar, M., Ortlieb, L., Escribano, R., Guzmán, N., Castilla, J.C., Varas, M., Salamanca, M., Figueroa, C., 2004. Influence of coastal upwelling and El Niño-Southern Oscillation on nearshore water along Baja California and Chile: Shore-based monitoring during 1997-2000. *J. Geophys. Res.* 109: C03009.
- Tessier, A., Fortin, D., Belzile, N., DeVitre, R.R., Leppard, G.G. 1996. Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter: Narrowing the gap between field and laboratory measurements. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 387-404.
- Trick, C.G., Bill, B.D., Cochlan, W.P., Wells, M.L., Trainer, V.L., Pickell, L.D. 2010. Iron enrichment stimulates toxic diatom production in High Nitrate Low Chlorophyll areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 5887-5892.
- Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitative phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 9: 1-38.
- van Geen, A., Luoma, S.N. 1993. Trace metals (Cd, Cu, Ni, Zn) and nutrients in coastal waters adjacent to San Francisco Bay, California. *Estuaries* 16: 559-566.
- van Geen, A., Husby, D.M. 1996. Cadmium in the California Current System: tracer of past and present upwelling. *J. Geophys. Res.* 101: 389-3507.
- Wells, M.L., Mayer, L.M., Gillard, R.R.L. 1991. Evaluation of iron as a triggering factor for red tide blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69: 93-102.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., Morel, F.M.M. 2008. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* 452: 56-61.

Capítulo 2. Remoción de cadmio y fosfato por *Lingulodinium polyedrum* bajo condiciones representativas del medio natural

2.1. Introducción

Las interacciones entre metales traza (MT) y fitoplancton han sido estudiadas desde los años 70's, lo que ha permitido conocer las rutas por las que los MT pueden ser tomados y/o asimilados del medio (Sunda y Huntsman, 1998; Twing et al., 2004). Las bajas concentraciones de MT en el agua de mar son la causa y el resultado de que el fitoplancton haya desarrollado un sistema de asimilación eficiente y una capacidad de reemplazo de metales por otros para cumplir diferentes funciones metabólicas (Price y Morel, 2003). Algunos elementos traza, especialmente los esenciales, influyen en la producción oceánica, en el crecimiento del fitoplancton y en la estructura de la comunidad (Bruland et al., 1991; Wells et al., 1991; González-Dávila, 1995; Hutchins et al., 1998; Ho et al., 2003). Los MT especialmente los esenciales (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y Co), tienen un efecto directo en la fotosíntesis y en la respiración a nivel celular (Morel y Price, 2003). Inicialmente se pensaba que únicamente la disponibilidad de nutrientes (N y P) limitaba el desarrollo del fitoplancton; sin embargo, algunos MT (Fe, Co, Cu, Zn, Cd y Mn) al ser removidos por el fitoplancton de la superficie del mar pueden resultar co-limitantes para el crecimiento celular (Morel, 2008). Una vez en el interior de las células los MT (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Mo, Ni) influyen en su metabolismo, como consecuencia del papel que juegan como cofactores esenciales en metaloenzimas (Sunda, 1989).

El Cd no es un elemento esencial para los organismos marinos, aunque sus concentraciones están controladas por la actividad biológica del fitoplancton, como lo demuestra su distribución vertical tipo nutriente y su fuerte correlación con el PO_4^{3-} (Bruland et al., 1991; de Baar et al., 1994; Takesue y van Geen, 2002). El PO_4^{3-} es indispensable para el crecimiento del fitoplancton y es almacenado por las células como fuente de energía, ya que es utilizado para la producción de fosfolípidos, ATP y ácidos nucleicos. El Cd y el PO_4^{3-} son removidos en aguas superficiales (Noriki et al., 1985) y posteriormente son liberados durante los procesos de oxidación de la materia orgánica en su trayecto hacia el fondo del mar (Sunda, 2012). Cultivos de incubación con diatomeas, han demostrado que la remoción biológica de Cd en aguas superficiales del océano está relacionada con su utilización en la enzima anhidrasa carbónica (AC), ya que sirve como cofactor enzimático, sustituyendo al Zn en la AC-Zn cuando este elemento se encuentra en concentraciones limitantes (Price y Morel, 1990; Lee et al., 1995; Xu et al., 2008), o también puede ser utilizada directamente como una enzima específica (AC-Cd; Cullen et al., 1999). La enzima AC, que ya ha sido identificada en *Lingulodinium polyedrum* (Lapointe et al., 2008), está involucrada en la

asimilación de carbono inorgánico ya que cataliza el equilibrio entre HCO_3^- y CO_2 en la fotosíntesis, única función biológica del Cd conocida hasta el momento (Cullen et al., 1999). De esta manera, a bajas concentraciones el Cd podría funcionar como nutriente, en especial cuando hay limitación de Zn (Lee y Morel, 1995; Sunda y Huntsman, 2000; Lane et al., 2005; Xu et al., 2008).

Existen pocos trabajos de laboratorio sobre la capacidad de los dinoflagelados para acumular metales como el Cd, o el efecto que tiene este elemento sobre su ciclo de vida. La mayoría de los trabajos se han enfocado a evaluar la eficiencia de remoción de algunos metales y nutrientes pero con fines de bioremediación utilizando concentraciones que sobrepasan, por varios órdenes de magnitud, las concentraciones encontradas en el medio natural. Por ejemplo, en trabajos de remoción de Cd se ha reportado que el dinoflagelado *Prorocentrum micans* presentó un crecimiento normal a concentraciones < 3.5 nM, mientras que a elevadas concentraciones (10.7 - 890 nM) hubo una disminución o inhibición del crecimiento (Kayser y Sperling, 1980). Se ha reportado que a concentraciones de $4.4 \mu\text{M}$ de Cd las células de *L. polyedrum* se enquistan y abandonan la fase planctónica, mientras que a concentraciones de $23 \mu\text{M}$ hay mortalidad total (Okamoto et al. 1999). Romano (2010) observó mortandades de 50% de células de *L. polyedrum* durante las primeras 24 horas a concentraciones de $27 \mu\text{M}$ de Cd. Sin embargo, las utilizadas en estos trabajos son hasta 4×10^4 veces mayores que la concentración natural de Cd en el océano y, en particular, en las costas de Baja California y California ($\sim 0.1 - 1.0$ nM de Cd, Tabla 1.1).

Como resultado de la asimilación de Cd por el fitoplancton se han reportado, durante florecimientos fitoplanctónicos, incrementos en las concentraciones de Cd en el fitoplancton (Knauer y Martin, 1973; Kudo y Matsunaga, 1998; Cassis et al., 2011), así como una disminución y/o agotamiento en la concentración de Cd disuelto (Cd_d) en el Estuario Scheldt (Países Bajos, Zwolsman y van Eck, 1999) y en la Bahía de San Francisco (EUA, Luoma et al., 1998). De igual forma, se han observado disminuciones en las concentraciones de PO_4^{3-} en la Bahía de San Francisco (Luoma et al., 1998; Luengen et al., 2007) y en la Bahía Funka (Japón, Kudo y Matsunaga, 1998); resultados esperados en presencia de altas abundancias fitoplanctónicas. Es por ello que las altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} (máximos de 2.15 nM y $5.11 \mu\text{M}$, respectivamente) observadas en la Bahía de Todos Santos (BTS) por Lares et al. (2008) al final de un florecimiento del dinoflagelado *L. polyedrum* (FAD), el cual duró seis meses y fue uno de los más prolongados desde el primer registro en el 2000 para la BTS (Peña-Manjarrez et al., 2005), sugieren que los florecimientos de dinoflagelados, en particular de *L. polyedrum*, presentan un comportamiento diferente al de otros organismos fitoplanctónicos. Lares y Marinone (2009) proponen que *L. polyedrum* podría tener una alta capacidad de asimilación de Cd y PO_4^{3-} , los cuales pudieron liberarse al final del florecimiento por la remineralización de la gran cantidad

de materia orgánica producida y quedar atrapados en la superficie dadas las condiciones de estratificación de la columna de agua.

Con base en los antecedentes mencionados, se esperaba que *L. polyedrum* tuviera la capacidad de asimilar Cd y PO_4^{3-} del medio, lo cual se reflejaría en una disminución en la fase disuelta. Con el objetivo de conocer la capacidad de remoción de Cd y PO_4^{3-} por el dinoflagelado *L. polyedrum* bajo condiciones de laboratorio, se presentan en este trabajo los resultados obtenidos de tres tratamientos en cultivos batch, en donde las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd (0.690 ± 0.084 a 1.62 ± 0.18 nM) y PO_4^{3-} (0.922 ± 0.023 a 6.18 ± 0.16 μM), similares a las reportadas para la BTS durante el desarrollo de florecimientos algales de *L. polyedrum*. Adicionalmente, se realizó y un cuarto tratamiento en donde estaban representadas las concentraciones comúnmente utilizadas para cultivos de dinoflagelados (Medio L1). Estos cultivos de laboratorio fueron realizados para evaluar si las bajas o altas concentraciones de Cd y PO_4^{3-} tienen algún efecto sobre el ciclo de vida de *L. polyedrum*, así como en el desarrollo y mantenimiento de florecimientos algales.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Limpieza del material

Todo el material utilizado en la fase de experimentación se preparó utilizando técnicas de ultralimpieza que involucraron su lavado con jabón libre de fosfatos (Citrano[®]) al 2% (v/v), seguido de tres enjuagues con agua destilada y desionizada (ADD) grado Milli-Q ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, el material se dejó en un baño de HCl grado reactivo al 50%, seguido de otro baño de HNO_3 OmniTrace al 0.5%; en cada paso el material en ácido se calentó a 60°C en un horno durante 24 horas, seguido de tres enjuagues con ADD. Una vez terminados los enjuagues, el material se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C y 1.05 kg m^{-2} para evitar cualquier tipo de contaminación por bacterias y otros organismos. Todo el material se secó a temperatura ambiente durante dos días en una campana de flujo laminar ubicada en el interior de un cuarto ultralimpio Clase 100. Una vez seco, el material se guardó en doble bolsa de plástico Ziploc[®] hasta su uso posterior.

2.2.2. Microalga seleccionada y condiciones de cultivo

La microalga seleccionada fue el dinoflagelado *L. polyedrum*, proporcionado de cultivos preparados y aclimatados en el Laboratorio de Microbios Marinos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), México. El dinoflagelado se cultivó en medio “L1” (Guillard y Hargraves, 1993; Tabla 2.1), normalmente utilizado para el cultivo de dinoflagelados y otras microalgas. No fue

necesario agregar silicatos, ya que no es requerido por este organismo, pero si por las diatomeas para formar la pared celular (frústulas). Para preparar este medio de cultivo se utilizó agua de mar oceánica, recolectada el 7 de agosto de 2013 en el exterior de la Bahía de Todos Santos, aproximadamente a 16 km de las costas de Ensenada. El agua de mar se filtró en el laboratorio, inicialmente por gravedad a través de filtros Whatman® GF/F (0.7 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro) y posteriormente a través de filtros Nuclepore® de policarbonato (0.2 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro). Antes de preparar el medio de cultivo, el agua de mar se burbujeó con CO₂ (5 min L⁻¹ de agua de mar) para equilibrar el pH, se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121 °C y 1.05 kg m⁻² y finalmente se dejó equilibrar a temperatura ambiente.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo “L1” (Guillard y Hargraves, 1993) utilizado en los cultivos de *L. polyedrum*. Se indica la cantidad necesaria para preparar 1 L de agua de mar y la concentración final del medio.

Compuesto	Cantidad (mL)	Concentración final (M)
Solución de NaNO ₃	1.0	8.82 x 10 ⁻⁴
Solución de NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.0	3.62 x 10 ⁻⁵
Solución de Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	0.0	0.0
Solución de metales traza	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1.17 x 10 ⁻⁵
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.17 x 10 ⁻⁵
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	9.09 x 10 ⁻⁷
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.00 x 10 ⁻⁸
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	5.00 x 10 ⁻⁸
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁸
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	8.22 x 10 ⁻⁸
	H ₂ SeO ₃	1.00 x 10 ⁻⁸
	NiSO ₄ · 6H ₂ O	1.00 x 10 ⁻⁸
	Na ₃ VO ₄	1.00 x 10 ⁻⁸
	K ₂ CrO ₄	1.00 x 10 ⁻⁸
Solución de vitaminas	Tiamina · HCl (B ₁)	2.96 x 10 ⁻⁷
	Biotina (H)	2.05 x 10 ⁻⁹
	Cianocobalamina (B ₁₂)	3.69 x 10 ⁻¹⁰

Para *L. polyedrum* se han establecido como condiciones óptimas de crecimiento (Peña-Manjarrez, 2008) una temperatura de 20 °C, irradiancia PAR de 100 µmol cuanta m⁻² s⁻¹ y sin limitación de nutrientes. Con base en estas consideraciones se manejaron condiciones controladas de irradiancia (100 µmol cuanta m² s⁻¹) con lámparas de luz fluorescente marca Philips catálogo F40T12/DX, temperatura (20 °C) y un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas. La aclimatación de los cultivos se realizó durante un mes en cultivos batch que iniciaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL, haciendo recambios de mantenimiento cada ocho días, tiempo estimado en que *L. polyedrum*

alcanza la fase de crecimiento exponencial bajo condiciones controladas. Finalmente, para tener la biomasa suficiente para inocular 12 matraces de 700 mL, cada uno con 1 mL (aproximadamente 0.1×10^6 células L^{-1}), el cultivo se escaló gradualmente a volúmenes progresivamente mayores hasta obtener 1 L.

2.2.3. Diseño experimental

La parte experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas I del Departamento de Acuicultura del CICESE. Se realizaron cultivos en lotes no axénicos en matraces Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad con 700 mL de medio de cultivo L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Este cultivo fue cosechado durante la fase exponencial de crecimiento y fue usado como inóculo para iniciar los cultivos experimentales. Al inicio del experimento se transfirió 1 mL del stock de células a cada uno de los tratamientos (Tabla 2.2), en atmósfera estéril dentro de una cámara de flujo laminar y junto a un mechero. Los cultivos se mantuvieron en cámaras incubadoras (VWR Scientific, modelo 2015) bajo las mismas condiciones de temperatura, irradiancia y fotoperiodo mencionadas en la sección de 2.2.2 en las condiciones de cultivo.

Tabla 2.2. Condiciones experimentales promedio ($\pm$ una desviación estándar; $n = 3$) al inicio del experimento de remoción de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} por *Lingulodinium polyedrum*. El agua de mar con la que se preparó el medio de cultivo tenía una concentración de $Cd = 0.121 \pm 0.005$ nM ($n = 3$). FAD = florecimiento algal del dinoflagelado *L. polyedrum*.

Condición representativa	Cd_d (nM)	PO_4^{3-} (μ M)	Abundancia celular ($\times 10^6$ cél L^{-1})
FAD-2011	0.690 ± 0.084	0.922 ± 0.023	0.096 ± 0.016
Intermedio	0.99 ± 0.59	3.746 ± 0.028	0.182 ± 0.049
FAD-2005*	1.62 ± 0.18	6.18 ± 0.16	0.186 ± 0.068
Medio L1	0.357 ± 0.097	23.1 ± 2.5	0.106 ± 0.036

*Lares et al. (2008)

El diseño experimental involucró cuatro tratamientos mantenidos por triplicado, cada uno con su control (e.g., sin agregar células de *L. polyedrum*) y con diferentes concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} . Las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} fueron seleccionadas con el objetivo de representar valores reportados en condiciones naturales en la BTS durante florecimientos de *L. polyedrum*: (1) FAD-2011, que representa valores similares a los registrados durante el FAD de 2011 (Capítulo 1); (2) FAD-2005, que representa máximas concentraciones reportadas durante la etapa final de un FAD en el 2005 (Lares et al., 2008); (3) Intermedio, que representa valores intermedios entre el FAD-2005 y FAD-2011, pero que a su vez representa concentraciones similares a las reportadas en Baja California y California en ausencia de FAD (Tabla 1.1; Capítulo 1); y, (4) Medio-L1, utilizando las concentraciones

naturales del agua de mar filtrada del exterior de la BTS y las concentraciones de los nutrientes contenidas en el medio “L1” (Tabla 2.2). Los controles para cada uno de los tratamientos se realizaron con el objetivo de monitorear que no se diera adsorción a las paredes del matraz o que no ocurriera algún tipo de reacción o precipitación que modificara las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} .

Las concentraciones finales de Cd para cada uno de los tratamientos se obtuvieron utilizando una solución madre de Cd con una concentración de 1 μM . La solución fue preparada con CdCl_2 y con la misma agua de mar filtrada que se utilizó para preparar el medio de cultivo. A partir de esta solución y teniendo en cuenta la concentración de Cd en el agua de mar filtrada, se agregaron los volúmenes necesarios a cada uno de los tratamientos hasta obtener la concentración de Cd deseada. Para obtener las concentraciones de PO_4^{3-} establecidas, a partir de la solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, adquirida para la preparación del medio “L1”, se agregó un volumen definido a cada tratamiento. Adicionalmente, se midió el pH de cada una de las réplicas con un potenciómetro Hanna para celdas de 1 mL, al inicio (día 0), a las 24 horas y, posteriormente, cada tercer día hasta el final del experimento (día 10).

2.2.4. Crecimiento de los cultivos de *L. polyedrum*

El incremento en el número de células de *L. polyedrum* se midió durante diez días de cultivo, mediante conteo celular utilizando un microscopio Carl Zeiss (Lambda LS, Sutter, 100X). Las células se colocaron en una cámara Palmer-Maloney con capacidad de 0.1 mL. Se dio seguimiento al crecimiento de los tratamientos realizando conteos cada tercer día de una submuestra de 1 mL de cada cultivo, obtenida en atmósfera estéril en una cámara de flujo laminar con mechero. Las muestras para el conteo de *L. polyedrum* se fijaron con una solución saturada de lugol-acetato para inmovilizar y preservar las células. Con las abundancias celulares se construyeron curvas de crecimiento para cada tratamiento y se calculó la tasa de crecimiento (μ) durante la fase exponencial (Fogg y Thake, 1987) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{(\log_2 n_2 - \log_2 n_1)}{t_2 - t_1} \quad (2.1)$$

En donde μ es la tasa máxima de crecimiento de *L. polyedrum* durante la fase de crecimiento exponencial, n_2 y n_1 corresponden a la abundancia celular en el tiempo final e inicial, respectivamente, y $t_2 - t_1$ es el intervalo de tiempo transcurrido entre un muestreo y el siguiente.

2.2.5. Remoción de Cd y PO_4^{3-}

Para evaluar la cantidad de Cd y PO_4^{3-} removido por *L. polyedrum* en cada condición experimental, se tomaron alícuotas (50 a 60 mL) de cada tratamiento al inicio del

experimento (día 0), a las 24 h (día 1) y posteriormente cada tercer día hasta completar 10 días de cultivo, sin reponer el volumen extraído. Cada submuestra de agua, se filtró utilizando una jeringa con émbolo Norm-Ject® provista de un portafiltro, al cual se le colocaron filtros Nucleopore® de policarbonato (0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro) previamente lavados con HCl al 30% (OmniTrace®), HNO₃ 1% (OmniTrace Ultra®) y ADD. De la muestra filtrada se tomaron 5 mL para el análisis de PO₄³⁻, 1.5 mL para medir el pH y el volumen restante, utilizado para el análisis de Cd, se acidificó con 1.0 mL de HNO₃ concentrado (OmniTrace Ultra) por cada litro de agua (pH < 2). El Cd disuelto fue preconcentrado, dentro de un cuarto ultralimpio, utilizando una resina de intercambio iónico Chelex-100® (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), de acuerdo a la técnica descrita por Bruland et al. (1979).

El Cd_d se cuantificó con un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS; AAnalyst 600, Perkin-Elmer) utilizando el método de adición estándar para compensar por efectos de matriz. La exactitud y precisión del método se evaluó utilizando el material de referencia certificado para agua de mar CASS-5 (Canadian Research Council of Canada). El porcentaje de recuperación para Cd_d fue de 93 ± 4%, con una precisión de 5.6% (Tabla 1.2). Los blancos de procedimiento se analizaron igual que las muestras, pero utilizando ADD. Los límites de detección se calcularon como tres veces la desviación estándar del blanco de procedimiento (Tabla 1.2).

Las concentraciones de PO₄³⁻ se determinaron utilizando el método del ácido ascórbico descrito para un Hach (Hach, 1997). Se tomaron 5 mL del agua de mar filtrada a los cuales se les agregó un sobre de un reactivo de fosfato (PhosVer® 3). La reacción produjo un color azul cuya absorbancia fue medida a 885 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Hach modelo DR/4000 UV-VIS. Adicionalmente, se realizaron curvas de calibración utilizando la solución stock de fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄·H₂O) adquirida para la preparación del medio L1.

La concentración de Cd (y PO₄³⁻) removida por *L. polyedrum*, se calculó como la diferencia entre la concentración inicial y final. Adicionalmente, para considerar las variaciones en las concentraciones entre días de muestreo, se calculó la concentración de Cd y PO₄³⁻ removida acumulada ($\Sigma R_{\text{día } x}$) expresada como la sumatoria de las concentraciones removidas cada día de muestreo utilizando la siguiente ecuación:

$$\Sigma R_{\text{día } x} = C_{\text{día } x-i} - C_{\text{día } x} \quad (2.2)$$

Donde $R_{\text{día } x}$ es la concentración de Cd (o PO₄³⁻) removido por *L. polyedrum* cada día de muestreo ($x = 1, 3, 5, 7$ y 10), $C_{\text{día } x}$ es la concentración de Cd o PO₄³⁻ (nmol L⁻¹ y µmol L⁻¹, respectivamente) en el medio de cultivo para cada día de muestreo y $C_{\text{día } x-i}$ es la concentración de Cd o PO₄³⁻ el día de muestreo previo al día x . El Cd y PO₄³⁻ removido por *L. polyedrum* se calculó en términos de cantidad removida por cada litro

de solución para poder comparar estos resultados con las concentraciones en el medio natural, razón por la cual se expresa en unidades de concentración (nmol L^{-1} y $\mu\text{mol L}^{-1}$, Cd y PO_4^{3-} respectivamente). Adicionalmente, teniendo en cuenta la cinética de remoción de Cd y PO_4^{3-} durante el tiempo de los cultivos, se calcularon las tasas de remoción, de primer orden para el Cd y de orden cero para el PO_4^{3-} .

Con el objetivo de eliminar la variabilidad ocasionada por los cambios en las abundancias celulares durante el desarrollo del cultivo, se calculó la cantidad de Cd y PO_4^{3-} removida por célula durante el transcurso del experimento. La concentración removida cada día de muestreo (ecuación 2.2) se normalizó por el número de células L^{-1} del día respectivo, mediante la siguiente ecuación:

$$R_{\text{célula}} = \frac{(C_{\text{día } x-i} - C_{\text{día } x})}{\text{cél}_{\text{día } x}} \quad (2.3)$$

En donde $R_{\text{célula}}$ es la cantidad de Cd o PO_4^{3-} removida por cada célula de *L. polyedrum* (nmol célula^{-1} y $\mu\text{mol célula}^{-1}$, respectivamente), C es la concentración de Cd o PO_4^{3-} en el medio de cultivo cada día ($x = 1, 3, 5, 7$ y 10) de muestreo, $C_{\text{día } x-i}$ es la concentración de Cd o PO_4^{3-} el día de muestreo previo al día x y, finalmente, $\text{cél}_{\text{día } x}$ corresponde al número de células L^{-1} presentes el día x . Para el caso de los controles experimentales de cada uno de los tratamientos, los resultados indicaron que no se removió Cd ni PO_4^{3-} durante las primeras 24 horas, pero al tercer día ya se había removido entre 7 a 15% del Cd_0 inicial (a excepción del medio L1) y entre 1 a 3% de PO_4^{3-} inicial (en los controles experimentales Medio L1 y FAD-2005, respectivamente).

2.2.6. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar las diferencias en los resultados experimentales entre tratamientos a lo largo del tiempo para cada una de las variables medidas, tales como abundancias celulares, concentración de Cd y PO_4^{3-} en el medio y concentración de Cd y PO_4^{3-} removido. El objetivo de los análisis de covarianza fue identificar si las variables antes mencionadas presentaban una variación a lo largo del tiempo (covariante). En caso de presentarse diferencias significativas, se realizaron pruebas Fisher para ver en donde radicaban las diferencias. También se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) para analizar las diferencias en las tasas de crecimiento calculadas para los tratamientos. Estas pruebas también se realizaron con los resultados de todas las variables medidas (e.g., abundancias celulares, concentración de Cd y PO_4^{3-} en el medio y concentración de Cd y PO_4^{3-} removido) al final del experimento, para ver si se presentaron diferencias entre tratamientos. En caso de no cumplirse con los supuestos de normalidad, se realizaron análisis de varianza por rangos (Kruskal-Wallis). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SigmaStat 3.5, considerando un nivel de probabilidad $P \leq 0.05$.

2.3. Resultados

2.3.1. Crecimiento de *L. polyedrum*

La abundancia celular con la que iniciaron los cuatro tratamientos varió entre $(0.096 \pm 0.016) \times 10^6$ cél L⁻¹ y $(0.186 \pm 0.068) \times 10^6$ cél L⁻¹ (FAD-2011 y FAD-2005, respectivamente; Figura 2.1); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $P = 0.11$, Tabla 2.2). Durante los diez días del cultivo, se observó un constante y significativo incremento en la abundancia celular (ANOCOVA, $P < 0.001$). En las curvas de crecimiento se pudo observar que *L. polyedrum* alcanzó la fase exponencial de crecimiento entre el primer y tercer día de iniciado el cultivo (Figura 2.1). Una vez alcanzada la fase exponencial, se calcularon las tasas de crecimiento (μ) en cada tratamiento y, aunque estuvieron en el intervalo 0.520 ± 0.015 y 0.645 ± 0.055 divisiones d⁻¹ (FAD-2011 y Medio L1, respectivamente), no fueron significativamente diferentes (ANOVA, $P = 0.203$; Tabla 2.3).

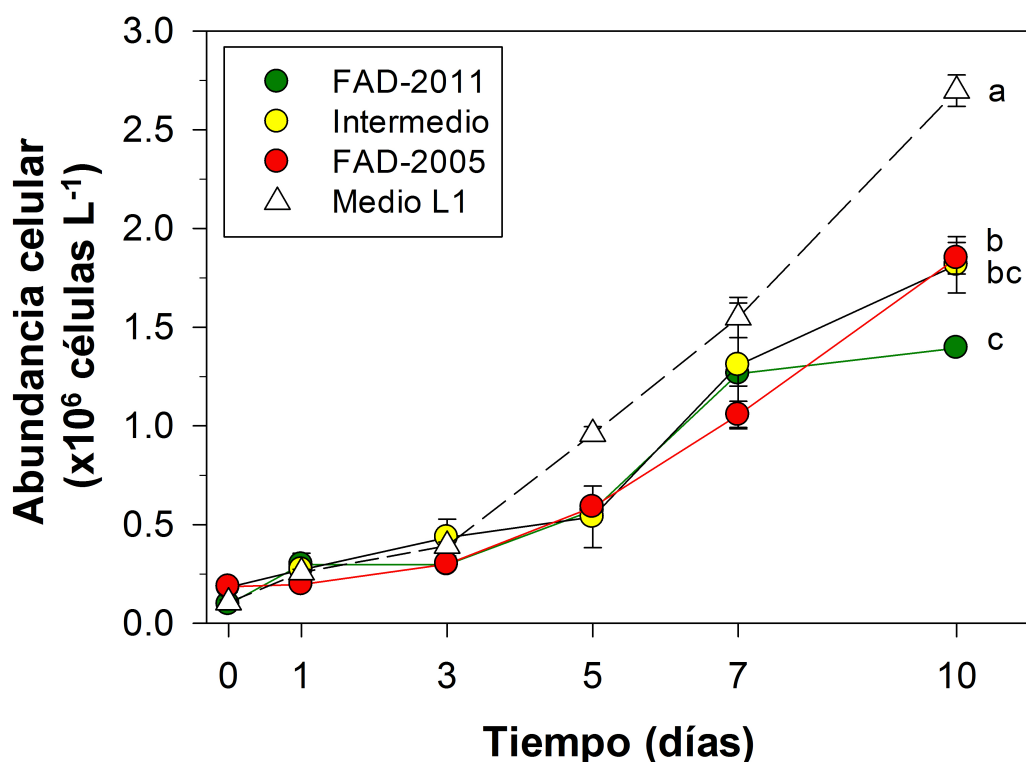


Figura 2.1. Curvas de crecimiento de *L. polyedrum* con diferentes concentraciones de Cd disuelto (Medio L1: 0.357 nM, FAD-2011: 0.690 nM, Intermedio: 0.99 nM y FAD-2005: 1.62 nM) y PO₄³⁻ (FAD-2011: 0.922 μM, Intermedio: 3.746 μM, FAD-2005: 6.18 μM y Medio L1: 23.1 μM) en función del tiempo. Valores promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$); FAD: florecimiento algal de *L. polyedrum*. Las letras indican diferencias significativas en la abundancia celular entre tratamientos, al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).

Tabla 2.3. Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar; $n = 3$) de los parámetros de las curvas de crecimiento de *L. polyedrum*, abundancia celular inicial (A_i), final (A_f), tasas de crecimiento (μ) y días en fase exponencial; así como de las variables medidas: Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} total removidos, acumulados, y tasas de remoción de Cd y PO_4^{3-} . Tratamientos con diferentes concentraciones iniciales de Cd_d (nM) y PO_4^{3-} (μ M): 0.357 y 23.1 (Medio L1), 0.690 y 0.922 (FAD-2011), 0.99 y 3.746 (Intermedio), y 1.62 y 6.18 (FAD-2005). FAD: florecimiento algal de *L. polyedrum*. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).

Parámetros y variables	Tratamientos			
	Medio L1	FAD-2011	Intermedio	FAD-2005
A_i ($\times 10^6$ cél L^{-1})	$0.106 \pm 0.036^{(a)}$	$0.096 \pm 0.016^{(a)}$	$0.182 \pm 0.049^{(a)}$	$0.186 \pm 0.068^{(a)}$
A_f ($\times 10^6$ cél L^{-1})	$2.70 \pm 0.24^{(a)}$	$1.432 \pm 0.038^{(c)}$	$1.82 \pm 0.29^{(bc)}$	$1.85 \pm 0.24^{(b)}$
μ (división d^{-1})	$0.645 \pm 0.055^{(a)}$	$0.520 \pm 0.015^{(a)}$	$0.603 \pm 0.082^{(a)}$	$0.579 \pm 0.085^{(a)}$
Días en fase exponencial	3 a 10	3 a 7	5 a 10	3 a 10
Cd (nmol L^{-1}) removido	0.24 ± 0.10	0.459 ± 0.082	0.63 ± 0.43	0.93 ± 0.18
Cd removido acumulado	$0.29 \pm 0.12^{(b)}$	$0.541 \pm 0.077^{(b)}$	$0.68 \pm 0.36^{(b)}$	$1.32 \pm 0.40^{(a)}$
Cd removido total (%)	66	67	64	58
El día 1	65	62	32	53
PO_4^{3-} (μ mol L^{-1}) removido	7.3 ± 2.3	0.44 ± 0.12	3.071 ± 0.028	5.71 ± 0.17
PO_4^{3-} removido acumulado	$14.7 \pm 1.4^{(a)}$	$0.82 \pm 0.31^{(d)}$	$3.64 \pm 0.50^{(c)}$	$5.79 \pm 0.31^{(b)}$
PO_4^{3-} removido total (%)	31	48	82	92
Tasa remoción Cd (nmol $L^{-1} d^{-1}$)	0.025 ± 0.007	0.051 ± 0.011	0.135 ± 0.025	0.176 ± 0.045
Tasa remoción PO_4^{3-} (μ mol $L^{-1} d^{-1}$)	1.36 ± 0.34	0.093 ± 0.025	0.356 ± 0.035	0.556 ± 0.041

2.3.2. Remoción de Cd

Los cultivos iniciaron con concentraciones promedio de Cd_d de 0.357 ± 0.097 nM (Medio L1), 0.690 ± 0.084 nM (FAD-2011), 0.99 ± 0.59 nM (Intermedio) y 1.62 ± 0.18 nM (FAD-2005), las cuales disminuyeron posteriormente, pero sin llegar a agotarse (Figura 2.2a). Al final del experimento, se habían removido con relación al Cd_d inicial 0.24 ± 0.10 , 0.44 ± 0.12 , 3.071 ± 0.028 y 5.71 ± 0.17 nM, respectivamente (Tabla 2.3). Estos valores indican que *L. polyedrum* no consumió todo el Cd del medio, quedando disponible entre el 34 y el 36% del Cd inicial. El quinto día se observó un aumento en la concentración de Cd_d en todos los tratamientos (entre 5 – 44%), este incremento en

concentración fue significativamente (Fisher, $P < 0.05$) mayor en el tratamiento en donde *L. polyedrum* fue expuesto a la mayor concentración de Cd_d (FAD-2005).

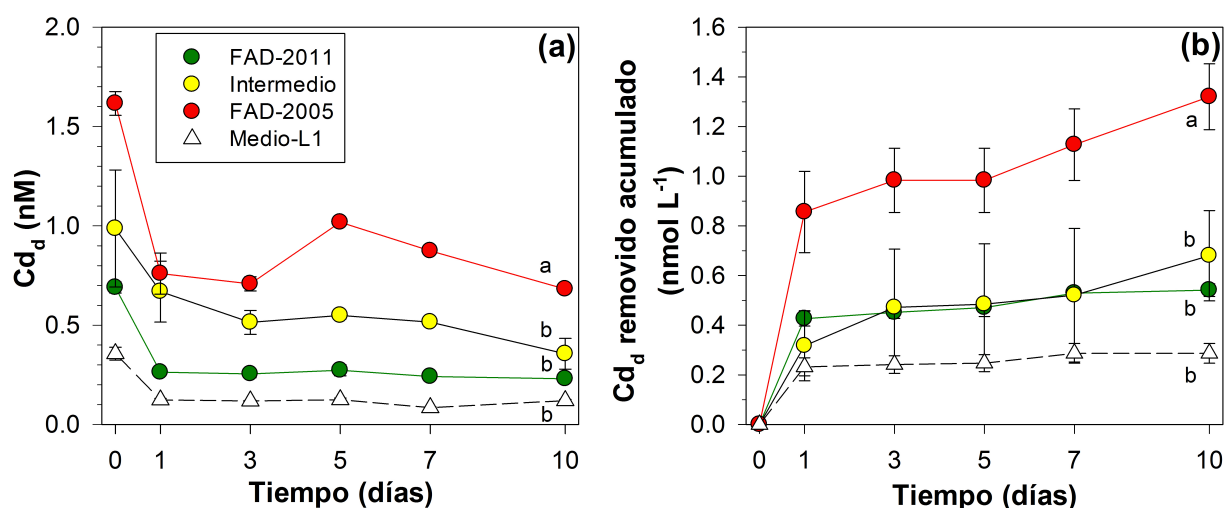


Figura 2.2. Concentraciones promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de (a) Cd disuelto (Cd_d), y (b) Cd removido acumulado en función del tiempo, en cultivos de *L. polyedrum* expuestos a diferentes concentraciones de Cd : 0.357 nM (Medio L1), 0.690 nM (FAD-2011), 0.99 nM (Intermedio) y 1.62 nM (FAD-2005). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).

La concentración promedio de Cd removido acumulado (0.29 ± 0.12 , 0.541 ± 0.077 , 0.68 ± 0.36 y 1.32 ± 0.40 nmol L⁻¹) en los tratamientos Medio L1, 2011, Intermedio y 2005, respectivamente, fue mayor que la concentración total removida (Tabla 2.3). En el tratamiento FAD-2005 la remoción fue 1.6 a 4.3 veces mayor y significativamente diferente (Fisher, $P < 0.01$) de los demás tratamientos (Tabla 2.3). El Cd se removió preferentemente durante las primeras 24 horas de exposición (92 – 99% del Cd total removido: Medio L1, FAD-2011 y FAD-2005). No se encontró evidencia estadística de que el tiempo tuviera un efecto significativo en el Cd removido (ANCOVA, $P > 0.05$; Figura 2.2b). En la Figura 2.3 se puede observar que la remoción de Cd por célula ($[0.0090 \pm 0.0042] \times 10^{-4}$ a $[0.046 \pm 0.028] \times 10^{-4}$ nmol cél⁻¹) fue mayor el primer día de exposición, cuando la abundancia celular era baja ($[0.096 \pm 0.016] \times 10^6$ a $[0.186 \pm 0.068] \times 10^6$ cél L⁻¹, Figura 2.1) y por lo general las células removieron más Cd en el tratamiento FAD-2005 (Figura 2.3b). Las tasas de remoción de Cd se calcularon mediante un modelo logarítmico, el cual coincidió con la tendencia de remoción de Cd a lo largo del tiempo en todos los tratamientos (Figura 2.2b). Los modelos logarítmicos se caracterizan por un período de rápido incremento, seguido de una fase lenta de incremento. Las tasas de remoción de Cd estuvieron en el intervalo de 0.025 ± 0.007 a 0.176 ± 0.045 nmol L⁻¹ d⁻¹, siendo mayores en los tratamientos expuestos a mayores concentraciones iniciales de Cd_d . En el tratamiento en donde *L. polyedrum* fue

expuesto a la mayor concentración de Cd_d (FAD-2005), la tasa de remoción fue aproximadamente 1.3 a 7.0 veces mayor y significativamente diferente (Fisher, $P = 0.04$) de los demás tratamientos (Tabla 2.3). Pasado el tercer día se tuvieron problemas con la manipulación de los controles, por lo que sólo se pueden comparar los datos hasta el tercer día; sin embargo, no representa ningún problema en la interpretación de los resultados de Cd removido, puesto que casi toda la remoción en los cultivos se dio al inicio del experimento y esto no sucedió en los controles.

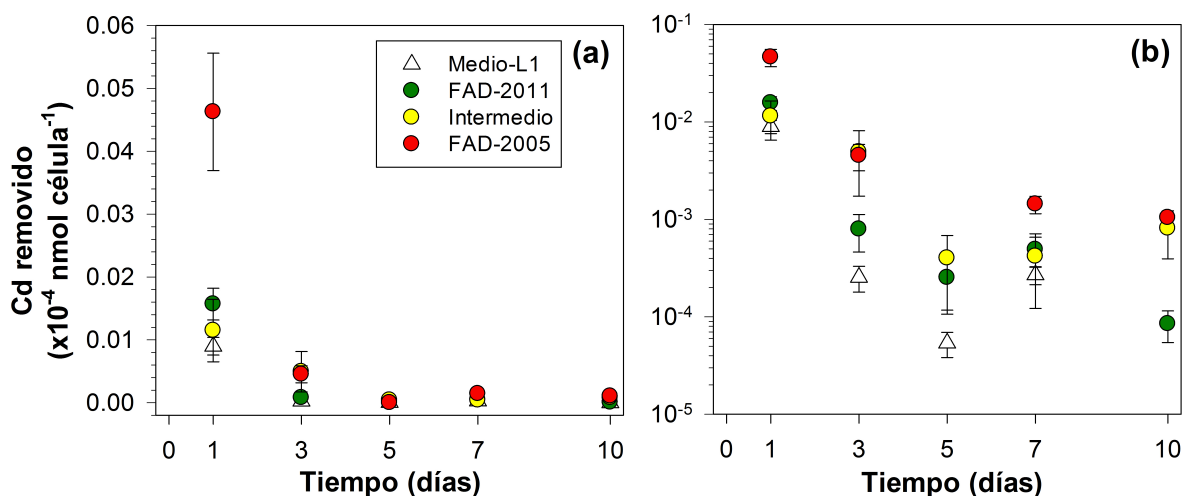


Figura 2.3. Cantidad de Cd removida promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) por célula en función del tiempo, en cultivos de *L. polyedrum* expuestos a diferentes concentraciones iniciales de Cd : 0.357 nM (Medio L1), 0.690 nM (FAD-2011), 0.99 nM (Intermedio) y 1.62 nM (FAD-2005). Representado en (a) escala lineal y en (b) escala logarítmica.

2.3.3. pH

El pH mostró una tendencia a incrementarse con el tiempo de cultivo en todos los tratamientos, con valores entre 7.9 y 8.1 al inicio y entre 8.7 a 8.8 al final de los cultivos. Estas diferencias en pH representaron, en algunos casos, un incremento de pH de hasta 0.9 unidades de pH para el tratamiento Medio L1. El incremento en el pH, como era de esperarse, está relacionado con el crecimiento celular asociado a la actividad fotosintética.

2.3.4. Remoción de PO_4^{3-}

Los cultivos de *L. polyedrum* iniciaron con concentraciones promedio de PO_4^{3-} de $23.1 \pm 2.5 \mu M$ (Medio L1), $0.922 \pm 0.023 \mu M$ (FAD-2011), $3.746 \pm 0.028 \mu M$ (Intermedio) y $6.18 \pm 0.16 \mu M$ (FAD-2005), las cuales disminuyeron hasta alcanzar valores de $15.8 \pm 1.8 \mu M$ (Medio L1), $0.48 \pm 0.14 \mu M$ (FAD-2011), $0.67 \mu M$ (Intermedio; promedio de dos valores) y $0.47 \pm 0.08 \mu M$ (FAD-2005), al final del experimento (Figura

2.4a). De manera similar al Cd_d , el PO_4^{3-} en ningún caso se agotó y al final del experimento quedaron disponibles 8, 18, 52 y 69% de la concentración inicial de este nutriente (FAD-2005, Intermedio, FAD-2011 y Medio L1; respectivamente). Si se comparan los tratamientos en donde las concentraciones iniciales de PO_4^{3-} se consideran representativas del medio natural (e.g., FAD-2011, Intermedio, FAD-2005), entonces no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones residuales al final de los cultivos (ANOVA, $P > 0.05$). Sin embargo, el Medio L1, expuesto a la más alta concentración de PO_4^{3-} , sí fue significativamente diferente (Fisher, $P < 0.01$) de los demás tratamientos, aunque hay que hacer notar que estos valores no se observan comúnmente en el océano.

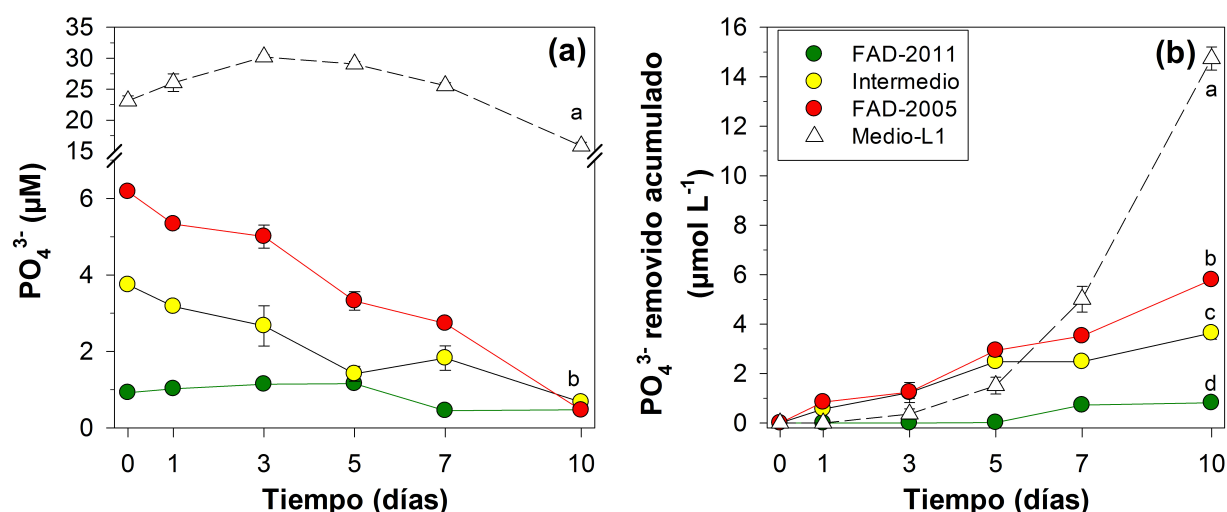


Figura 2.4. Concentración promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de (a) PO_4^{3-} en el medio y (b) PO_4^{3-} removido acumulado en cultivos de *L. polyedrum* expuestos a diferentes concentraciones de PO_4^{3-} : 0.922 μM (FAD-2011), 3.746 μM (Intermedio), 6.18 μM (FAD-2005) y 23.1 μM (Medio L1) en función del tiempo. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos al final del experimento, en donde $a > b > c$ (Fisher; $P \leq 0.05$).

La remoción de PO_4^{3-} fue gradual y significativa con el tiempo (ANCOVA, $P < 0.01$; Figura 2.4b). En los tratamientos FAD-2005 ($5.79 \pm 0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Intermedio ($3.64 \pm 0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) la remoción acumulada de PO_4^{3-} fue 7.0 y 4.4 veces mayor y significativamente diferente (Fisher, $P < 0.01$) a la del tratamiento FAD-2011 ($0.82 \pm 0.10 \mu\text{mol L}^{-1}$) que incluyó una menor concentración de PO_4^{3-} (Figura 2.4b). La concentración de PO_4^{3-} removida con relación a la concentración inicial (0.73 ± 0.23 , 0.44 ± 0.12 , 3.071 ± 0.028 y $5.71 \pm 0.17 \text{ nmol L}^{-1}$), al igual que para el Cd, fue menor que la concentración removida acumulada (Medio L1, 2011, Intermedio y 2005, respectivamente Tabla 2.3). Las tasas de remoción, calculadas en los tratamientos FAD-2005 e Intermedio (0.556 ± 0.041 y $0.356 \pm 0.035 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente), fueron 6.0 y 1.6 veces mayores y significativamente diferentes de la calculada para el

tratamiento FAD-2011 ($0.093 \pm 0.025 \mu\text{mol L}^{-1} \text{d}^{-1}$, Tabla 2.3). En la Figura 2.5 se puede observar que en los tratamientos FAD-2011, Intermedio y FAD-2005, la remoción de PO_4^{3-} por célula (rango de 0.006×10^{-4} - $0.032 \times 10^{-4} \mu\text{mol cél}^{-1}$) a diferencia del Cd, no se puede explicar por la presencia de altas o bajas abundancias celulares. A diferencia de los demás tratamientos en el Medio-L1 las células consumieron más PO_4^{3-} a medida que aumentaba la abundancia de células en el medio (Figura 2.5). No se observó ningún cambio en la concentración de PO_4^{3-} en los controles hasta el tercer día, después de este día no podemos comparar con los controles, ya que a diferencia del Cd, el PO_4^{3-} se removió de forma gradual.

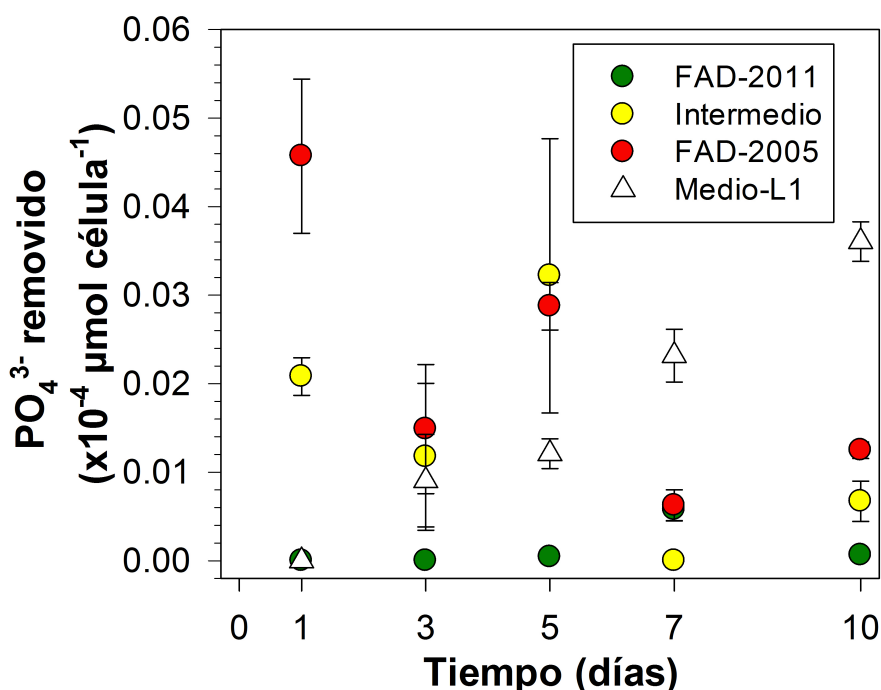


Figura 2.5. Cantidad de PO_4^{3-} removida promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) por célula en función del tiempo, en cultivos de *L. polyedrum* expuestos a diferentes concentraciones iniciales de PO_4^{3-} : $0.922 \mu\text{M}$ (FAD-2011), $3.746 \mu\text{M}$ (Intermedio), $6.18 \mu\text{M}$ (FAD-2005) y $23.1 \mu\text{M}$ (Medio L1).

2.3.5. Relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en los cultivos de *L. polyedrum*

La relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en los tratamientos expuestos a concentraciones representativas del medio natural fue altamente variable en el tiempo (de 0.199 ± 0.033 a $1.49 \pm 0.25 \text{ nM}/\mu\text{M}$), con una tendencia a incrementarse con el paso del tiempo (Figura 2.6). Durante los primeros siete días, la relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en el tratamiento Intermedio presentó la misma tendencia que en el FAD-2005, a pesar de la variabilidad observada con el tiempo (de 0.199 ± 0.033 a $0.324 \pm 0.051 \text{ nM}/\mu\text{M}$, Figura 2.6). En el tratamiento FAD-2011, a diferencia de los otros tratamientos, se registraron valores

elevados el primer día (0.75 ± 0.11 nM/ μ M), los cuales disminuyeron a valores menores a la razón calculada los días 1 a 5. Sin embargo, cuando la abundancia de células llegó a valores $\geq 1.4 \times 10^6$ cél L⁻¹ (día 7), la relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ se incrementó en todos los tratamientos. Al final del experimento, el tratamiento expuesto a las más altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} (FAD-2005) presentó una relación $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ de 1.49 ± 0.25 nM/ μ M, valor aproximadamente tres veces mayor y significativamente diferente (Fisher, $P < 0.001$) de los tratamientos FAD-2011 e Intermedio (0.51 ± 0.14 y 0.53 ± 0.23 nM/ μ M, respectivamente). La razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en el tratamiento Medio-L1 fue muy baja ($< 0.016 \pm 0.004$ nM/ μ M) debido a las altas concentraciones de PO_4^{3-} utilizadas (23.1 ± 2.5 nM/ μ M, Figura 2.6). En los tratamientos expuestos a concentraciones de Cd y PO_4^{3-} representativas de las condiciones reportadas (Lares et al., 2008; Gutierrez-Mejia et al., 2016) en el medio natural (FAD-2011, Intermedio y FAD-2005;), las relaciones $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ promedio por día tendieron a incrementarse con el incremento en la abundancia de células de *L. polyedrum* (Figura 2.7), aunque no se encontraron correlaciones significativas ($P > 0.05$) entre estos dos parámetros.

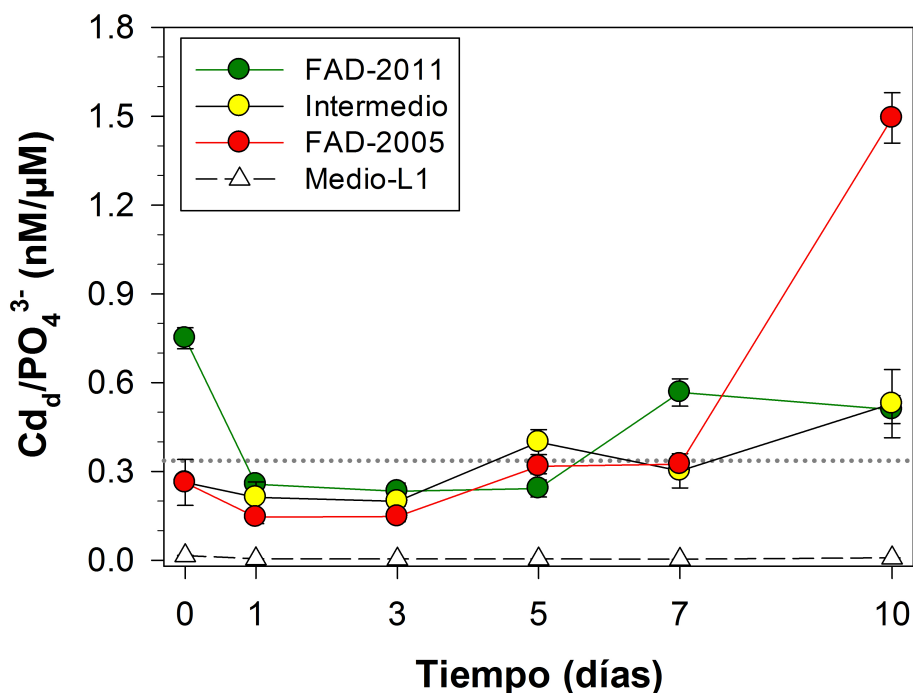


Figura 2.6. Valores promedio ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) diario de la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ en función del tiempo calculada en cultivos de *L. polyedrum* expuestos a diferentes concentraciones de Cd y PO_4^{3-} , representativas de condiciones reportadas en el medio natural (FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) y utilizadas en el cultivo de microalgas (Medio-L1). La línea punteada horizontal discontinua indica la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ calculada a partir de las concentraciones superficiales de Cd_d y PO_4^{3-} reportadas para las costas de California y del Pacífico de Baja California (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996).

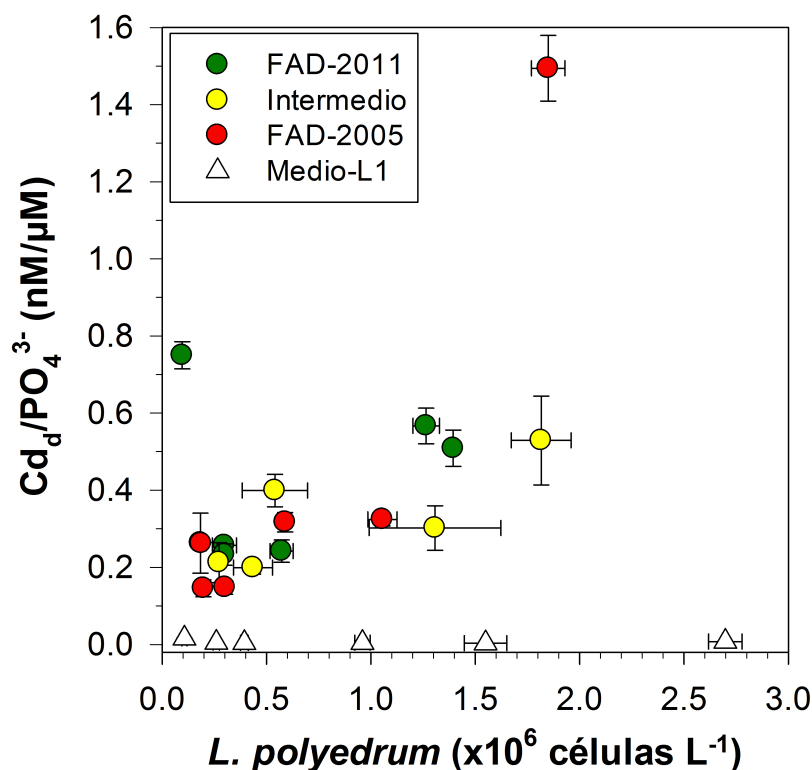


Figura 2.7. Relación entre el promedio diario ($\pm$ un error estándar; $n = 3$) de la razón $\text{Cd}_d/\text{PO}_4^{3-}$ y la abundancia de células de *L. polyedrum* en tres tratamientos (FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) expuestos a diferentes concentraciones de Cd y PO_4^{3-} representativas de condiciones reportadas en el medio natural.

2.4. Discusión

Los cultivos de *L. polyedrum* tendieron a incrementar su abundancia con el tiempo (Figura 2.1), a pesar de que se manejaron diferentes concentraciones de Cd y PO_4^{3-} . La tendencia observada corresponde a las etapas de crecimiento que presentan las microalgas en condiciones de cultivo: la fase de acondicionamiento (uno a tres días), seguida de la exponencial (variable entre tratamientos). Aunque en los cultivos experimentales no se observó la fase estacionaria, debido al tiempo de duración de los ensayos experimentales, la curva de crecimiento del tratamiento FAD-2011 sugiere que las células posiblemente estaban iniciando la fase estacionaria de crecimiento al décimo día, cuando se interrumpieron los cultivos. En cultivos de *L. polyedrum* expuestos a las mismas condiciones del Medio L1 y evaluados antes de iniciar este estudio, se observó que las células iniciaban la fase estacionaria a partir del doceavo día (datos no mostrados). La menor ($0.520 \pm 0.015 \text{ d}^{-1}$) y mayor ($0.645 \pm 0.055 \text{ d}^{-1}$) tasa de crecimiento calculada para *L. polyedrum* coincidió con la exposición a la menor y mayor concentración de PO_4^{3-} , independientemente de la concentración de Cd_d . Tasas

de crecimiento similares han sido reportadas para esta especie ($0.19 - 0.74 \text{ d}^{-1}$) bajo las mismas condiciones experimentales manejadas en este estudio y sin limitación de nutrientes ($\mu > 0.5 \text{ d}^{-1}$; Peña-Manjarrez, 2008), pero sin adicionar Cd. Los resultados del presente estudio sugieren que la actividad de las células no se vio afectada por su exposición a diferentes concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} , como se reportó en cultivos del dinoflagelado *Prorocentrum micans* (Kayser y Sperling, 1980). Estos autores observaron que cuando las células fueron expuestas a bajas concentraciones de Cd_d (0.13 y $0.4 \mu\text{g L}^{-1} = 1.2$ y 4 nmol L^{-1}), no se observaron efectos negativos en las tasas de crecimiento; sin embargo, a partir de concentraciones $\geq 1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\geq 11 \text{ nmol L}^{-1}$) y hasta $33.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (296 nmol L^{-1}) sí se observaron efectos negativos.

El tratamiento con el Medio L1 fue el que presentó la mayor tasa de crecimiento alcanzando la mayor abundancia celular al final del experimento ($[2.70 \pm 0.24] \times 10^6 \text{ cél L}^{-1}$, Tabla 2.3, Figura 2.1). Sin embargo, aunque la concentración de PO_4^{3-} en el Medio L1 ($23.1 \pm 2.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) es la comúnmente utilizada en cultivos de fitoplancton, esta concentración es más de 20 veces mayor que la reportada para aguas costeras de California y el Pacífico de Baja California (Tabla 1.1, Capítulo 1). En estas costas, y en particular durante florecimientos de *L. polyedrum* en la BTS, se han reportado abundancias celulares (Peña-Manjarrez et al., 2001; 2005; Ruiz-de la Torre et al., 2013; Gutierrez-Mejia et al., 2016) similares a las alcanzadas al final de este estudio en los diferentes tratamientos ($[1.432 \pm 0.038] \times 10^6$ a $[2.70 \pm 0.24] \times 10^6 \text{ células L}^{-1}$). Los resultados de este estudio indican que las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} a las que fueron expuestas las células de *L. polyedrum* en todos los tratamientos, son aptas para el desarrollo y mantenimiento de florecimientos algales. Sin embargo, en el tratamiento FAD-2011 las abundancias celulares a lo largo del tiempo parecen indicar que posiblemente bajo estas condiciones, los FAD pueden mantenerse por un menor período de tiempo. El tratamiento FAD-2011, además de que presentó la menor tasa de crecimiento y la menor abundancia celular ($[1.432 \pm 0.038] \times 10^6 \text{ cél L}^{-1}$), fue el único que registró una disminución en el crecimiento de *L. polyedrum* posterior al séptimo día (Figura 2.1).

En este estudio se observó que *L. polyedrum* removió Cd preferentemente durante las primeras 24 horas de exposición, sin importar la concentración inicial a la que fueron expuestas las células. A las 24 h de iniciado el experimento, se había removido 99, 93, 50 y 92% (Medio L1, FAD-2011, Intermedio y FAD-2005, respectivamente) del Cd removido durante todo el experimento (66, 67, 64 y 58% del total, respectivamente). Estos resultados apoyan la idea de que *L. polyedrum* tiene la capacidad de incorporar y concentrar Cd sin agotarlo del medio, a pesar de las altas abundancias celulares alcanzadas ($[1.432 \pm 0.038] \times 10^6$ a $[2.70 \pm 0.24] \times 10^6 \text{ cél L}^{-1}$). Trabajos realizados con diferentes especies de microalgas (*Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, *P. micans*) han reportado, al igual que el presente estudio, una rápida remoción de Cd

entre el primer y tercer día de exposición, tanto en cultivos de laboratorio (Kayser y Sperling, 1980; Monteiro et al., 2009) como en el medio natural, particularmente cuando había florecimientos algales de diatomeas (e.i. *Rhizosolenia setigera*; Cassis et al., 2011). Es importante mencionar que en la mayoría de los trabajos de remoción de Cd por microalgas se han utilizado concentraciones significativamente más elevadas de este elemento ($1.2 - 296 \text{ nmol L}^{-1}$, Kayser y Sperling, 1980; $445 - 8897 \text{ nmol L}^{-1}$, Monteiro et al., 2009) que las medidas en el medio natural ($< 1.5 \text{ nmol L}^{-1}$, Tabla 1.1, Capítulo 1) o que las utilizadas en este estudio ($0.357 \pm 0.097 - 1.62 \pm 0.18 \text{ nmol L}^{-1}$).

Los resultados del presente estudio reflejaron cambios en la remoción de Cd por *L. polyedrum* al incrementarse la concentración inicial de Cd_d . Por ejemplo, el Cd total removido en el tratamiento FAD-2005 ($1.32 \pm 0.40 \text{ nmol L}^{-1}$), así como la tasa de remoción calculada de Cd_d calculada ($0.176 \pm 0.045 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), indican que hubo una mayor y más rápida remoción de Cd en el tratamiento expuesto a la mayor concentración de este elemento (Figuras 2.2b; Tabla 2.3). Este resultado sugiere que la concentración inicial de Cd influye directamente en la tasa de remoción de Cd por *L. polyedrum*. En otras especies de microalgas (*S. obliquus*, *T. suecica*, *P. micans*, *S. dimorphus*), también se ha reportado una mayor remoción de Cd con el incremento en la concentración de este elemento en el medio (Kayser y Sperling, 1980; Monteiro et al., 2009, 2010; Chaidir et al., 2015). El estudio de Cox et al. (2014), realizado en una zona de afloramiento en Costa Rica ($\text{Cd}_d = 0.5 - 5.0 \text{ nmol L}^{-1}$), reportaron un mayor consumo de Cd asociado a incrementos en la productividad (*Synechococcus* sp. y/o *Prochlorococcus* sp.) dentro de la zona de afloramiento y una disminución afuera de esta zona.

La cantidad de Cd removido, por lo general se reporta en términos de cantidad removida por biomasa algal (en mg g^{-1}), por lo que se calcula con fines de bioremediación, objetivo que no forma parte del presente trabajo. En este estudio, el interés radicó en conocer la capacidad que tienen las células de *L. polyedrum* para remover Cd del medio experimentando con concentraciones de Cd y abundancias celulares similares a las reportadas durante florecimientos algales de esta especie. Por lo anterior, el Cd (y PO_4^{3-}) removido se calculó en términos de nmol de Cd (μmol) removido por litro de solución (para poder comparar estos resultados con las concentraciones en el medio natural), pero además se calculó en términos de nmol de Cd removido por célula de *L. polyedrum*. La máxima remoción de Cd por célula, en todos los tratamientos, se registró al inicio de cada uno de los cultivos (día 1) y fue 3 a 5 veces mayor ($[0.046 \pm 0.028] \times 10^{-4} \text{ nmol cel}^{-1}$) en el tratamiento expuesto a la mayor concentración de Cd (FAD-2005, Figuras 2.3). Estos resultados indican que una célula de *L. polyedrum* es capaz de remover mayores cantidades de Cd del medio cuando hay más Cd disponible y cuando hay bajas abundancias celulares. Si la abundancia celular se incrementa, la cantidad de Cd removido por célula se reduce drásticamente a

pesar de que aún quede Cd disponible en el medio y que la abundancia celular continúe incrementándose. Este comportamiento es difícil de explicar, aunque es posible que durante el proceso de replicación (división celular) las células compartan su contenido celular y, consecuentemente, el Cd previamente absorbido. Una segunda explicación a la alta remoción de Cd al inicio de los cultivos podría ser que, además del Cd asimilado por las células, las células proporcionen una mayor área disponible para sitios de coordinación con iones metálicos a bajas abundancias celulares (día 1), como se ha reportado para bajas biomásas de *Ulva lactuca* (0.1 g, Ghoneim et al., 2014). Pons y Fuste (1993) reportaron que cantidades elevadas de biosorbentes pueden causar una aglomeración que reduce las distancias intracelulares y, por lo tanto, producen un efecto sombra entre las células, protegiendo y reduciendo los sitios de unión de los iones metálicos. El proceso anterior podría suceder, por ejemplo, cuando se incrementan las abundancias celulares en los medios de cultivo. Torres et al. (1998), en un estudio con la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* reportaron una remoción de $1.4 \mu\text{g Cd} \times 10^6 \text{ cél}$ ($\sim 12.5 \text{ nmol} \times 10^6 \text{ cél}$), la cual es 2.7 veces mayor que la del presente estudio ($4.6 \text{ nmol} \times 10^6 \text{ cél}$); sin embargo, la concentración de exposición utilizada por Torres et al. (1998) fue más de un orden de magnitud mayor ($1.0 \text{ mg L}^{-1} \sim 8.9 \text{ nM}$) que la utilizada en el presente estudio ($1.62 \pm 0.18 \text{ nM}$).

Las microalgas tienen la capacidad de remover metales del medio mediante dos procesos (Bruland et al., 1991), el primero es rápido e involucra adsorción de los metales a la superficie o pared celular y no requiere de gasto metabólico y puede ser por atracciones electrostáticas y por complejación (Mehta y Gaur, 2005). El segundo proceso, la absorción, por el contrario es más lento y requiere de gasto metabólico importante ya que involucra el transporte hasta el interior de la célula. Sin embargo, para los propósitos de este estudio se considerará que la remoción de Cd_d involucró la suma de los dos procesos antes mencionados. Experimentos de laboratorio (Torres et al., 1998; Monteiro et al., 2010) reportan que la remoción de Cd, por procesos de adsorción o absorción, puede variar entre especies y depende de la concentración en el medio. Por ejemplo, Torres et al. (1998) reportaron que el Cd acumulado por *P. tricornutum*, después de un día de exposición, fue mayor que el Cd adsorbido para todas las concentraciones manejadas de $1 - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ($8.9 - 890 \text{ nmol L}^{-1}$). Monteiro et al. (2010) reportaron una mayor remoción de Cd por adsorción a la pared celular para *S. obliquus* y *Desmodesmus pleiomorphus*.

El incremento observado en la concentración de Cd disuelto en todos los tratamientos (entre 5 – 44%) al quinto día del cultivo puede deberse a un proceso de desadsorción de Cd. Este proceso puede darse cuando la razón de adsorción y desadsorción alcanza el equilibrio, llegando a un periodo de saturación, por lo que el proceso de absorción no procede (Chaidir et al., 2015; Montazer-Rahmati, et al., 2011). Se ha sugerido que la temperatura del medio es una variable crucial en el proceso de

adsorción y cuando se eleva la temperatura posiblemente se debilitan las fuerza de unión entre los iones de Cd y los sitios de unión activos (Al-Homaidan et al., 2015). Sin embargo, en este estudio se manejaron condiciones controladas de temperatura por lo que puede eliminar la influencia de este factor. El incremento en la concentración de Cd en el medio, cuando la abundancia celular fue $> 5.0 \times 10^6$ cél L⁻¹ (considerado un FAD), coincidió con las altas concentraciones registradas durante los FAD de esta especie en la BTS, aunque a mayores abundancias celulares (Gutierrez-Mejia et al., 2016). Los incrementos en las concentraciones de Cd en los cultivos experimentales y en el medio natural durante el FAD-2011 pudieran ser ocasionados por procesos de desadsorción, así como por la liberación de Cd generado por la remineralización del material orgánico producido durante los FAD, como se sugirió en el Capítulo 1 de este trabajo.

El Cd_d presenta una distribución en el océano que está fuertemente correlacionada con el PO₄³⁻ (Bruland, 1980), lo cual ha permitido que el Cd sea considerado como un micronutriente en el mar independiente de su toxicidad (Horner et al., 2013). La única función fisiológica conocida del Cd en el fitoplancton es su utilización como cofactor enzimático en la enzima anhidrasa carbónica (AC). Sin embargo, como en el presente estudio no hubo limitación por Zn (80 nM reportados en el Medio L1), este proceso no debería tener un efecto relevante, aunque no se descarta la posibilidad de que *L. polyedrum* este utilizando la AC como una enzima específica, como se ha reportado en aguas costeras altamente productivas del centro de California, asociado a incrementos de Cd en el fitoplancton (Cullen et al., 1999).

El incremento en el pH del medio, durante el transcurso del experimento, era de esperarse ya que durante el proceso de fotosíntesis el carbono inorgánico acepta protones del ion HCO₃⁻ y, al mismo tiempo, el CO₃²⁻ acepta protones del medio para volver a formar HCO₃⁻. De esta manera se alcanza un nuevo equilibrio químico en donde la liberación de OH⁻ incrementa el pH acompañado de una disminución del carbono inorgánico (Uusitalo, 1996). El pH puede afectar la captación y remoción de Cd y de otros metales, ya que los iones H⁺ juegan un papel importante en los procesos de adsorción. Cuando se incrementa el pH en el medio, disminuyen los protones y por lo tanto hay menos competencia con los iones metálicos y, al quedar expuestos más ligandos con cargas negativas en las superficies de las células, se da una mayor atracción de cationes metálicos (Tüzün et al. 2005; Gupta y Rastogi 2008). Se ha reportado que *S. obliquus*, *Chlorella vulgaris* y *Spirulina* sp., entre otras especies de microalgas, tienen una mayor capacidad de remover Cd del medio cuando el pH se incrementa a 7 – 8 (Rangsayatorn et al., 2002; Fraile et al., 2005; Monteiro et al., 2009). Estos valores de pH (7 – 8) coincide con los valores de pH manejados en el presente estudio (7.9 – 8.8) y es lo que sucede durante la presencia de altas abundancias fitoplanctónicas como sería el caso de los florecimientos algales.

A diferencia del Cd, la remoción de PO_4^{3-} se dio de manera gradual hasta el final del experimento. Únicamente en el tratamiento con la más baja concentración de PO_4^{3-} (FAD-2011) la remoción comenzó a partir del quinto día (Figura 2.4b). Fierro et al. (2008) y González-Muñoz (2006) reportaron para otras especies de microalgas como *Scenedesmus* sp. y *Porphyridium cruentum* que el consumo acumulado de PO_4^{3-} tiende a incrementarse conforme transcurre el tiempo del cultivo, lo cual coincide con lo obtenido en el presente trabajo. La concentración de los nutrientes en los medios de cultivo influyen en el crecimiento de las microalgas (Valenzuela-Espinoza, 1997), por lo que la remoción de nutrientes puede explicar la respuesta fisiológica de las células, tal y como se observó en este estudio. Por ejemplo, el tratamiento FAD-2011, con la menor concentración de PO_4^{3-} , fue en donde se removió menor concentración de este nutriente ($0.82 \pm 0.31 \mu\text{mol L}^{-1}$) y en donde se observó la menor abundancia de células ($[1.432 \pm 0.038] \times 10^4 \text{ cél L}^{-1}$). Se removió más PO_4^{3-} (3.64 ± 0.25 , 5.79 ± 0.10 y $14.74 \pm 0.47 \mu\text{mol L}^{-1}$) en los tratamientos en donde la concentración inicial fue mayor (Intermedio, FAD-2005 y Medio-L1; respectivamente) coincidiendo con el incremento en el número de células (Tabla 2.2). En el tratamiento Medio-L1, a pesar de que presentó la mayor abundancia celular y la mayor remoción de PO_4^{3-} , las altas concentraciones de este nutriente al final del experimento ($15.8 \pm 1.8 \mu\text{mol L}^{-1} = 69\%$ del total), sugieren que el PO_4^{3-} estaba en exceso y que posiblemente supera el requerimiento de las células. González-Muñoz (2006) reportó que, a concentraciones de PO_4^{3-} similares a las del Medio-L1, *P. cruentum* removió el 64% del PO_4^{3-} disponible, resultados similares a los del presente estudio, aunque la abundancia celular en este caso fue mucho menor.

Las tasas de remoción de PO_4^{3-} (de 0.093 ± 0.025 a $1.36 \pm 0.34 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, FAD-2011 y Medio-L1) así como la concentración removida, sugieren que hubo una mayor y más rápida remoción de PO_4^{3-} en los tratamientos expuestos a las mayores concentraciones de este elemento (Figuras 2.4b; Tabla 2.3). Los resultados anteriores sugieren que la concentración inicial de PO_4^{3-} , así como la concentración inicial de Cd, influyen directamente en las tasa de remoción de PO_4^{3-} , como se ha sugerido anteriormente (Al-Homaidan et al., 2015), independientemente del número de células presentes en el medio (Figura 2.5). Al comparar los tratamientos en donde las concentraciones fueron representativas del medio natural, se observó que las mayores tasas de remoción de Cd ($0.176 \pm 0.045 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y PO_4^{3-} ($0.556 \pm 0.041 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), se obtuvieron en el tratamiento con mayores concentraciones iniciales de estas dos especie disueltas (FAD-2005) y, por el contrario, las menores tasas de remoción de Cd y PO_4^{3-} ($0.025 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.093 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente) se obtuvieron en el tratamiento con las menores concentraciones iniciales de estas dos especies disueltas (FAD-2011). Las tasas de remoción de PO_4^{3-} calculadas en este estudio fueron similares a las reportadas por Delgadillo-Hinojosa et al. (2015) en la BTS. Estos autores

reportaron, menores tasas de remoción de PO_4^{3-} en otoño y mayores en primavera (0.010 ± 0.003 y $0.081 \pm 0.020 \mu\text{mol de PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente).

Las tasas de remoción de Cd calculadas en el presente estudio fueron mayores que las reportadas en otros estudios. Por ejemplo, Delgadillo-Hinojosa et al. (2015) calcularon tasas de remoción de Cd en la BTS para las diferentes estaciones del año, con valores altos en primavera ($0.020 \pm 0.005 \text{ nmol de Cd L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), asociados a una alta abundancia fitoplanctónica, aunque en ausencia de florecimientos algales. Dixon et al. (2006), observaron tasas de remoción de Cd ($0.0103 - 0.0295 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) más altas durante florecimientos algales de diatomeas en el Canal de la Mancha (oeste de Europa) que en su ausencia (Tabla 2.4), sugiriendo que está altamente relacionado a las tasas de productividad primaria (particularmente cuando hay dominancia de diatomeas). Cox et al. (2014) en una zona de surgencias en el Costa Rica reportaron tasas de asimilación de Cd mucho menores que las calculadas en el presente estudio ($0.00280 - 0.00614 \text{ nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), pero mayores que las calculadas afuera de la zona de surgencia. Estas diferencias pueden ser debidas a las diferencias en la capacidad de acumulación de Cd entre especies y a la sensibilidad de las células (Wang y Wang, 2009). Se ha demostrado que los flagelados y dinoflagelados pueden acumular mayores cantidades de Cd en comparación con otras especies, lo cual podría estar sucediendo con *L. polyedrum*. Este proceso se atribuye a las diferentes respuestas de las células, posiblemente relacionadas con su metabolismo (Wolter et al., 1984). Estos resultados podrían explicar también los incrementos de Cd en el fitoplancton durante los florecimientos algales de *L. polyedrum* en el 2011 y 2012.

Tabla 2.4. Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar) de las tasas de remoción de Cd y PO_4^{3-} calculadas en cultivos de *Lingulodinium polyedrum*, comparadas con las reportadas para la Bahía de Todos Santos (BTS), así como en ausencia y presencia de florecimientos algales (FA) de diatomeas en el Canal de la Mancha y en una zona de surgencias en Costa Rica.

Tasas de remoción de Cd ($\text{nmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Tasas de remoción de PO_4^{3-} ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Descripción	Referencias
0.051 ± 0.011 a 0.176 ± 0.045	0.093 ± 0.025 a 0.556 ± 0.041	<i>Lingulodinium polyedrum</i>	Este estudio
0.020 ± 0.005 0.009 ± 0.003	0.081 ± 0.020 0.010 ± 0.003	BTS primavera BTS otoño	Delgadillo-Hinojosa et al. (2015)
$0.00280 - 0.00614$ $0.00096 - 0.00190$	---	Zona de surgencia zona de no surgencia	Cox et al., 2014
$0.00096 - 0.0070$ $0.0103 - 0.0295$	---	Invierno, no FA FA de diatomeas	Dixon et al., 2006

De forma general, la relación Cd_d/PO_4^{3-} presentó una gran variabilidad temporal durante el transcurso del experimento, tal y como se observó en el FAD que se presentó en la BTS en el 2011 (0.240 , $n = 1$ a 2.1 ± 1.1 nM/ μ M; Capítulo 1), aunque no se observaron valores mayores a 1.5 nM/ μ M como en el FAD-2011 en la BTS. Antes del séptimo día la relación Cd_d/PO_4^{3-} fue menor o igual (a excepción de un valor de 0.40 nM/ μ M el día 5, tratamiento Intermedio) a la calculada con datos superficiales reportados frente a las costas del Pacífico de Baja California y California (0.336 ± 0.026 nM/ μ M; Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996; Figura 2.6). Las altas razones Cd_d/PO_4^{3-} obtenidas al final del experimento en los tratamientos FAD-2011 (0.51 ± 0.14 nM/ μ M), Intermedio (0.53 ± 0.23 nM/ μ M) y, en especial, en el FAD-2005 (1.49 ± 0.26 nM/ μ M) sugieren que las altas abundancias de *L. polyedrum* afectan esta razón, así como sucedió durante los FAD de *L. polyedrum* en la BTS (Gutierrez-Mejia et al., 2016). Delgadillo-Hinojosa et al., (2015) reportaron también para la BTS variaciones en la razón Cd_d/PO_4^{3-} asociadas con la presencia de altas abundancias fitoplanctónicas, pero en ausencia de FAD.

En este estudio, similar a lo observado durante florecimientos de *L. polyedrum* (Gutierrez-Mejia et al., 2016) y a diferencia de lo reportado en la literatura, únicamente se observó una correlación significativa entre el Cd_d y el PO_4^{3-} en el tratamiento Intermedio ($r = 0.86$, $P = 0.03$, $n = 6$, Figura 2.8), indicando que por lo general la relación Cd_d/PO_4^{3-} fue altamente variable en el tiempo, así como entre los tratamientos. La gran variabilidad en la relación Cd_d/PO_4^{3-} sugiere la existencia de un comportamiento diferencial entre estos dos componentes disueltos durante el tiempo de desarrollo de los cultivos, tal y como se observó en la superficie del mar, durante la presencia de los FAD de la BTS (Capítulo 1). Este comportamiento diferencial puede ser explicado en función de las diferentes cinéticas de remoción que siguieron estos dos componentes disueltos; mientras la captación de Cd por *L. polyedrum* fue rápida al inicio del cultivo y posteriormente lenta (modelo logarítmico), la captación de PO_4^{3-} se dio de forma gradual durante todo el tiempo del cultivo (modelo lineal). Como resultado de este comportamiento diferencial las pendientes de las líneas de regresión, a pesar de no ser significativas para todos los tratamientos, variaron entre 0.008 y 0.161 nM/ μ M. Por lo tanto, la variabilidad en las concentraciones de Cd y PO_4^{3-} durante el desarrollo de los cultivos pueden ser explicadas como una consecuencia de la productividad biológica (Figura 2.7), así como se explicó en el medio natural durante los FAD de *L. polyedrum* en la BTS.

Durante el FAD-2011 en la BTS se infirió una remoción preferencial de PO_4^{3-} o una menor remoción de Cd (Figura 2.8b), pero en el estudio de laboratorio los datos de la relación Cd_d/PO_4^{3-} están dispersos a ambos lados de la curva obtenida con datos superficiales reportados frente a las costas del Pacífico de Baja California y California (Figura 2.8b). Para poder inferir si al final del experimento hubo remoción preferencial

de Cd_d o PO_4^{3-} , para cada tratamiento se calculó un factor aparente de fraccionamiento, utilizando el modelo propuesto por Elderfield y Rickaby (2000):

$$\alpha_{Cd/P} = \frac{\left(\frac{Cd}{PO_4^{3-}}\right)_{MOP}}{\left(\frac{Cd}{PO_4^{3-}}\right)_{agua}} \quad (2.3)$$

En donde $\alpha_{Cd/P}$ es el factor de fraccionamiento de Cd_d/PO_4^{3-} , $(Cd/PO_4^{3-})_{MOP}$ es la relación de estos dos componentes en el material particulado (MOP), calculando las concentraciones de Cd y PO_4^{3-} en el MOP como la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales en los cultivos. Finalmente, $(Cd/PO_4^{3-})_{agua}$ es la relación de las concentraciones de estos dos componentes medidas en el medio de cultivo al inicio del experimento. Valores de $\alpha_{Cd/P}$ mayores a uno reflejan una incorporación preferencial de Cd, mientras que valores menores a uno reflejan una incorporación preferencial de PO_4^{3-} .

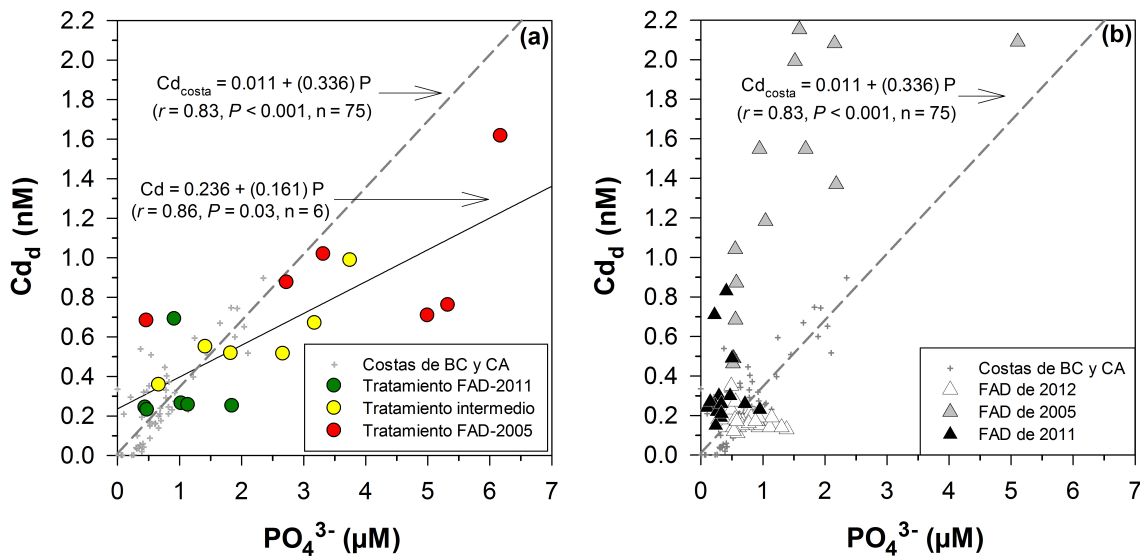


Figura 2.8. Relación entre las concentraciones promedio diarias, de Cd disuelto (Cd_d) y PO_4^{3-} en (a) tratamientos expuestos a concentraciones representativas del medio natural (tratamientos FAD-2011, Intermedio y FAD-2005) y, (b) datos superficiales de tres florecimientos algales de *L. polyedrum* (FAD) en la BTS (FAD de 2005; Lares et al., 2008, FAD-2011 y 2012; Gutierrez-Mejia et al., 2016), comparados con datos superficiales reportados frente a las costas de Baja California y California (Bruland, 1980; Sañudo-Wilhelmy y Flegal, 1991, 1996; van Geen y Luoma, 1993; van Geen y Husby, 1996). La línea discontinua representa la regresión lineal obtenida para aguas superficiales en las costas de Baja California y California, y la línea continua para el tratamiento Intermedio. Se muestran las ecuaciones de las líneas de regresión, sus coeficientes de correlación (r), niveles de significancia (P) y número de muestras (n).

En este estudio, los tratamientos expuestos a concentraciones representativas del medio natural tuvieron valores de $\alpha_{Cd/P}$ de 1.45 (FAD-2011), 0.75 (Intermedio) y 0.62 (FAD-2005), respectivamente. Lo anterior sugiere que en el tratamiento expuesto a las más bajas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} el Cd fue removido de forma preferencial (FAD-2011), mientras que en los tratamientos expuestos a mayores concentraciones (Intermedio y FAD-2005), el PO_4^{3-} fue el que se removió preferencialmente. Si se calcula el fraccionamiento como la razón de las tasas de remoción de Cd y PO_4^{3-} (Tabla 2.3), entonces se sugiere una remoción preferencial de PO_4^{3-} en todos los tratamientos (rango de 0.32 – 0.55) tal y como se observó en el campo para el FAD-2011 (Capítulo 1). Elderfield y Rickaby (2000) calcularon un factor aproximado promedio de 2.5 para el océano moderno, igual al factor calculado con datos de agua y MOP de Baja California (2.5, Bruland et al., 1980). En la BTS, de donde se tomaron los valores de referencia de Cd_d y PO_4^{3-} para realizar los cultivos, se han reportado valores de $\alpha_{Cd/P}$ de 0.13 ± 0.05 durante la temporada de primavera en presencia de una alta productividad biológica (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015). Sin embargo, las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} con las que se calculó el factor de fraccionamiento de los cultivos, fueron mucho más altas que las reportadas para la BTS por Delgadillo-Hinojosa et al. (2015). Se sugiere que la gran variabilidad observada es debida a las diferencias en las cinéticas de remoción de Cd y de PO_4^{3-} y a sus comportamientos diferenciales en aguas altamente productivas.

2.5. Conclusión

Los resultados del presente estudio indican que *L. polyedrum* tiene la capacidad de remover Cd y PO_4^{3-} del medio a las diferentes concentraciones de exposición manejadas, sin limitar su crecimiento. Las células respondieron rápidamente a las concentraciones de Cd disponible, removiendo la mayor cantidad durante las primeras 24 h de exposición, mientras que la remoción de PO_4^{3-} fue gradual durante todo el periodo de estudio, esto sugiere que la cinética de remoción de estas dos especies disueltas es diferente. Tomando en cuenta los tres tratamientos que representan condiciones observadas en el medio natural de la BTS, se puede decir que a pesar de las bajas o altas concentraciones de Cd y PO_4^{3-} utilizadas en los cultivos de laboratorio, las células crecieron de manera similar y alcanzaron abundancias comparables a las reportadas durante florecimientos algales de esta especie en la BTS. Únicamente el tratamiento FAD-2011 presentó la menor abundancias celular, así como la menor tasa de crecimiento y remoción de PO_4^{3-} , lo cual posiblemente estuvo relacionado con la concentración de exposición de PO_4^{3-} , que fue la más baja. Por el contrario, la mayor remoción de Cd y PO_4^{3-} se dio en el tratamiento con las más altas concentraciones de estas especies disueltas (FAD-2005), en donde se presentó además la mayor tasa de crecimiento y la más alta abundancia celular. Lo anterior sugiere que las más altas concentraciones de exposición manejadas en este estudio (1.62 ± 0.18 nM y $6.18 \pm$

0.16 μM ; Cd y PO_4^{3-} , respectivamente), similares a las mayores concentraciones reportadas en el medio natural durante florecimientos algales de *L. polyedrum*, no generan efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de este dinoflagelado, sino que por el contrario, estimulan su rápido desarrollo. Las mayores tasas de remoción obtenidas en este estudio, en especial de Cd, comparadas con las observadas en condiciones naturales pueden explicarse por: 1) la utilización de Cd por *L. polyedrum*, posiblemente por los distintos requerimientos que tienen las especies; 2) las concentraciones manejadas también puede marcar la diferencia, ya que no son las que prevalecen a lo largo de todo el año en la BTS, sino las registradas eventualmente durante los florecimientos algales. La gran variabilidad en la razón Cd/ PO_4^{3-} , así como en la abundancia de células, a lo largo del tiempo sugiere un comportamiento diferencial entre el Cd y el PO_4^{3-} . Este desacople está en función de la manera en que se remueven estos dos componentes del medio de cultivo. Por último, el diseño experimental se planteó de manera que simulara las condiciones observadas durante otros FAD de *L. polyedrum*, por lo que es una aproximación razonable de lo que sucede en el medio natural y un avance en el conocimiento del ciclo del Cd y el PO_4^{3-} en las zonas costeras marinas.

2.6. Referencias

- Al-Homaidan, A.A., Alabdullatif, J.A., Al-Hazzani, A.A., Al-Ghanayem, A.A., Alabbad, A.F. 2015. Adsorptive removal of cadmium ions by *Spirulina platensis* dry biomass. Saudi Journal of Biological Sciences, 22: 795-800.
- Bruland, K.W. 1980. Oceanography distribution of cadmium, zinc, nickel and copper in the north Pacific. Earth Planet. Sc. Letters, 47: 176-198.
- Bruland, K.W., Franks, R.P., Knauer, G.A., Martin, J.H. 1979. Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in sea water. Anal. Chim. Acta, 105: 203-245.
- Bruland, K.W., Donat, J.R., Hutchins, D.A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic water. Limnol. Oceanogr., 36: 1555-1577.
- Cassis, D., Lekhi, P., Pearce, C.M., Ebell, N., Orians, K., Maldonado, M.T. 2011. The role of phytoplankton in the modulation of dissolved and oyster cadmium concentrations in Deep Bay, British Columbia, Canada. Sci. Total Environ., 409: 4415-4424.
- Chaidir, Z., Jesica, S., Zein, R., Munaf, E. 2015. Biosorption of Cadmium (II) Ion from Aqueous Solution Using Living Cell and Non-Living Cell Microalga *Scenedesmus Dimorphus*. Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci., 6: 1931-1980.
- Cox, A.D, Noble, A.E., Saito, M.A. 2014. Cadmium enriched stable isotope uptake and addition experiments with natural phytoplankton assemblages in the Costa Rica Upwelling Dome. Mar. Chem., 166: 70-81.
- Cullen, J.T., Lane, T.W., Morel, F.M.M., Sherrell, R.M. 1999. Modulation of cadmium uptake in phytoplankton by seawater CO_2 concentration. Nature, 402: 165-167.

- de Baar, H.J.W., Saager, P.M., Notling, R.F., van der Meer, J. 1994. Cadmium versus phosphate in the world ocean. *Mar. Chem.*, 46: 261-281.
- Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Díaz, M.A., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S.G., Segovia, J.A., Peña-Manjarrez, J.L., García-Mendoza, E., Castro, R. 2015. Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO₄ ratio in Todos Santos Bay: a retention site of upwelled waters in the Baja California Peninsula, Mexico. *Mar. Chem.*, 168: 37-48.
- Dixon J.L., Statham, P.J. Widdicombe, C.E., Jones, R.N., Barquero-Molina, S., Dickie, B., Nimmo, M., Turley, C.M. 2006. Cadmium uptake by marine micro-organisms in the English Channel and Celtic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 44: 31-43.
- Elderfield, H., Rickaby, R.E.M. 2000. Oceanic Cd/P ratio and nutrient utilization in the glacial Southern Ocean. *Nature*, 405: 305-310.
- Fierro, S., Sánchez-Saavedra, M. del Pilar, Copalcuá, C. 2008. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technol.*, 99: 1274-1279.
- Fogg, G.E., Thake, B. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Third Ed. University of Wisconsin. 259 p.
- Fraile, A., Penche, S., González, F., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Ballester, A. 2005. Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chem. Ecol.*, 21: 61-75.
- Ghoneim, M.M., El-Desoky, H.S., El-Moselhy, K.M., Amer, A., El-Naga, E.H.A., Mohamedein, L.I. Al-Prol, A.E. 2014. Removal of cadmium from aqueous solution using marine green algae, *Ulva lactuca*. *Egypt. J. Aquat. Res.*, 40: 235-242.
- González-Dávila, M. 1995. The role of phytoplankton cell on the control of heavy metal concentration in seawater. *Mar. Chem.*, 48: 215-236.
- González-Muñoz, J.A. 2006. Evaluación del crecimiento, consumo de nutrientes y composición proximal de *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) cultivada con medio f/2 y fertilizantes agrícolas. Tesis de Maestría, CICESE, México. 64 p.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, 32: 234-236.
- Gupta VK, Rastogi, A. 2008. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies. *J. Hazard Mater.*, 152: 407-414.
- Gutierrez-Mejia, Lares, M.L., Huerta-Díaz, M.A., Delgadillo-Hinojosa, F. 2016. Cadmium and phosphate variability during algal blooms of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Sci. Total Environ.*, 541: 865-876.
- Hach, 1997. *Water Analysis Handbook*. Hach Company, Loveland. 1309 p.
- Ho, T.-Y., Quigg, A., Finkel, Z.V., Milligan, A.J., Wyman, K., Falkowski, P.G., Morel, F.M.M. 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 39: 1145-1159.
- Horner, T.J., Lee, R.B.Y., Henderson, G.M., Rickaby, R.E.M. 2013. Nonspecific uptake and homeostasis drive the oceanic cadmium cycle. *PNAS*, 110: 2500-2505.
- Hutchins, D., DiTullio, G., Zhang, Y., Bruland, K. 1998. An iron limitation mosaic in the California upwelling regime. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 1037-1054.
- Kayser, H., Sperling, K.R. 1980. Cadmium effects and accumulation in cultures of *Prorocentrum micans* (Dinophyta). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33: 89-102.

- Knauer, G.A., Martin, J.H. 1973. Seasonal variations of cadmium, copper, manganese, lead, and zinc in water and phytoplankton in Monterey Bay, California. *Limnol. Oceanogr.*, 18: 597-604.
- Kudo, I., Matsunaga, K. 1998. Behavior of Cu, Ni and Cd during nutrient depletion in a spring bloom in Funka Bay. *J. Oceanogr.*, 54: 619-627.
- Lane, T.W., Morel, F.M.M. 2000. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiol.*, 123: 345-352.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., Morel, F. 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435:42.
- Lapointe, M., MacKenzie, T.D., Morse, D. 2008. An external d-Carbonic Anhydrase in a free-living marine dinoflagellate may circumvent diffusion-limited carbon acquisition. *Plant Physiol.*, 147: 1427-1436
- Lares, M.L., Marinone, S.G., Rivera-Duarte, I., Beck, A., Sañudo-Wilhelmy, S. 2008. Spatial variability of trace metals and inorganic nutrients in surface waters of Todos Santos Bay, México in summer of 2006 during a red tide bloom. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 707-716.
- Lares, M.L., Marinone, S.G. 2009. Comparison of cadmium and phosphate concentrations during red tide versus no red tide conditions. *J. Coastal Res.*, 56: 832-835.
- Lee, J.G., Morel, F.M.M. 1995. Replacement of zinc by cadmium in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 305-309.
- Lee, J.G., Roberts, S.B., Morel, F.M.M. 1995. Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1056-1063.
- Luengen, A.C., Raimondi, P.T., Flegal, A.R. 2007. Contrasting biogeochemistry of six trace metals during the rise and decay of a spring phytoplankton bloom in San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 52: 1112-1130.
- Luoma, S.N., van Geen, A., Lee, B.G., Cloern, J.E. 1998. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in South San Francisco Bay: Implications for metal cycling in estuaries. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 1007-1016.
- Mehta, S.K., Gaur, J.P. 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25: 113-152.
- Montazer-Rahmati, M.M., Rabbani, P., Abdolali, A., Keshtkar A. R. 2011. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae. *J. Hazard. Mater.*, 185: 401-407.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X. 2009. Use of the microalga *Scenedesmus obliquus* to remove cadmium cations from aqueous solutions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 1573-1578.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X. 2010. Cadmium removal by two strains of *Desmodesmus pleiomorphus* cells. *Water Air Soil Pollut.*, 208: 17-27.
- Morel F.M.M. 2008. The co-evolution of phytoplankton and trace element cycle in the oceans. *Geobiology*, 6: 318-324.
- Morel, F.M.M., Price, N.M. 2003. The biogeochemical cycle of trace metals in the oceans. *Science*, 300: 944-947.

- Noriki, S., Ishimori, N., Harada, K., Tsunogai, S. 1985. Removal of trace metals from seawater during a phytoplankton bloom as study with sediment traps in Funka Bay, Japan. *Mar. Chem.*, 17: 75-89.
- Okamoto, O.K., Shao, L., Hastings, J.W., Colepicolo, P. 1999. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 123: 75-83.
- Peña-Manjarrez, J.L. 2008. Ecofisiología de dinoflagelados productores de mareas rojas en la Bahía de Todos Santos. Tesis de Doctorado, CICESE, México. 240 p.
- Peña-Manjarrez, J.L, Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., Orellana-Cepeda, E. 2001. Quistes de *Lingulodinium polyedrum*, productor de mareas rojas en la Bahía de Todos Santos (invierno-primavera, 2000). *Cienc. Mar.*, 27: 543-558.
- Peña-Manjarrez, J. L., Helenes, J., Gaxiola, G. Orellana, E. 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay. *Cont. Shelf Res.*, 25: 1375-1393.
- Pons, M.P., Fuste, M.C. 1993. Uranium uptake by immobilized cells of *Pseudomonas* strain EPS 5028. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 661-665.
- Price, N.M., Morel, F.M.M. 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*, 344: 658-660.
- Price, N.M., Morel, F.M.M. 2003. The biogeochemical cycle of trace metals in the oceans. *Science*, 300: 944-7.
- Rangsayatorn, N., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G.R. 2002. Phytoremediation potential of *Spirulina* (Arthrospira) platensis: biosorption and toxicity studies of cadmium. *Environ. Pollut.*, 119: 45-53.
- Romano, R.L. 2010. Toxic effects of cadmium on the microalgae *Lingulodinium polyedrum* using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Dissertation (Master) - Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 122 p.
- Ruiz-de la Torre, M.C., Maske, H., Ochoa, J., Almeda-Jauregui, C.O. 2013. Maintenance of coastal surface blooms by surface temperature stratification and wind drift. *PLoS ONE*, 8(4): e58958.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Flegal, A.R. 1991. Trace element distribution in coastal waters along the US-Mexican boundary: relative contribution of natural processes vs anthropogenic inputs. *Mar. Chem.*, 33: 371-392.
- Sañudo-Wilhelmy, S., Flegal, A.R. 1996. Trace metal concentrations in the surf zone and in coastal waters off baja california, Mexico. *Environ. Sci. Technol.*, 30: 1575-1580.
- Sunda, W. 1989. Trace metal interactions with phytoplankton. *Biol. Oceanogr.*, 6: 411-442.
- Sunda, W. 2012. Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.*, 3: 204.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A. 1998. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2961-2968.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A. 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: implications for oceanic Cd cycling. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 1501-1516.

- Takesue, R.K., van Geen, A. 2002. Nearshore circulation during upwelling inferred from the distribution of dissolved cadmium off the Oregon coast. *Limnol. Oceanogr.*, 47(1): 176-185.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., Abalde, J. 1998. Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technol.*, 63: 213-220.
- Tüzün, I., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., Arıca, M.Y. 2005. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Manag.*, 77: 85-92.
- Twing, B.S., Baines, S.B., Fisher, N.S. 2004. Element stoichiometries of individual plankton cells collected during the Southern Ocean Iron Experiment (SOFEX). *Limnol. Oceanogr.*, 49: 2115-2128.
- Uusitalo, J. 1996. Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH (alkalization) exemplified with a pH drift experiment. *Sci Mar.*, 60: 129-134.
- Valenzuela-Espinoza, E. 1997. Uso de un medio alterno al f/2 para el cultivo de *Isochrysis aff galbana* (CLONE T-ISO). Tesis de Maestría, UABC. , México. 51 p.
- van Geen, A., Luoma, S.N. 1993. Trace metals (Cd, Cu, Ni, Zn) and nutrients in coastal waters adjacent to San Francisco Bay, California. *Estuaries*, 16: 559-566.
- van Geen, A., Husby, D.M. 1996. Cadmium in the California Current System: tracer of past and present upwelling. *J. Geophys. Res.*, 101: 389-3507.
- Wang, M.J., Wang, W.X. 2009. Cadmium in three marine phytoplankton: accumulation, subcellular fate and thiol induction. *Aquat. Toxicol.*, 95: 99-107.
- Wells, M.L., Mayer, L.M., Gillard, R.R.L. 1991. Evaluation of iron as a triggering factor for red tide blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69, 93-102.
- Wolter, K., Rabsch, U., Krischer, P., Davies, A.G. 1984. Influence of low concentrations of cadmium, copper and zinc on phytoplankton of natural water samples. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 19: 167-173.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., Morel, F.M.M. 2008. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452: 56-61.
- Zwolsman, J.J.G., van Eck, G.T.M. 1999. Geochemistry of major elements and trace metals in suspended matter of the Scheldt estuary, southwest Netherlands. *Mar. Chem.*, 66: 91-111.

Capítulo 3. Cadmio en sedimentos de la Bahía de Todos Santos y del Puerto de Ensenada y su relación con florecimientos algales de *Lingulodinium polyedrum*

3.1. Introducción

La mayoría de las transformaciones que afectan a los metales traza en la superficie de los sedimentos están influenciadas directa o indirectamente por la oxidación de la materia orgánica depositada desde la columna de agua (Yaru et al., 2000). En las zonas costeras, mayor cantidad de materia orgánica es depositada antes de ser oxidada en su trayecto hacia el fondo y/o es enterrada antes de ser descompuesta en la interfase agua-sedimento (Huerta-Díaz y Reimer, 2010). Es por esta razón que flujos altos de materia orgánica hacia los sedimentos normalmente contribuyen a desarrollar condiciones anóxicas cerca o desde la interfase agua-sedimento.

Los mecanismos que determinan la retención-fijación, movilidad y liberación de los metales traza en los sedimentos, varían dependiendo de las características de los mismos, tales como contenido de materia orgánica, tamaño de grano, condiciones redox, salinidad, temperatura y pH (Rosas-Rodríguez, 2001; McKay et al., 2007). Entre estos factores, el tamaño de grano juega un papel importante en controlar la distribución de los metales en los sedimentos, ya que determina su capacidad de fijación. Por lo general, altas concentraciones de metales están asociadas a sedimentos de grano fino (e.g., arcillas), debido a que tienen una elevada área superficial con relación al volumen y, por lo tanto, tienen una mayor capacidad para secuestrar metales (De Gregori et al., 1996). Sin embargo, los metales en los sedimentos no necesariamente se fijan de forma permanente. Si las condiciones fisicoquímicas cambian de forma natural (bioturbación, difusión, reducción microbiana, resuspensión de sedimentos) o antropogénica (e.g., actividades de dragado), las condiciones redox podrían cambiar a óxicas permitiendo la removilización de algunos metales (Sundelin y Eriksson, 2001; García-Rico et al., 2010), tales como el Cd (Zhuang et al., 1994). Este proceso produce gradientes de concentración de metales, lo que puede ocasionar flujos hacia afuera de los sedimentos y, eventualmente, enriquecimientos por metales disueltos en la columna de agua (Blake et al., 2004). De esta manera, los metales traza pueden quedar disponibles para ser nuevamente asimilados por la biota y bioacumulados a lo largo de la cadena trófica (Okamoto et al., 1999).

Una fuente potencial de metales traza es la gran cantidad de la materia orgánica, producida durante los florecimientos algales (FA), que no alcanza a ser degradada antes de ser depositada en los sedimentos. Los quistes de reposo, particularmente abundantes durante los florecimientos de dinoflagelados (FAD), a diferencia de la

materia orgánica, son resistentes a los procesos diagenéticos, por lo que los metales asociados posiblemente no pueden ser liberados al agua intersticial (Blake et al., 2004). En la etapa final de un florecimiento de *L. polyedrum* que duró seis meses, uno de los más prolongados desde su primer registro en el año 2000 para la Bahía de Todos Santos (Peña-Manjarrez et al., 2005), se reportaron altas concentraciones de Cd disuelto (1.38 ± 0.72 nM; Lares et al., 2008) en sus aguas superficiales. Lares et al. (2008) sugieren que durante el tiempo de permanencia del florecimiento, *L. polyedrum* asimiló Cd, por lo que las altas concentraciones de Cd en la superficie pueden atribuirse a un proceso de remineralización de la materia orgánica producida durante el florecimiento. En la Bahía de Todos Santos (BTS) se han identificado algunas zonas que actúan como semilleros de quistes de reposo que proveen las células necesarias para el desarrollo de nuevos FAD, como es el caso del Puerto de Ensenada (Peña-Manjarrez et al., 2009). Las zonas consideradas semillero se caracterizan por ser zonas protegidas, con baja energía de oleaje y tamaño de grano fino (Peña-Manjarrez et al., 2001, 2005). En general, el Puerto de Ensenada (PE) ha sido considerado como una zona cuyas concentraciones de metales son relativamente altas en comparación al resto de la bahía (Romero-Vargas-Márquez, 1995), con enriquecimientos reportados para Cd, Pb, Zn y Co (Huerta-Díaz et al., 2008).

Un antecedente de que los dinoflagelados pueden incorporar y transportar una mayor cantidad de metales en comparación a otras especies y, en especial Cd, se presenta en un estudio realizado durante florecimientos de diatomeas y dinoflagelados en la Bahía Funka (Japón, Noriki et al., 1985). Estos autores encontraron que el Cd fue el elemento que se incorporó en mayor grado a las células, reportando incrementos en las concentraciones de Cd en el material particulado a 1 m de profundidad durante el florecimiento de diatomeas (promedio 350 ppb = 3.11 nmol g^{-1}) y los más altos valores cuando predominaron los dinoflagelados (promedio 1425 ppb = $12.68 \text{ nmol g}^{-1}$). García-Hernández et al. (2005) reportaron altas concentraciones de Cd en los sedimentos ($4.0 \mu\text{g g}^{-1} = 36 \text{ nmol g}^{-1}$) durante un FA nocivo de varias especies de dinoflagelados en la Bahía Kun Kaak (Sonora), con valores seis veces mayores que los reportados para una zona cercana no afectada por el FA y que fue considerada como referencia ($0.62 \mu\text{g g}^{-1} = 5.5 \text{ nmol g}^{-1}$).

El presente estudio se realizó con el fin de estudiar la variabilidad de Cd en los sedimentos de la zona norte de la BTS (N-BTS) y del PE, en donde se presentaron los FAD de 2011 y 2012, ya que resulta de gran interés geoquímico y ambiental identificar si los florecimientos de *L. polyedrum* podrían estar asociados con la transferencia de Cd hacia el sedimento y/o si podrían influir en la variabilidad de Cd observada en la columna de agua durante los FAD. Considerando que las concentraciones de metales totales en los sedimentos no reflejan la fracción potencialmente disponible para la biota (Loring, 1991), se determinaron también las concentraciones reactivas. Si la aparición

de FAD se encontrara asociada a la transferencia de metales traza hacia los sedimentos y si las células de *L. polyedrum* se encontraran enriquecidas en Cd (y posiblemente otros elementos), entonces sería factible suponer que se podrían transferir metales traza hacia los sedimentos durante los FAD.

3.2. Área de estudio

La Bahía de Todos Santos se localiza al noroeste de la Península de Baja California (Figura 3.1a), aproximadamente a 110 km al sur de la frontera México-Estados Unidos. En la zona noreste de la bahía, en donde se ubica el sitio de estudio, la profundidad de la columna de agua es de aproximadamente 10 – 15 m. En la BTS predomina un clima mediterráneo, con poca precipitación (Pavía, 2004) y lluvia predominantemente durante el invierno, generalmente entre noviembre y abril (promedio de 260 mm año⁻¹, Reyes-Coca y Troncoso-Gaytan, 2004). De manera general, en la BTS se establece el transporte de sedimentos de las zonas costeras y de las Islas de Todos Santos que convergen hacia la parte central de la bahía (Gao y Collins, 1994), indicando que sería en esta parte en donde se acumularían preferencialmente los sedimentos.

El Puerto de Ensenada ubicado en la parte noreste de la BTS (Figura 3.1b), fue construido en 1956 y representa uno de los principales puertos en el Pacífico Mexicano. Es un puerto de altura y cabotaje en donde se desarrollan actividades comerciales, pesqueras y turísticas. Tiene un área aproximada de 1.95 km² con una profundidad que varía entre 1.5 y 11 m, con las mayores profundidades localizadas en el canal de navegación y arribo de embarcaciones de altura. El puerto es un área de baja energía en donde predominan sedimentos de grano fino (< 62.5 µm; Huerta-Díaz et al., 2008), los cuales pueden acumular metales por aportes eventuales provenientes del Arroyo Ensenada durante la época de lluvias y de otras actividades relacionadas con la pesca, así como por el tráfico y el mantenimiento de embarcaciones ya que se encuentra un astillero en el interior de la rada portuaria. Las actividades de dragado realizadas en el PE para su adecuado funcionamiento y con fines de expansión pueden producir un transporte neto de metales hacia afuera del puerto.

En la BTS y el PE se han realizado estudios referentes a algunos metales en los sedimentos, tales como Cd, Cu, Ni, Zn, Al, Fe, Mn, Co, Pb, y Ag (Romero-Vargas-Márquez, 1995, Sandoval-Salazar, 1999, Carreón-Martínez et al., 2001, 2002, Mandujano-Velasco, 2007). Estos estudios en su mayoría reportan en la bahía una concentración de metales relativamente baja en sedimentos superficiales en relación a dos zonas con mayores concentraciones, la rada portuaria y al este de las Islas de Todos Santos. Para el PE, Huerta-Díaz et al. (2008) reportaron una mayor concentración de metales en la zona interna del PE, un alto enriquecimiento de Cd, Cu, Ni y, en menor grado, de Zn. Las altas concentraciones de Cd en los sedimentos del

puerto se han atribuido a la presencia de sedimentos de grano fino, a un enriquecimiento de tipo natural (Huerta-Díaz et al., 2008), a las actividades de reparación de embarcaciones y a los aportes del arroyo Ensenada en la época de lluvia (Romero-Vargas-Márquez, 1995).

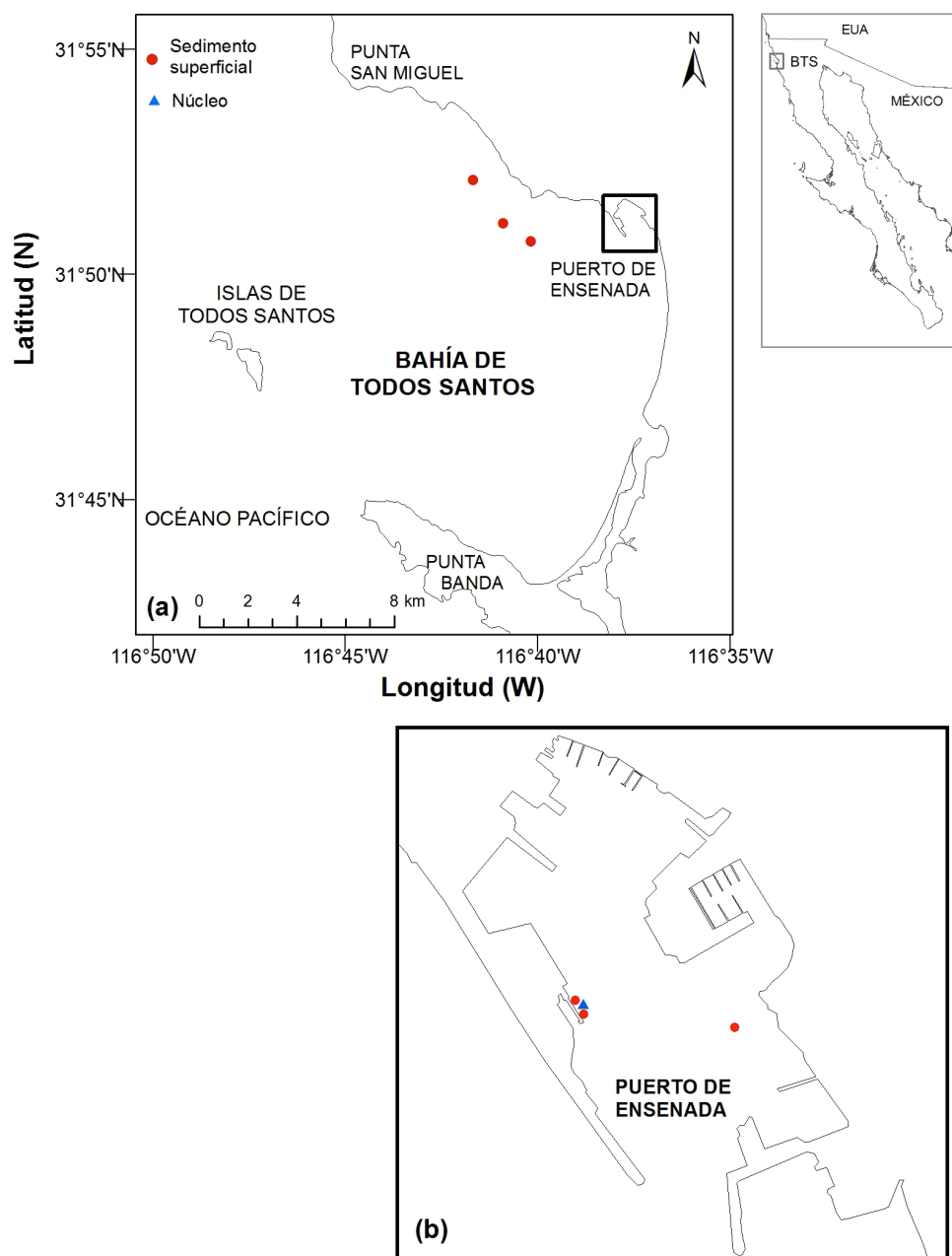


Figura 3.1. Ubicación de las estaciones de muestreo en (a) la Bahía de Todos Santos (BTS) y (b) el Puerto de Ensenada (PE). Muestras de sedimento superficial (círculos) tomadas durante florecimientos de *Lingulodinium polyedrum* en la BTS y el PE así como en su ausencia (sólo en el PE). La ubicación del núcleo de sedimento recolectado está representado por el triángulo.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Limpieza del material y preparación de soluciones

El material utilizado para la recolección y análisis de las muestras se lavó con jabón libre de fosfatos (Citranox[®]) al 2% (v/v), seguido de tres enjuagues con agua destilada y desionizada (ADD) grado Milli-Q ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, el material se dejó en un baño de HCl grado reactivo al 5% durante siete días y, pasado este tiempo, se enjuagó tres veces con ADD. El material se secó a temperatura ambiente y se guardó en bolsa de plástico Ziploc[®] hasta su uso posterior. Todos los ácidos y reactivos utilizados en la preparación de las soluciones utilizadas para el proceso de extracción de sedimentos fueron grado reactivo.

3.3.2. Recolección de las muestras

En octubre 2011 y noviembre 2012, durante el desarrollo de dos florecimientos del dinoflagelado *L. polyedrum*, se recolectaron muestras de sedimento superficial en la parte norte de la BTS (N-BTS, $n = 3$) y en el interior del Puerto de Ensenada (PE, $n = 2$), en lugares donde la superficie del mar presentaba una tonalidad rojiza indicativa de altas abundancias de esta microalga. Adicionalmente, en mayo y noviembre de 2013 se recolectaron muestras de sedimento superficial (a profundidades de 9 a 15 m) en ausencia de florecimientos algales en el PE para fines comparativos (no FA, $n = 4$) y en las mismas zonas en donde se presentaron los FAD en 2011 y 2012. No se recolectaron muestras en el N-BTS en ausencia de FAD para comparar con las muestras recolectadas durante FAD, por lo que se utilizan como referencia datos de un estudio anterior (Romero-Vargas-Márquez, 1995), correspondientes a la misma zona de muestreo. Adicionalmente, el 20 de noviembre de 2013 se recolectó un núcleo de sedimento en el PE a 10 m de profundidad, en la misma zona en donde se habían registrado las mayores abundancias de *L. polyedrum* durante los FAD de 2011 y 2012. Las muestras recolectadas dentro del PE se realizaron considerando que este puerto es una de las zonas de la BTS, de acuerdo a Peña-Manjarrez et al. (2009), que presenta mayor abundancia de quistes de *L. polyedrum* en los sedimentos. El núcleo se tomó fuera del canal de dragado y alejado del Arroyo Ensenada (Figura 3.1b), en una zona de baja energía y, por lo tanto, poco influenciada por procesos de resuspensión.

Las muestras de sedimento superficial se recolectaron con una draga Birge-Ekman modificada por Peña-Manjarrez (2001), con un cierre de hule para evitar el lavado y pérdida del sedimento. De cada porción de sedimento extraído con la draga, se tomaron los primeros dos centímetros con una cuchara de plástico, evitando que las muestras se mezclaran con el sedimento subsuperficial. Las muestras se guardaron en bolsas Ziploc[®] y se congelaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis posterior. El núcleo de

sedimento se tomó utilizando un multinucleador (Mini Multi-Corer MC-200) que consta de cuatro tubos de policarbonato de 6.25 cm de diámetro exterior y 32.5 cm de largo. Los tubos pueden penetrar hasta aproximadamente 20 cm de profundidad y se cierran tanto en la parte inferior como superior, una vez que han penetrado en el sedimento. Una vez recolectados, uno de los núcleos con 16 cm de sedimento fue inmediatamente trasladado a tierra en donde fue extraído con un pistón y seccionado cada centímetro de sedimento con una espátula plástica. Cada fracción de sedimento fue colocada en un tubo para centrífuga de plástico de 50 mL y, menos de dos horas después de ser seccionado el sedimento, las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

3.3.3. Extracción secuencial de las fracciones HCl y pirita

La extracción de Cd asociado a las fracciones operacionalmente definidas como HCl y pirita (Cd_{HCl} y Cd_{Pirita}) se realizó utilizando el método de extracción secuencial desarrollado por Huerta-Díaz y Morse (1990). Este método consiste en digerir a temperatura ambiente una cantidad de sedimento húmedo equivalente a 2.5 g de peso seco. Para determinar el porcentaje de humedad de cada muestra, se secaron entre 5 y 10 gr de sedimento húmedo en un horno a 65 °C, hasta obtener un peso constante (~ 48 h). La primera fracción (HCl) se obtuvo de digerir cada muestra durante 16 h con 20 mL de HCl 1 N. Esta fracción incluye los metales asociados con carbonatos, óxidos de Fe y Mn y sulfuros volátiles en ácido. Posteriormente, la fracción de silicatos (principalmente arcillas) se extrajo mediante dos digestiones sucesivas con 30 mL de HF 10 M por 1 y 16 h, respectivamente. Este digerido fue desechado debido a que los metales traza asociados a esta fracción son esencialmente no reactivos durante los procesos de diagénesis temprana. Finalmente, el residuo de la fracción de silicatos se digirió durante 1 h con 10 mL de HNO₃ concentrado para obtener la fracción pirita (y metales asociados). El metal asociado a la fracción reactiva (Me_{FR}) fue calculado como:

$$M_{FR} = Me_{HCl} + Me_{Pirita} \quad (3.1)$$

En donde Me_{HCl} representa la concentración del metal asociado a la fracción HCl y Me_{pirita} corresponde a la concentración del metal asociado a la pirita. La opción de análisis para esta fracción tiene como objetivo determinar las concentraciones de metales que son reactivas hacia la formación o disolución de minerales, o que son susceptibles de ser incorporadas por organismos marinos. La ventaja potencial que representa el análisis de la fracción reactiva es la eliminación de las interferencias producidas por las concentraciones presentes en la fracción de silicatos. Estas interferencias podrían "borrar" o disminuir las señales dejadas en los perfiles de metales en la columna sedimentaria, por ejemplo por los quistes de los dinoflagelados.

3.3.4. DOP y DTMP

El grado de piritización (DOP) introducido por Berner (1970), se utilizó para evaluar la cantidad de Fe que se encuentra en forma de pirita (Fe_{pirita}) en relación a la fracción reactiva ($Fe_{FR} = Fe_{HCl} + Fe_{pirita}$), utilizando la siguiente ecuación:

$$DOP (\%) = \frac{Fe_{pirita}}{Fe_{HCl} + Fe_{pirita}} \times 100 \quad (3.2)$$

De manera similar al DOP, las concentraciones de Cd en la fracción HCl y pirita (Cd_{HCl} y Cd_{pirita}) se utilizaron para calcular el grado de piritización de metal traza (DTMP-Cd). Este término fue introducido por Huerta-Diaz y Morse (1990) para evaluar el porcentaje de metal sedimentario reactivo asociado a la pirita, utilizando la siguiente ecuación:

$$DTMP-Cd(\%) = \frac{Cd_{pirita}}{Cd_{HCl} + Cd_{pirita}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.3.5. Extracción de metales totales

La concentración de Cd total (Cd_T) se obtuvo siguiendo la metodología de Carignan y Tessier (1988). Esta técnica consistió en digerir 0.5 g de sedimento (peso seco) en vasos de Teflón de 100 mL cubiertos con vidrios de reloj de Teflón. Las muestras se digirieron bajo reflujo con 15 mL de HNO_3 concentrado durante 30 min a 150 °C y se evaporaron a sequedad. Posteriormente, se agregaron 4 mL de $HClO_4$ concentrado a los vasos y se pusieron en reflujo a 200 °C durante 30 min. Pasado este tiempo, las muestras se dejaron enfriar, se agregaron 10 mL de HF concentrado y se evaporó la muestra nuevamente a sequedad a 200 °C. Finalmente, se adicionaron 25 mL de HCl al 5% a los vasos para solubilizar los metales traza y la solución fue transferida a botellas de polietileno de baja densidad de 30 mL de capacidad.

Las concentraciones de Cd_T y Cd asociado a las fracciones HCl y pirita se determinaron con un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS; Perkin-Elmer AAnalyst 600) utilizando el método de adición estándar para compensar por efectos de matriz. El Al_T (elemento normalizador) y el Fe asociado a las fracciones HCl y pirita se cuantificaron en un espectrofotómetro de absorción atómica con flama (Varian SpectrAA 220 Fast Sequential). La exactitud y precisión del método analítico para el Cd_T se evaluó utilizando los materiales de referencia certificados (CRM) para sedimentos marinos PACS-2 y MESS-3 (Canadian Research Council of Canada). Para el Cd y Fe asociado a las fracciones HCl y pirita no se utilizaron materiales de referencia ya que no existe material certificado para esta extracción

operacional. Los porcentajes de recuperación para Cd_T utilizando los CRM PACS-2 y MESS-3 fueron de 107 ± 9 ($n = 2$) y 101 ± 8 ($n = 2$), respectivamente, mientras que para Al_T fueron de 98 ± 10 ($n = 2$) y 104 ± 3 ($n = 2$), respectivamente (Tabla 3.1), con una precisión para ambos elementos en el rango de 5.6 a 10%. Los blancos de procedimiento fueron sujetos al mismo proceso que las muestras de sedimentos, pero sin incluir sedimento. Los límites de detección (en $\mu\text{mol g}^{-1}$) calculados como tres veces la desviación estándar del blanco de procedimiento, fueron: 0.7×10^{-5} (Cd_T), 0.0006 (Al_T), 1.8×10^{-6} (Cd_{HCl}), 3.8×10^{-4} (Cd_{Pirita}), 0.011 (Fe_{HCl}), y 0.8×10^{-3} (Fe_{Pirita}).

Tabla 3.1. Análisis de control de calidad de metales totales (Cd_T y Al_T) obtenidos con los materiales de referencia certificados para sedimento marino PACS-2 ($n = 2$) y MESS-3 ($n = 2$) del National Research Council of Canada.

Elemento	Valor certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor medido ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperación (%)
Cd_T PACS-2	2.11 ± 0.15	2.26 ± 0.20	107 ± 9
Cd_T MESS-3	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	101 ± 8
Al_T PACS-2	$(6.62 \pm 0.32) \times 10^4$	$(6.48 \pm 0.68) \times 10^4$	98 ± 10
Al_T MESS-3	$(8.59 \pm 0.23) \times 10^4$	$(8.90 \pm 0.24) \times 10^4$	104 ± 3

Las concentraciones de Cd_T se normalizaron con las del Al_T . El Al es comúnmente utilizado como normalizador ya que se considera un elemento conservativo que forma parte de las arcillas (Schropp et al., 1990), de manera natural tiene una concentración alta y no tiene una fuente de aporte antropogénico significativa; adicionalmente, tiene la ventaja de compensar las concentraciones de elementos traza sedimentarios por tamaño de grano y por variabilidad mineralógica (Loring, 1991).

3.3.6. Factor de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento de Cd (FE_{Cd}), expresados como razón molar, se calcularon con las concentraciones de Cd_T normalizadas por el Al_T , de la siguiente manera:

$$FE_{Cd} = \frac{(Cd_T/Al_T)_{\text{muestra}}}{(Cd_T/Al_T)_{\text{corteza}}} \quad (3.4)$$

En donde $(Cd_T/Al_T)_{\text{muestra}}$ representa la concentración de Cd en las muestras normalizada por el Al y $(Cd_T/Al_T)_{\text{corteza}}$ representa la concentración promedio de Cd (normalizada por el Al) de rocas sedimentarias de la corteza terrestre (Turekian y Wedepohl, 1961; Li y Schoonmaker, 2005). Para calcular los FE_{Me} es preferible utilizar

valores de fondo de los sedimentos de la misma zona de estudio. Sin embargo, considerando que no siempre es factible obtener dicha información, en su lugar se utilizan los valores de Turekian y Wedepohl, (1961) y Li y Schoonmaker (2005). Factores de enriquecimiento mayores a uno representan enriquecimiento de Cd con relación a las concentraciones promedio de la corteza terrestre, $FE < 1$ empobrecimiento y $FE = 1$ significa que la concentración de Cd_T tiene el mismo valor que el valor de referencia.

3.3.7. Análisis estadístico

Los análisis se realizaron con el programa SigmaStat, considerando un nivel de probabilidad $P \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Se utilizaron pruebas paramétricas, ya que se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos para este análisis. Se compararon los valores promedio de Cd en las fracciones HCl y pirita por medio de ANOVAS de una vía. Para evaluar posibles asociaciones entre el Cd en las fracciones HCl y pirita en la columna sedimentaria, así como entre el Cd y Fe reactivos, se realizaron análisis de correlación de Pearson.

3.4. Resultados

3.4.1. Cd en las fracciones HCl, pirita y reactiva

Las concentraciones de Cd asociado a las fracciones HCl y pirita mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$), tanto en sedimentos superficiales (N-BTS y PE) como en el núcleo (PE). El Cd asociado a la fracción HCl dominó sobre el Cd asociado a la fracción pirita, representando entre 82 – 94% y 86 – 95% (sedimentos superficiales y núcleo, respectivamente) del Cd asociado a la fracción reactiva ($Cd_{FR} = Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$). En los sedimentos superficiales del PE las mayores concentraciones de Cd en las fracciones HCl ($2.45 \pm 0.45 \text{ nmol g}^{-1}$) y pirita ($0.330 \pm 0.012 \text{ nmol g}^{-1}$) se registraron durante la presencia de florecimientos de *L. polyedrum*. Estas concentraciones fueron 1.4 y 2.2 veces mayores (Cd_{HCl} y Cd_{Pirita} respectivamente) que las medidas un año después en ausencia de florecimientos (Tabla 3.2). En la zona N-BTS durante los mismos FAD, la concentración promedio de Cd en la fracción HCl fue de $1.46 \pm 0.40 \text{ nmol g}^{-1}$ y de $0.109 \pm 0.029 \text{ nmol g}^{-1}$ en la fracción pirita.

Las mayores concentraciones de Cd asociado a la fracción reactiva ($2.78 \pm 0.44 \text{ nmol g}^{-1}$, $n = 2$) durante los FAD en la zona de muestreo del PE, fueron 1.4 veces mayores que las medidas un año después en ausencia de florecimientos y en la misma zona (Tabla 3.2). En las estaciones N-BTS, la concentración de Cd_{FR} fue de $1.57 \pm 0.41 \text{ nmol g}^{-1}$ durante los mismos FAD. El perfil de Cd asociado a la pirita en el PE presentó una ligera tendencia a incrementar en concentración con la profundidad (de 0.090 a

0.211 nmol g⁻¹), mientras que el perfil de Cd asociado al HCl presentó una tendencia contraria, con valores más altos en la superficie y menores en el fondo del núcleo (1.50 y 1.01 nmol g⁻¹, respectivamente; Figura 3.2). Las figuras 3.3a y 3.3b muestran correlaciones altamente significativas entre las concentraciones de Cd y la profundidad para la fracción HCl ($r = -0.89$, $P < 0.001$, $n = 16$) y pirita ($r = 0.74$, $P \leq 0.001$, $n = 16$). El perfil de Cd asociado a la FR, similar al de la fracción HCl, presentó una tendencia a disminuir con la profundidad, registrando los valores más altos en los primeros 6 cm de la columna sedimentaria (1.58 – 1.88 nmol g⁻¹; Figura 3.2).

Tabla 3.2. Valores promedio ($\pm$ una desviación estándar) y rango de concentraciones (en negrillas) de Cd en las fracciones HCl (Cd_{HCl}), pirita (Cd_{Pirita}), reactiva (Cd_{FR} = Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}) y total. Se muestran también los factores de enriquecimiento (FE), grados de piritización de Cd (DTMP-Cd) y grados de piritización (DOP) en sedimentos superficiales de la zona norte de la Bahía de Todos Santos (N-BTS) y el Puerto de Ensenada (PE). Las muestras fueron tomadas durante florecimientos algales de *Lingulodinium polyedrum* (FAD) y en su ausencia (no FAD). Se incluyen datos del núcleo del Puerto de Ensenada (PE).

Fracción HCl	Fracción pirita	Fracción reactiva	Fracción total	FE	DTMP- Cd	DOP
(nmol g ⁻¹)				(Razón molar)	(%)	
Puerto FAD (n = 2)						
2.45 ± 0.45 2.13 – 2.77	0.330 ± 0.012 0.322 – 0.338	2.78 ± 0.44 2.47 – 3.09	3.05 ± 0.29 2.84 – 3.25	1.04 ± 0.11 0.86 – 1.11	12 ± 2 10 – 14	17 ± 1 16 – 17
N-BTS FAD (n = 3)						
1.46 ± 0.40 1.07 – 1.86	0.109 ± 0.029 0.080 – 0.139	1.57 ± 0.41 1.18 – 2.00	1.71 ± 0.41 1.24 – 2.00	0.64 ± 0.10 0.53 – 0.70	7 ± 2 7 – 9	18 ± 8 11 – 26
Puerto no FAD (n = 4)						
1.78 ± 0.23 1.82 – 2.05	0.148 ± 0.045 0.090 – 0.197	1.93 ± 0.26 2.02 – 2.22	2.24 ± 0.32 2.01 – 2.71	0.85 ± 0.10 0.76 – 0.99	8 ± 2 7 – 10	15 ± 1 14 – 16
Núcleo no FAD (n = 16)						
1.35 ± 0.21 1.01 – 1.74	0.193 ± 0.059 0.090 – 0.280	1.53 ± 0.17 1.23 – 1.88	2.28 ± 0.22 1.96 – 2.58	0.845 ± 0.080 0.64 – 0.97	13 ± 5 6 – 18	16 ± 1 14 – 17

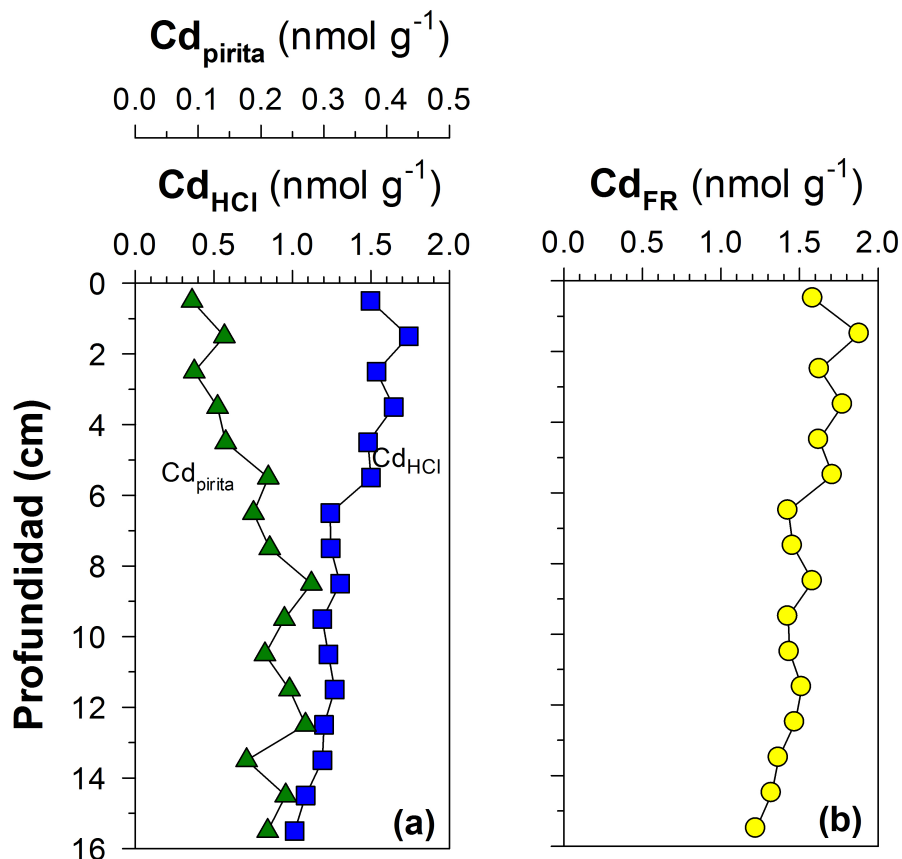


Figura 3.2. Perfiles verticales de las concentraciones de Cd asociado a las fracciones (a) HCl (Cd_{HCl}) y pirita (Cd_{Pirita}) y (b) fracción reactiva (Cd_{FR} = Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.

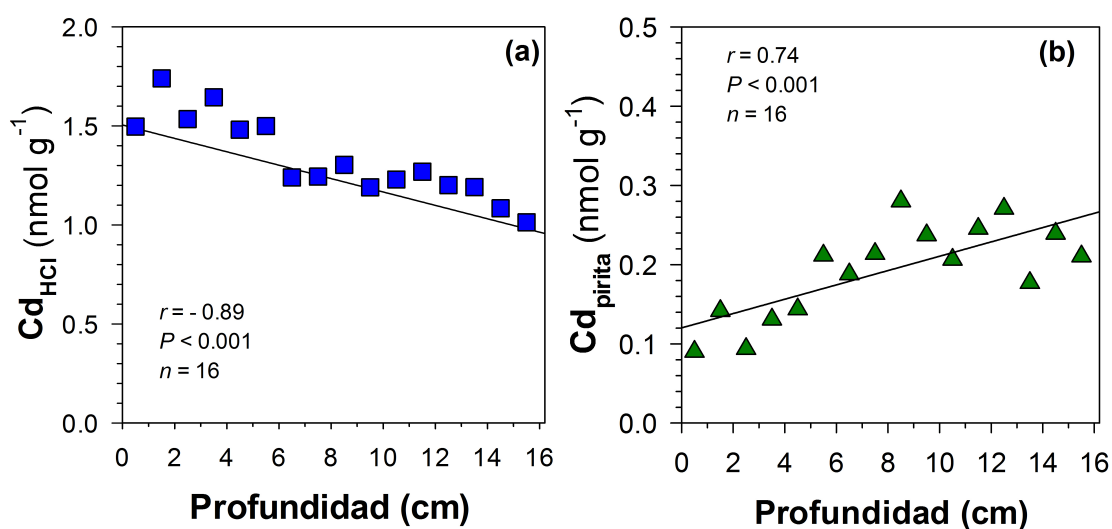


Figura 3.3. Relación entre la concentración de Cd en la fracción (a) HCl (Cd_{HCl}) y (b) pirita (Cd_{Pirita}) con la profundidad en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.

3.4.2. DOP y DTMP

Para el cálculo del DOP se midió la concentración de Fe asociada a las fracciones HCl y pirita (Figura 3.4). El Fe asociado a la fracción HCl (80 – 88%) dominó sobre el Fe en la fracción pirita (12 – 20%) en sedimentos superficiales, así como en el núcleo. El perfil de Fe asociado al HCl y a la pirita presentaron una tendencia a incrementar con la profundidad, hasta alcanzar concentraciones de 74.7 y 15.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$, fracción HCl y pirita respectivamente. El perfil de Fe asociado a la FR presentó tendencia a incrementar en concentración con la profundidad desde 59.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en la superficie del núcleo hasta 89.8 a los 11 cm. A partir de esta profundidad la concentración de Fe_{FR} disminuyó hasta 79.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en el fondo del núcleo (Figura 3.4). Se observaron correlaciones significativas ($P < 0.01$) entre las concentraciones de Cd y Fe asociados a las fracciones HCl ($r = 0.57$, $n = 16$) y pirita ($r = -0.63$, $n = 16$) en el núcleo del PE.

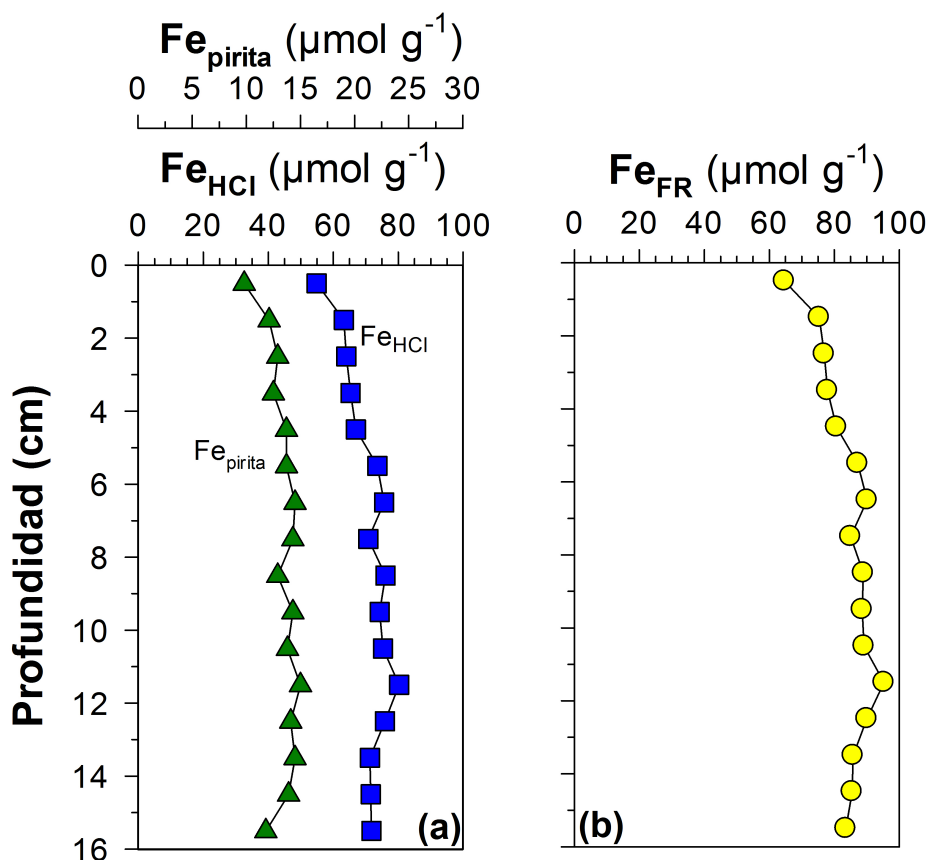


Figura 3.4. Perfiles verticales de las concentraciones de Fe asociado a las fracciones (a) HCl (Fe_{HCl}) y pirita ($\text{Fe}_{\text{pirita}}$) y (b) fracción reactiva ($\text{Fe}_{\text{FR}} = \text{Fe}_{\text{HCl}} + \text{Fe}_{\text{pirita}}$) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.

Los sedimentos analizados del PE y el N-BTS presentaron bajos valores de DOP y de DTMP-Cd. En sedimentos superficiales, el DOP varió entre 11 – 17% ($n = 7$), con un solo valor por arriba de este rango en N-BTS durante FAD (26%, Tabla 3.2). Para el caso del núcleo del PE, los valores de DOP permanecieron prácticamente constantes con la profundidad (16 $\pm$ 1%, Figura 3.5a). El grado de piritización de Cd en sedimentos superficiales varió entre 7 – 14%, mientras que el perfil de DTMP-Cd mostró tendencia a incrementar con la profundidad del sedimento (superficie y fondo, 6 y 17% respectivamente; Figura 3.5b).

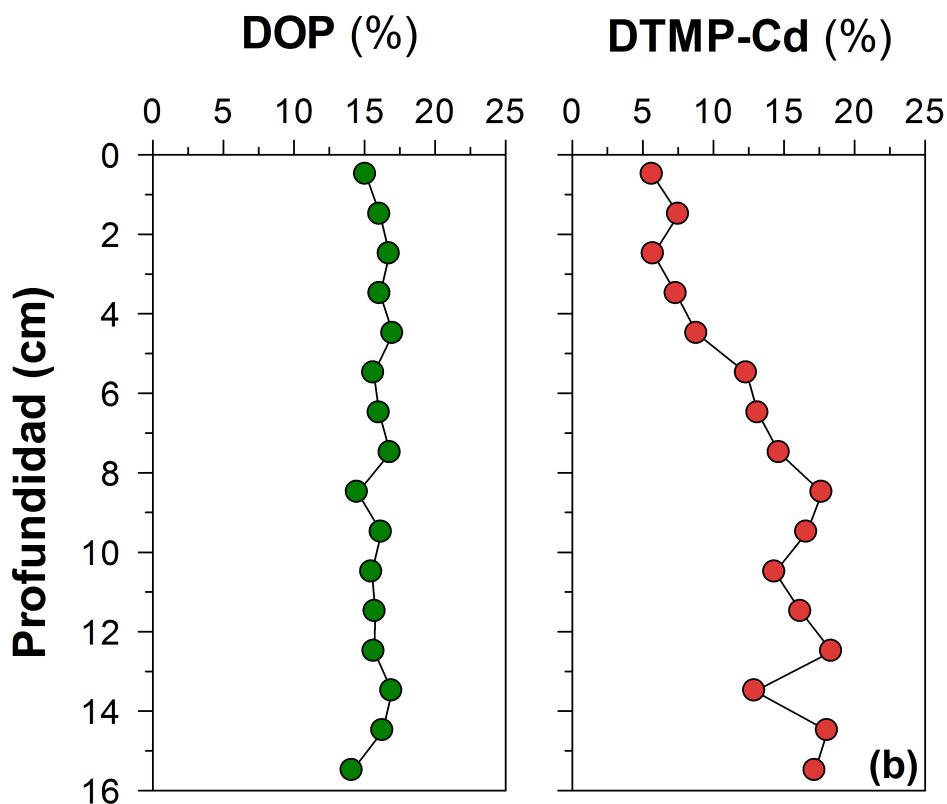


Figura 3.5. Perfiles verticales del (a) grado de piritización (DOP) y, (b) grado de piritización de metal traza para el Cd (DTMP-Cd) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada.

3.4.3. Concentración de Cd total y normalización con Al

Las concentraciones promedio de Cd_T en los sedimentos superficiales del PE ($3.05 \pm 0.29 \text{ nmol g}^{-1}$) donde se tomaron las muestras durante los FAD, fueron mayores que las medidas en la misma zona un año después y en ausencia de florecimientos ($2.24 \pm 0.32 \text{ nmol g}^{-1}$, Tabla 3.2). En la zona N-BTS la concentración promedio de Cd_T , al igual

que el Cd_{HCl} , Cd_{Pirita} y Cd_{FR} , fue inferior ($1.71 \pm 0.41 \text{ nmol g}^{-1}$) a los valores obtenidos en el PE durante los FAD. La concentración de Cd_T no mostró cambios substanciales con la profundidad del sedimento (Figura 3.6a), sólo un ligero incremento en la concentración entre los 4 y 13 cm de profundidad (hasta 2.58 nmol g^{-1}). A partir de esta última profundidad la concentración de Cd volvió a disminuir (hasta 1.96 nmol g^{-1} a los 16 cm) a valores similares a los medidos en la superficie (2.01 nmol g^{-1}). Al normalizar la concentración de Cd_T con la del Al_T (Cd_T/Al_T), se pudo observar que el perfil resultante presentó la misma tendencia que la del Cd_T sin normalizar (Figura 3.6b).

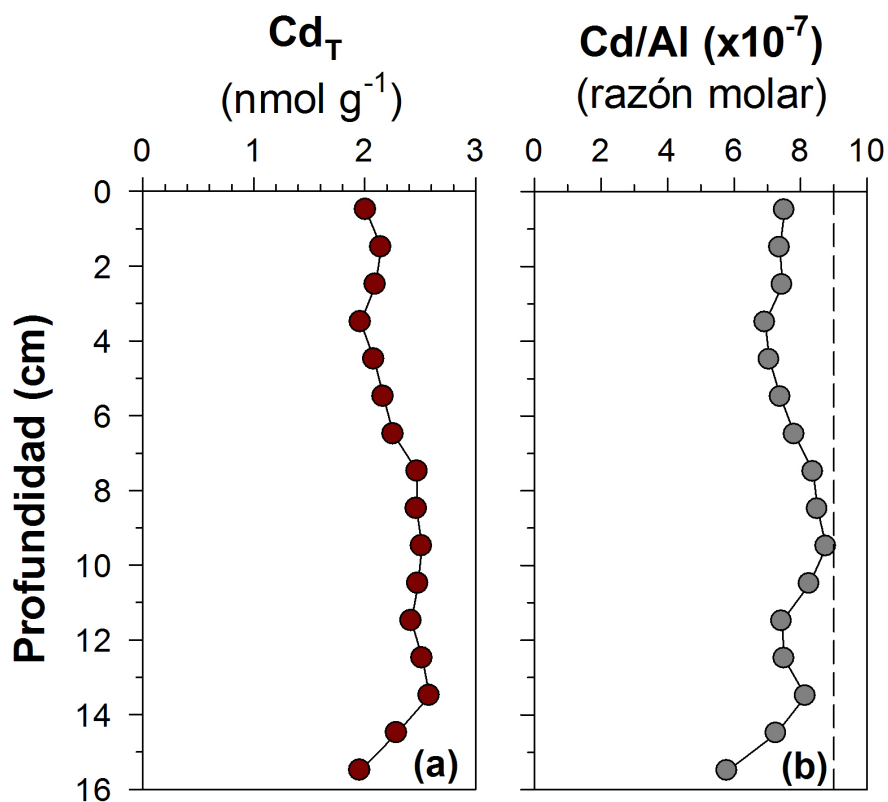


Figura 3.6. Perfiles verticales de la (a) concentración de Cd total (Cd_T) y, (b) razón molar Cd_T/Al_T para el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada. La línea discontinua en (b) indica la razón $(Cd_T/Al_T)_{corteza}$ calculada a partir de los datos de Turekian y Wedepohl (1961) y Li y Schoonmaker (2005).

3.4.4. Factor de enriquecimiento

Los factores de enriquecimiento (expresados como razón molar) de Cd en sedimentos superficiales de la zona N-BTS estuvieron en el rango de 0.53 – 0.70. En la zona de muestreo del Puerto de Ensenada los rangos de FE_{Cd} durante (0.86 – 1.11) y en ausencia (0.76 – 0.99) de FAD fueron similares (Tabla 3.2). En el perfil del núcleo

del PE, el FE_{Cd} presentó pequeñas variaciones con la profundidad, con una leve disminución durante los primeros 3 cm (0.84 – 0.77), a partir de la cual se incrementaron los valores hasta alcanzar los 9 cm, con un valor máximo de 0.97. Posteriormente, el FE_{Cd} volvió a disminuir hasta alcanzar la zona más profunda del núcleo, en donde se registró el valor más bajo (0.64, Figura 3.7).

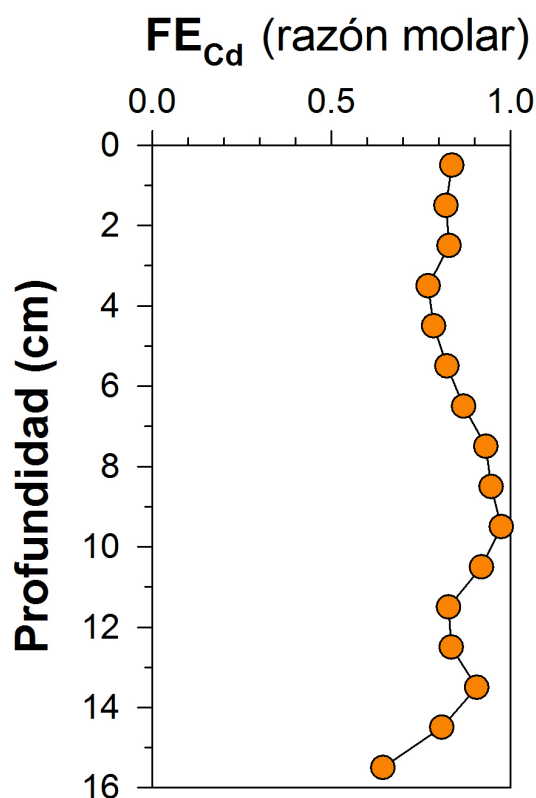


Figura 3.7. Factores de enriquecimiento de Cd ($FE_{Cd} = [Cd_T/Al_T]_{muestra}/[Cd_T/Al_T]_{corteza}$) en el núcleo de sedimento obtenido en el Puerto de Ensenada. La razón Cd_T/Al_T en la corteza terrestre fue calculada a partir de los datos de Turekian y Wedepohl (1961) y Li y Schoonmaker (2005).

3.5. Discusión

3.5.1. Cd en las fracciones HCl, pirita y reactiva

El Cd en los sedimentos de la zona N-BTS y en la zona en donde se tomaron las muestras en el PE (altas abundancias de *L. polyedrum*) se asoció preferencialmente a la fracción operacionalmente definida como HCl, la cual representó entre el 82 – 94% del Cd asociado a la fracción reactiva ($Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$). El Cd asociado a las fracciones HCl y pirita varió de manera casi lineal, ya sea aumentando (Cd_{Pirita}) o disminuyendo

(Cd_{HCl}) con la profundidad (Figura 3.2), como lo demuestran las correlaciones altamente significativas obtenidas entre las concentraciones de Cd y la profundidad para la fracción HCl ($r = -0.89$, $P < 0.001$, $n = 16$; Figura 3.3a) y pirita ($r = 0.74$, $P \leq 0.001$, $n = 16$; Figura 3.3b). Las bajas concentraciones de Cd asociado a la fracción pirita en sedimentos superficiales y en todo el perfil sedimentario determinadas en el presente estudio, indican una baja asociación con este mineral. Sin embargo, la disminución en las concentraciones de Cd_{HCl} y el incremento de Cd_{Pirita} con la profundidad, indica que hay una transferencia de Cd de la fracción HCl a la pirítica (Figura 3.2). Los resultados del presente estudio, indican que existe una fuerte dependencia de las concentraciones de Cd y Fe asociados a las fracciones HCl y pirita en el núcleo, tal y como lo indican las correlaciones significativas ($P < 0.01$) entre las concentraciones de estos dos elementos para cada una de las fracciones. La correlación fue negativa para los elementos asociados al HCl ($r = -0.63$, $n = 16$), lo que indica que el Cd_{HCl} disminuye con la profundidad conforme el Fe_{HCl} se incrementa. Para el caso de Cd y Fe asociados a la pirita, la correlación fue positiva ($r = 0.57$, $n = 16$), es decir que la concentración de estos elementos se incrementa con la profundidad.

La pirita actúa como un importante sumidero de metales traza en ecosistemas marinos (Huerta-Díaz y Morse, 1992) y, en sedimentos óxicos cercanos a la interfase agua-sedimento la pirita no se forma diagenéticamente (Berner, 1970). Se ha reportado que los sedimentos del PE son por lo general anóxicos-sulfídicos hasta la interfase agua-sedimento (Huerta-Díaz et al., 2008), tal y como se observó en este estudio por el color del sedimento (casi negro) y por su fuerte olor a ácido sulfhídrico. La oxidación de la materia orgánica en los sedimentos favorece la producción de ácido sulfhídrico (H_2S) durante los procesos de reducción de sulfato, promoviendo la precipitación de pirita al combinarse el H_2S con el Fe disuelto proveniente de la disolución reductiva de los oxihidróxidos de Fe. Se ha propuesto que el Cd, un elemento que no es significativamente piritizado, forma sulfuros de Cd (CdS) antes de la formación de FeS y su subsecuente transformación a pirita (Morse y Luther, 1999). Si los sedimentos reducidos son expuestos a condiciones óxicas (procesos de dragado, resuspensión) podría suceder que los metales asociados a la pirita se liberaran rápidamente debido a la inestabilidad de este mineral autigénico, tal como lo reporta Carroll et al. (2002). Sin embargo, considerando que en este estudio las concentraciones de Cd asociadas a la fracción pirita fueron bajas, la removilización de Cd de los sedimentos en el N-BTS y la zona del PE, podría no tener relevancia.

Las concentraciones promedio de Cd reactivo ($Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$) fueron mayores en los sedimentos superficiales del PE, en comparación a los sedimentos del N-BTS (Tabla 3.2), lo que sugiere que la zona del PE en donde se tomaron las muestras está más enriquecida en Cd reactivo. A pesar de que se tiene un limitado número de muestras durante y en ausencia de FAD, es posible inferir que la concentración promedio de Cd

en la fracción reactiva fue mayor en la zona del PE ($2.45 \pm 0.34 \text{ nmol g}^{-1}$) durante los florecimientos. Estos resultados sugieren que las diferencias pueden ser debidas a: (1) sedimentación de material particulado producido durante los FAD, y/o (2) a las características particulares de las zonas en donde se tomaron las muestras (e.g. tamaño de grano, condiciones redox, energía del oleaje). La sedimentación de material particulado podría explicar las mayores concentraciones de Cd_{FR} en sedimentos superficiales, ya que coincidieron con las mayores abundancias del dinoflagelado *L. polyedrum*, en especial en el PE (hasta $1.82 \times 10^6 \text{ células L}^{-1}$, FAD-2011) y, con altas concentraciones de Cd disuelto y particulado ($0.74 \pm 0.23 \text{ nM}$ y $0.870 \pm 0.099 \text{ nmol kg}^{-1}$, respectivamente) en comparación a los datos obtenidos en ausencia de FAD. El Puerto de Ensenada y la zona N-BTS presentan diferentes características físicas que influyen en el asentamiento y preservación del material procedente de la columna de agua, las cuales podrían explicar también las diferencias en las concentraciones de Cd. En el Puerto de Ensenada se da un mayor asentamiento y preservación del material particulado por ser una zona protegida, con baja energía de oleaje y con un menor tamaño de grano (Peña-Manjarrez et al., 2005, 2009), contrario a las zonas más dinámicas del norte de la BTS en donde se tomaron las muestras. Durante el mismo período de estudio (FAD-2011) y en la misma zona de muestreo, Ruiz-de la Torre et al. (2013) reportaron que, como consecuencia del esfuerzo del viento y las corrientes de marea, los parches formados por la gran acumulación de células de *L. polyedrum* en aguas superficiales de la BTS, tienden a desplazarse rápidamente. Por tanto, las concentraciones de Cd en las diferentes fracciones, determinadas en los sedimentos de la zona N-BTS, no necesariamente reflejarían la lluvia de materia orgánica proveniente del FAD. Se sugiere que en estudios posteriores se amplíe y mejore la red de muestreo de sedimentos superficiales en la BTS y el PE durante y en ausencia de FAD, así como al final de estos eventos. De esta manera se podría inferir si los florecimientos algales de *L. polyedrum* son capaces de afectar la química de los sedimentos y el ciclo del Cd.

El Cd en la fracción reactiva ($\text{Cd}_{\text{HCl}} + \text{Cd}_{\text{Pirita}}$) en sedimentos superficiales representó entre 78 y 100% la concentración de Cd_T y, en promedio, $68 \pm 12\%$ en el perfil del núcleo del PE, con los mayores valores cerca de la interfase agua-sedimento. Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por Adekola et al. (2010), quienes estudiaron el efecto ambiental de algunos metales traza (Mn, Pb, Cu, Fe y Cd) en sedimentos anóxicos del Lago Kainji. Estos autores reportaron que el 60% del Cd_T se encontraba en forma biodisponible. Los resultados del presente estudio indican que el Cd está presente principalmente en su forma reactiva y que por lo tanto podría estar biodisponible para los organismos. Para iniciar un nuevo florecimiento de *L. polyedrum* se requiere, además de las condiciones favorables para su desarrollo, la resuspensión de los quistes que están en los sedimentos (Peña-Manjarrez et al., 2005) y cuando esto sucede, es posible una liberación de los metales asociados al

sedimento. Para el caso particular del PE, considerado como una de las principales zonas semillero de quistes de *L. polyedrum* de la BTS, la removilización de los sedimentos (anóxicos) y quistes, contribuiría a la liberación del Cd presente. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en este estudio, en donde se encontró que la gran mayoría del Cd se encuentra en la fracción HCl y muy poco en la pirítica, la removilización de Cd no tendría un efecto considerable, a menos que este elemento se encuentre asociado a los AVS, los cuales son disueltos durante la digestión con HCl.

A pesar de que en este estudio la contribución relativa de Cd reactivo en relación al Cd_T fue elevada ($> 60\%$), las concentraciones de Cd_{FR} obtenidas en la BTS y el PE (rango: $1.23 - 3.09 \text{ nmol g}^{-1}$) fueron inferiores a las reportadas por Huerta-Diaz y Morse (1992) en sedimentos anóxicos del Golfo de México; Bahía Baffin y Delta del Mississippi (hasta $\sim 18 \text{ nmol g}^{-1}$), Green Canyon (hasta $\sim 27 \text{ nmol g}^{-1}$) y plataforma y talud del Golfo de México (hasta $\sim 29 \text{ nmol g}^{-1}$). También se han reportado altas concentraciones de Cd_{FR} en sedimentos anóxicos hipersalinos de la Cuenca Orca ($\sim 30 \text{ nmol g}^{-1}$; Huerta-Diaz y Morse, 1992) y la salina de Guerrero Negro (México, $\sim 23 \text{ nmol g}^{-1}$; Huerta-Diaz et al., 2011), así como en sedimentos óxico-anóxicos de la costa del Pacífico de Baja California (~ 11 a 23 nmol g^{-1} ; Nava-López y Huerta-Diaz (2001). En los estudios antes mencionados las concentraciones de Cd asociadas a la fracción HCl fueron las que contribuyeron a las altas concentraciones de Cd reactivo.

3.5.2. DOP y DTMP

Los grados de piritización (DOP) en sedimentos superficiales del PE, así como en el núcleo, fueron relativamente bajos ($\leq 17\%$, Figura 3.3) considerando las condiciones anóxicas de los sedimentos del PE. Nava-López y Huerta-Diaz (2001) reportaron valores similares para sedimentos de la costa del Pacífico de Baja California, con DOP de alrededor del 2% (capa óxica) en los primeros 7 cm de profundidad, con incrementos subsecuentes de hasta 19% en la zona anóxica. Los grados de piritización son indicadores importantes de la reactividad del Fe hacia la pirita sedimentaria para establecer si el sedimento se encuentra limitado por la disponibilidad de Fe lábil y hasta qué punto el Fe lábil ha sido transferido al reservorio pirítico. En el núcleo del PE, la concentración de Fe asociado a la fracción pirita fue, en promedio, $13.4 \pm 1.3 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$, valor aproximadamente cinco veces menor que su concentración asociada a la fracción HCl ($65.4 \pm 6.3 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$).

El grado de piritización de metales traza para el Cd (DTMP-Cd), al igual que para el DOP, fue generalmente bajo ($< 18 \%$), lo que confirma que el Cd en general no presenta una alta afinidad por la pirita y, por lo tanto, que únicamente una pequeña parte de la fracción reactiva de este elemento se encuentra piritizado (Tabla 3.2). A lo largo del núcleo fue evidente un incremento en la piritización del Cd (6 y 18%, superficie y fondo respectivamente; Figura 3.5b), similar a los valores de 5 – 12%,

reportados por Nava-López y Huerta-Díaz (2001) para la costa del Pacífico de Baja California. Huerta-Díaz y Morse (1992) en sedimentos anóxico-sulfídicos reportaron también una muy baja asociación del Cd con la pirita ($\text{DTMP-Cd} \leq 10\%$), lo que atribuyeron a que incrementos en la concentración de H_2S podría incrementar la concentración de complejos solubles de sulfuro de Cd, dejando menos Cd disuelto disponible para la formación de sulfuros de Cd sólidos.

3.5.3. Cd total y factor de enriquecimiento

Las diferencias entre las concentraciones de Cd_T medidas en los sedimentos superficiales del PE en donde se tomaron las muestras (3.05 ± 0.29 y $2.24 \pm 0.32 \text{ nmol g}^{-1}$, FAD y no FAD respectivamente) y las medidas en la zona noreste de la BTS durante los FAD ($1.71 \pm 0.41 \text{ nmol g}^{-1}$), pueden atribuirse a las diferencias en el tamaño de grano, como se mencionó anteriormente. La concentración promedio de Cd_T en sedimentos superficiales del N-BTS durante los FAD, fue dos a seis veces mayor que las reportadas por Romero-Vargas-Márquez (1995) para esta misma zona (0.03 a $0.08 \mu\text{g g}^{-1} \approx 0.27$ a 0.71 nmol g^{-1}) en 1992. En los sedimentos superficiales del PE, en donde se tomaron las muestras, las concentraciones de Cd_T coincidieron con los valores reportados por Romero-Vargas-Márquez (1995) para la parte interna del PE ($0.32 \mu\text{g g}^{-1} \approx 2.85 \text{ nmol g}^{-1}$) pero difieren de los valores reportados por Huerta-Díaz et al. (2008). Estos autores reportaron concentraciones mayores en un orden de magnitud ($\approx 40 \text{ nmol g}^{-1}$) en sedimentos superficiales, para una zona cercana a la del presente estudio, con una tendencia a incrementar hacia la parte interna del puerto (hasta $\approx 49 \text{ nmol g}^{-1}$).

El perfil de Cd_T presentó la misma tendencia que el perfil normalizado con el Al_T (Cd_T/Al_T , Figura 3.6a, b), lo cual sugiere que los cambios observados en el Cd_T no fueron producidos por cambios en las tasas de aporte, sino por cambios diagenéticos. La concentración promedio de Cd_T en el núcleo del PE ($2.28 \pm 0.22 \text{ nmol g}^{-1}$) fue 15 veces menor ($35.3 \pm 3.4 \text{ nmol g}^{-1}$) que la reportada por Huerta-Díaz et al. (2008) en el 2002, en una zona cercana a la zona de muestreo del presente estudio. Los resultados del presente estudio indican que los niveles de Cd en la zona norte de la BTS y en la zona de muestreo del PE, son relativamente bajos. Sin embargo, no puede extrapolarse a los sedimentos de toda la BTS ni a los del Puerto en general, ya que el diseño de muestreo de este estudio no lo permite.

A partir de los factores de enriquecimiento (razón molar) calculados para el núcleo del Puerto de Ensenada (0.845 ± 0.080) y para sedimentos superficiales de la zona N-BTS (0.64 ± 0.10) y del PE (1.04 ± 0.11 y 0.85 ± 0.10 , FAD y no FAD respectivamente), se pudo identificar que el Cd presentó un comportamiento similar, tanto en la columna sedimentaria como en los sedimentos superficiales. Los FE indican que los sedimentos de N-BTS se encuentran empobrecidos en Cd ($\text{FE} < 1$) con relación a los valores de la

corteza terrestre. Los FE_{Cd} en los sedimentos del Puerto de Ensenada están, en promedio, muy cercanos a la unidad, lo que indica que posiblemente no están empobrecidos ni enriquecidos en Cd. Estos factores de enriquecimiento son muy bajos comparados con los obtenidos por Huerta-Díaz et al. (2008), quienes reportaron altos enriquecimientos de Cd (10 ± 3) en diferentes núcleos del PE. Estos autores sugieren que las altas concentraciones de Cd son una consecuencia del enriquecimiento de Cd en el plancton presente en aguas de Baja California (Martín y Broenkow, 1975). Dado que los procesos que ocurren en la columna de agua con el material orgánico e inorgánico tienen su destino final en los sedimentos, el Cd podría ser preservado y/o liberado nuevamente a la columna de agua, como parte de su ciclo biogeoquímico y esto podría estar sucediendo durante los FAD. Cabe mencionar que las mayores concentraciones de Cd en los sedimentos, coincidieron con la presencia de los FAD, así como con las más altas concentraciones de Cd en la superficie tanto en la fase particulada, como en la fase disuelta (Capítulo 1). Por problemas metodológicos no fue posible hacer uso de los datos del fechado del sedimento y del conteo de quistes de *L. polyedrum* en las diferentes capas de la columna sedimentaria. Por lo anterior, no se puede determinar si existe un registro histórico de la variabilidad temporal en la abundancia de quistes y de Cd en el Puerto de Ensenada, semillero de quistes para el desarrollo de nuevos florecimientos de *L. polyedrum* (Peña-Manjarrez et al., 2005).

3.6. Conclusión

Las concentraciones de Cd asociadas a las fracciones HCl y pirita mostraron que el Cd tiende a acumularse en la fracción HCl y muy poco a la pirita. Estas bajas concentraciones de Cd y Fe en la fracción pirita determinaron la presencia de bajos valores de DOP y DTMP-Cd. El Cd se encontró presente en los sedimentos preferentemente en su forma reactiva ($Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$), representando por lo general más del 60% del Cd_T . Sin embargo, las concentraciones de Cd_{FR} en la BTS y el PE (rango: $1.23 - 3.09 \text{ nmol g}^{-1}$) son muy bajas, comparadas con valores reportados para sedimentos anóxicos de otras zonas de estudio (Huerta-Díaz y Morse, 1992; Nava-López y Huerta-Díaz, 2001; Huerta-Díaz et al., 2011), lo que sugiere que la contribución relativa del Cd biodisponible por efectos de la resuspensión de los sedimentos, sería relativamente baja. De forma general, los FE_{Cd} muestran que la zona noreste de la BTS no está enriquecida en Cd con relación a los valores de la corteza terrestre, mientras que en el Puerto de Ensenada podría decirse que la zona de muestreo no está enriquecida ni empobrecida ($FE_{Cd} \leq 1$). Las concentraciones de Cd_T en la zona noreste de la BTS fueron hasta seis veces mayores que las reportadas por Romero-Vargas-Márquez (1995), mientras en la zona del PE fueron hasta un orden de magnitud menor que las reportadas por Huerta-Díaz et al. (2008) dentro del puerto y muy cerca del área de muestreo del presente estudio. A pesar de que el diseño de muestreo no permite

extrapolar los resultados a toda la zona de estudio, en el PE durante los FAD, se registraron las mayores concentraciones promedio de Cd en las diferentes fracciones (HCl, pirita, reactiva y total), así como los más altos FE_{Cd} , DOP y DTMP-Cd. La información que nos provee el presente trabajo es relevante para el estudio de la biogeoquímica del Cd y su relación con los florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum*. Sin embargo, es necesario un estudio más detallado para poder confirmar si existe una relación entre la precipitación de material particulado procedente de los FAD y la concentración de Cd en los sedimentos.

3.7. Referencias

- Adekola, F.A., Adbus-Sam, Bale, N.R.B., Oladeji, I.O. 2010. Sequential extraction of trace metals and particle size distribution studies of Kainji Lake sediment, Nigeria. *Chem. Spec. Bioavailab.* 22: 43-49.
- Berner, R.A. 1970 Sedimentary pyrite formation. *Am. J. Sci.* 268: 1-23.
- Blake, A.C., Chadwick, D.B., Zirino, A., Rivera-Duarte, I. 2004. Spatial and temporal variations in copper speciation in San Diego Bay. *Estuaries* 27: 437-447.
- Carignan R, Tessier. A. 1988. The co-diagenesis of sulfur and iron in acid lake sediments of southwestern Quebec. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52: 1179-1188.
- Carreón-Martínez, L.B., Huerta-Díaz, M.A., Nava-López, C., Siqueiros-Valencia, A. 2001. Mercury and silver concentrations in sediments from the Port of Ensenada, Baja California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 415-418.
- Carreón-Martínez, L.B., Huerta-Díaz, M.A., Nava-López, C., Siqueiros-Valencia, A. 2002. Levels of reactive mercury and silver in sediments from the Port of Ensenada, Baja California, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 138-147.
- Carroll, S., O'Day, P.A., Esser, B., Randall, S. 2002. Speciation and fate of trace metals in estuarine sediments under reduced and oxidized conditions, Seaplane Lagoon, Alameda Naval Air Station (USA). *Geochem. Trans.* 3: 81-101.
- Gao, S., Collins, M.B. 1994, Analysis of grain size trends, for defining sediment transport pathways in marine environments. *J. Coastal Res.* 10: 70-78.
- García-Hernández, J., García-Rico, L., Jara-Marini, M.E., Barraza-Guardado, R., Hudson Weaver, A. 2005. Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 733-739.
- García-Rico, L., Soto-Cruz, M.S., Jara-Marini, M.E., Gómez-Álvarez, A. 2010. Fracciones geoquímicas de Cd, Cu y Pb en sedimentos costeros superficiales de zonas ostrícolas del estado de Sonora, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 20: 159-167.
- De Gregori I, H. Pinochet C., M. Arancibia J., A. Vidal B. 1996. Grain size effect on trace metals distribution in sediments from two coastal areas of Chile. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 163-170
- Huerta-Díaz, M.A., Morse, J.W. 1990. A quantitative method for determination of trace metal concentrations in sedimentary pyrite. *Mar. Chem.* 29: 119-144.
- Huerta-Díaz, M.A., Morse, J.W. 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine

- sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56: 2681-2702.
- Huerta-Díaz, M.A., Reimer, J. 2010. Biogeochemistry of Sediments. En *Biogeochemistry and pedogenetic process in saltmarsh and mangrove systems*. X.L.O. Pérez y F.M. Vazquez eds. Nova Science Publishers Inc. New. York. p. 1-24.
- Huerta-Díaz, M.A., Delgadillo-Hinojosa, F., Hernández-Ayón, M., Segovia-Zavala, J.A., García-Esquivel, Z., López-Zárate, H., Siqueiros-Valencia, A., Galindo-Bect, S. 2008. Diagnosis of trace metal contamination in sediments: The example of Ensenada and El Sauzal, two harbors in Baja California, México. *Mar. Environ. Res.* 66: 345-354.
- Huerta-Díaz M.A., Delgadillo-Hinojosa F., Otero X.L., Hernández-Ayón J.M., Segovia-Zavala J.A., Galindo-Bect, M.S., Amaro-Franco E. 2011. Iron and trace metals in microbial mats and underlying sediments: results from Guerrero Negro saltern, Baja California Sur, México. *Aquat. Geochem.* 17: 603-628.
- Lares, M.L., Marinone, S.G., Rivera-Duarte, I., Beck, A., Sañudo-Wilhelmy, S. 2008. Spatial variability of trace metals and inorganic nutrients in surface waters of Todos Santos Bay, México in summer of 2006 during a red tide bloom. *Arch. Environ. Con. Tox.* 56: 707-716.
- Li, Y-H, Schoonmaker, J.E. 2005. Chemical composition and mineralogy of marine sediments. In *Treatise on Geochemistry: sediments, diagenesis, and sedimentary rocks*, Vol 7 (ed. Mackenzie F.T.; Executive Directors Holland HD, Turekian KK). Elsevier-Pergamon, Oxford, 1-35 p.
- Loring, D.H., 1991. Normalization of heavy-metal data from estuarine and coastal sediments. *ICES J. Mar. Sci.* 48: 101-115.
- McKay, J.L., Pedersen, T.F., Mucci, A. 2007. Sedimentary redox conditions in continental margin sediments (N.E. Pacific) – Influence on the accumulation of redox-sensitive trace metals. *Chem. Geol.* 238: 180-196.
- Mandujano-Velasco, M.R. 2007. Distribución espacial y enriquecimiento de metales pesados en sedimento superficial de la bahía de Todos Santos, B.C., México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México. 64 p.
- Martin, J.H., Broenkow, W.W. 1975. Cadmium in plankton: elevated concentrations off Baja California. *Science* 190: 884-885.
- Morse, J.W., Luther III, G.W. 1999. Chemical influences on trace metal-sulfide interactions in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 63: 3373-3378.
- Nava-López, C., Huerta-Díaz, M.A. 2001. Degree of trace metal pyritization in sediments from the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Rev. Cienc. Mar.* 27: 289-309.
- Noriki, S., Ishimori, N., Harada, K., Tsunogai, S. 1985. Removal of trace metals from seawater during a phytoplankton bloom as study with sediment traps in Funka Bay, Japan. *Mar. Chem.* 17: 75-89.
- Okamoto O.K., Shao, L., Hastings, J.W., Colepicolo, P. 1999. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 123: 75-83.
- Pavía, E.G., 2004. La influencia de los ciclones tropicales en la lluvia del noroeste de Baja California y suroeste de California. *Geos.* 24: 69-72.
- Peña-Manjarrez, J.L. 2001. Ecofisiología de Dinoflagelados Productores de Mareas Rojas en la Bahía de Todos Santos. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México. 133 p.

- Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., Orellana-Cepeda, E., 2001. Cysts of *Lingulodinium polyedrum*, red tide producing organism in the Todos Santos Bay (winter-spring, 2000). Rev. Cienc. Mar. 27: 543-558.
- Peña-Manjarrez, J. L., Helenes, J., Gaxiola, G. Orellana, E., 2005. Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay. Cont. Shelf Res. 25: 1375-1393.
- Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Environmental factors influencing the variability of *Lingulodinium polyedrum* and *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) cyst production. Rev. Cienc. Mar. 35. 1-14.
- Reyes-Coca, S., Troncoso-Gaytan, R. 2004. Modulación multidecenal de la lluvia invernal en el noroeste de Baja California. Rev. Cienc. Mar. 30: 99-108.
- Romero-Vargas-Márquez, I.P. 1995. Metales pesados y sus fracciones químicas en sedimentos de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México. 86 p.
- Rosas-Rodríguez, H. 2001. Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Departamento de Ingeniería Minera, Recursos Naturales. En <http://hdl.handle.net/10803/6978>
- Ruiz-de la Torre, M.C., Maske, H., Ochoa, J., Almeda-Jauregui, C.O. 2013. Maintenance of coastal surface blooms by surface temperature stratification and wind drift. PLoS ONE 8(4): e58958.
- Sandoval-Salazar, G. 1999. Metales pesados en sedimentos superficiales de la cuenca de las californias: frontera México-E.U.A. a Bahía Todos Santos, Ensenada, Baja California, México. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California, México. 55 p.
- Schropp, S.J., Lewis, F.G., Windom, H.L., Ryan, J.D. 1990. Interpretation of metal concentrations in estuarine sediments of Florida using aluminum as a reference element. Estuaries 13: 227-235.
- Sundelin, B., Eriksson, A.K. 2001. Mobility and bioavailability of trace metals in sulfidic coastal sediments. Environ. Toxicol. Chem. 20: 748-756.
- Turekian, K.K., Wedepohl, K.H. 1961. Distribution of the elements in some major units of the Earth's crust. Geol. Soc. Am. Bull. 72: 175-192.
- Zhuang, Y., Allen, H.E., Fu, G. 1994. Effect of aeration of sediment on cadmium binding. Environ. Toxicol. Chem. 13: 717-724.
- Yaru, B.T., R.T., Buckney. 2000. Metal interactions in contaminated freshwater sediments from the fly river floodplain, Papua New Guinea. Inter. J. Environ. Studies 57: 305-331.

Conclusiones generales

Durante la presencia de dos florecimientos de dinoflagelados (FAD) durante los otoños de 2011 y 2012) en la Bahía de Todos Santos (BTS), se registró una gran variabilidad espacial en la abundancia de células de *Lingulodinium polyedrum* dentro de un mismo florecimiento, así como en las concentraciones de Cd disuelto (Cd_d), en especial durante el FAD-2011. Esta variabilidad demuestra que *L. polyedrum* se distribuye por parches y que los cambios en la química del agua están asociados con esta distribución. La hipótesis inicial consideraba que *L. polyedrum* tenía la capacidad de asimilar Cd_d y PO_4^{3-} del medio, los cuales serían puestos en solución al final del florecimiento. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron altos valores de Cd_d al final de los FAD, por el contrario, las altas concentraciones promedio (0.71 ± 0.17 y 0.49 ± 0.35 nM) de Cd_d obtenidas en el FAD-2011, comparadas con los valores de referencia (hasta 0.192 nM, R-2013), se registraron durante los periodos de altas abundancias de células. Una posible explicación a las altas concentraciones de Cd_d en aguas superficiales durante el FAD-2011 son los procesos de asimilación y regeneración de Cd como resultado de la remineralización de la gran cantidad de material particulado producido durante los FAD, aunado a la posible presencia de ligandos orgánicos que pueden ser secretados por *L. polyedrum*, como ha sido reportado para otras especies de microalgas y que podrían contribuir a mantener al Cd en solución.

Las altas concentraciones de Cd particulado (Cd_p), relacionadas con las mayores abundancias de *L. polyedrum*, sugieren que esta especie, principal componente del material particulado durante estos florecimientos, efectivamente está asimilando y concentrando Cd y PO_4^{3-} , como se verificó mediante experimentos de asimilación realizados en el laboratorio y utilizando concentraciones de exposición similares a las reportadas en la BTS durante la presencia de FAD. En estos experimentos se pudo apreciar que la diferencia en las remociones de Cd y PO_4^{3-} radica en la velocidad con que son removidos del medio, ya que la mayor cantidad de Cd removido se presentó durante las primeras 24 h de exposición, mientras que el PO_4^{3-} se removió lenta y gradualmente. En el tratamiento expuesto a las más altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} (FAD-2005), representativas del medio natural, fue en donde se removió la mayor cantidad de estas dos especies disueltas. Cabe resaltar que la capacidad de asimilación de Cd por *L. polyedrum*, podría ser independiente de la concentración de Zn que hay en el medio, ya que los cultivos no presentaban limitación de Zn y aún así se dio una rápida remoción de Cd del medio. A pesar de las bajas o altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} a las que fueron expuestas, las células alcanzaron abundancias comparables a las reportadas durante los florecimientos algales de 2011 y 2012 en la BTS. Se pudo apreciar que las altas concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} manejadas en este estudio (1.62 ± 0.18 nM y 6.18 ± 0.16 μ M, respectivamente),

similares a las mayores concentraciones reportadas en la BTS durante florecimientos de *L. polyedrum*, no representaron efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de este dinoflagelado.

Es conveniente resaltar que las más altas concentraciones de Cd_p (así como las de Cd_d) en el FAD-2011 estuvieron asociadas con altas abundancias celulares ($> 10^6$ células L^{-1}), sugiriendo que las elevadas abundancias de *L. polyedrum* pueden influir en la composición química del agua de la BTS. Sin embargo, las altas concentraciones de Cd_p no se reflejaron precisamente en una disminución en la fase disuelta, como se ha observado en otros estudios durante florecimientos fitoplanctónicos (Kudo y Matsunaga, 1998; Luoma et al., 1998). Este comportamiento inesperado sugiere que el desarrollo de florecimientos de dinoflagelados es un proceso bastante dinámico y complejo, en donde simultáneamente se forma Cd_p y se remineralizan partículas biogénicas, poniendo en solución preferentemente al Cd en la parte superior de la columna de agua, debido a la estratificación de las aguas superficiales de la BTS durante la presencia de FAD.

La relación Cd_d vs. PO_4^{3-} durante el FAD-2011 en la BTS sugirió una remoción preferencial de PO_4^{3-} o una menor remoción de Cd. Sin embargo, los resultados de los estudios de asimilación en el laboratorio muestran que en el tratamiento semejante al FAD-2011 el Cd fue removido de manera preferencial, mientras en los tratamientos Intermedio (0.99 ± 0.59 nM y 3.75 ± 0.03 μ M, Cd y PO_4^{3-} respectivamente) y FAD-2005 (1.62 ± 0.18 nM y 6.2 ± 0.2 μ M, Cd y PO_4^{3-} , respectivamente), expuestos a mayores concentraciones de Cd y PO_4^{3-} ; el PO_4^{3-} se removió preferencialmente. Estos resultados nos ayudan a interpretar lo que puede suceder en el medio natural, solo hay que tener en cuenta que la BTS es un sistema abierto bastante dinámico, mientras que en condiciones de experimentación se maneja un sistema cerrado en donde no hay ningún tipo de aporte al medio, no existe competencia entre especies, y se manejan condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo e irradiancia. Aún con las limitaciones que los estudios de laboratorio pueden tener, la fase de experimentación es una aproximación razonable de los diferentes escenarios que podrían suceder en el medio natural y un avance en el conocimiento del ciclo del Cd y el PO_4^{3-} en las zonas costeras marinas. Estos diferentes escenarios sugieren que la relación del Cd_d vs. PO_4^{3-} es bastante compleja, principalmente como resultado del desarrollo de florecimientos del dinoflagelado *L. polyedrum*, pero también por las características de la BTS, una zona donde la estacionalidad y el tiempo de retención del agua producen cambios en la química del agua.

El comportamiento diferencial observado entre Cd_d y PO_4^{3-} en la BTS durante los FAD, sugiere que existen diferentes procesos en la columna de agua: en la superficie captación biológica y remineralización de materia orgánica, mientras cerca del fondo se

presenta también remineralización de la materia orgánica, pero probablemente acoplada a flujos bentónicos causados por procesos diagenéticos dentro de los sedimentos (e.g., disolución reductiva de oxihidróxidos de Fe y Mn, oxidación de la materia orgánica). La gran variabilidad en la razón Cd_d/PO_4^{3-} (0.11 ± 0.03 a 2.08 ± 0.51 nM/ μ M) observada en la BTS y las diferencias observadas en las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} en comparación con aguas adyacentes del Pacífico Nororiental, sugieren un desacople en el comportamiento de estas dos especies disueltas dentro de la BTS. El desacople entre el Cd_d y el PO_4^{3-} puede ser ocasionado por las características particulares de la bahía, pero también por la presencia de florecimientos algales del dinoflagelado *L. polyedrum*. Con los resultados obtenidos, se propone un umbral de abundancia de 10^6 células L^{-1} , sugerido por el estudio de campo en la columna de agua durante los FAD y por los resultados de los experimentos de laboratorio, a partir del cual la magnitud de los florecimientos de *L. polyedrum* producen cambios importantes en la química del agua. Durante el FAD-2011, cuando la abundancia de *L. polyedrum* superó el umbral propuesto, se observaron importantes incrementos de Cd_d y Cd_p en las aguas superficiales y de PO_4^{3-} en las aguas cercanas al fondo. La correlación positiva entre la abundancia de *L. polyedrum* y el Cd_d ($r = 0.74$, $P = 0.009$, $n = 16$) y Cd_p ($r = 0.75$, $P = 0.008$, $n = 16$) durante el FAD-2011, dan apoyo adicional a la hipótesis del umbral de abundancia.

Una vez que *L. polyedrum* ha removido Cd y PO_4^{3-} de la superficie del mar durante los FAD, podrían entonces ser transportados hacia los sedimentos como parte de la lluvia de material particulado, junto con los quistes de esta especie que se producen durante el desarrollo de los florecimientos. Las muestras de sedimento superficial, en donde se registraron las más altas abundancias de *L. polyedrum* al noreste de la BTS (N-BTS) y dentro del Puerto de Ensenada (PE), coincidieron con altas concentraciones de Cd_d y Cd_p . A pesar de que el número de muestras no es representativo de toda la zona de estudio y se limitaron a los lugares en donde se concentraban los florecimientos, en el PE durante los FAD se registraron las mayores concentraciones promedio de Cd en las diferentes fracciones (HCl, pirita, reactiva y total) y los más elevados factores de enriquecimiento de Cd (FE_{Cd}), grados de piritización (DOP) y grados de piritización de Cd (DTMP-Cd). Aunque debido al reducido número de muestras no es posible llegar a conclusiones definitivas, estos resultados son consistentes con las altas concentraciones de Cd_d y Cd_p (0.74 ± 0.23 nM y 0.870 ± 0.099 nmol kg^{-1} , respectivamente) observadas en la superficie del mar durante los florecimientos algales de *L. polyedrum*. Las diferencias en las concentraciones de Cd entre la zona N-BTS y PE pueden ser atribuidas al tamaño de grano, además de que el PE es una zona más protegida y con baja energía del oleaje. Se podría esperar que en el PE las partículas se asentaran más rápidamente y fueran un reflejo de lo que sucede en la columna de agua, mientras que en los sedimentos de la zona norte de la BTS las concentraciones de Cd no necesariamente reflejan la precipitación de materia orgánica

proveniente del FAD, debido al movimiento de las masas de agua que desplazan los parches formados durante los FAD en pocas horas.

El Cd en la fracción reactiva ($Cd_{HCl} + Cd_{Pirita}$) en sedimentos superficiales representó entre 78 a 88% del Cd total (Cd_T) y, en promedio, $63 \pm 11\%$ en el perfil del núcleo del PE, con los mayores valores cerca de la interfase agua-sedimento. Las mayores concentraciones de Cd y Fe en la fracción reactiva se encontraron asociadas a la fracción HCl (superior al 80%) y muy poco a la fracción pirita, motivo por el cual se registran bajos valores de DOP ($\leq 17\%$) y DTMP-Cd ($\leq 17\%$). Es posible que si los sedimentos reducidos son expuestos a condiciones óxicas (procesos de dragado, resuspensión, etc.) el Cd pueda ser liberado nuevamente y quede disponible para los organismos. Para el caso particular del PE, considerado como una de las principales zonas semillero de quistes de *L. polyedrum*, la removilización de los sedimentos y quistes, contribuiría a la liberación del Cd presente. Sin embargo, basados en los resultados obtenidos, la removilización de Cd no tendría un efecto considerable. Se sugiere ampliar y mejorar la red de muestreo de sedimentos superficiales en la BTS y el PE durante y en ausencia de FAD y al final de estos eventos, para confirmar si efectivamente existe una relación entre la sedimentación de material particulado procedente del florecimiento (asociado con la mayores concentraciones de Cd) y la concentración de Cd en los sedimentos, tal como se observó en la columna de agua.

Por último se descarta la contribución de altas concentraciones de Cd_d a la BTS por otras fuentes, como el intercambio de aguas con el exterior de la BTS, procesos advectivos, aguas provenientes de escorrentías, actividades portuarias y por el transporte de barcos de carga o de cruceros. Se descarta la contribución por agua aflorada en el exterior de la BTS por las siguientes razones: (1) a pesar de que los eventos de surgencias se producen afuera de la bahía durante todo el año, son más frecuentes e intensos en primavera-verano, mientras que los FAD se desarrollaron en otoño; (2) a pesar de que el índice de surgencia en una estación de monitoreo ($33^\circ N$ $119^\circ W$), ubicada al norte de la zona de estudio, fue alta ($107 - 160 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} 100 \text{ m}^{-1}$ de línea de costa) dos semanas antes del FAD-2011 (evento que podría haber desencadenado el florecimiento) los datos satelitales de temperatura superficial del mar en el exterior de la bahía (NOAA-CoastWatch, 2015) no muestran cambios importantes antes del florecimiento; (3) por otra parte, se ha reportado que una vez que el agua aflorada entra en la BTS, hay un proceso de añejamiento que conduce a una disminución en las concentraciones de Cd_d y PO_4^{3-} debido a su asimilación por el fitoplancton (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015); y (4) el estudio de Ruiz-de la Torre et al. (2013) en la BTS durante los días 4 – 18 del FAD-2011 reportaron temperaturas superficiales altas (17.5 a $19^\circ C$), que no corresponden a aguas recientemente afloradas. Los procesos advectivos entonces parecen no tener un efecto importante, ya que estos procesos tenderían homogenizar las parcelas de agua y, por lo tanto,

deberían minimizar la variabilidad espacial en las concentraciones de Cd_d y en las abundancias celulares en períodos de tiempo cortos (horas a días). Esta explicación no es congruente con la alta variabilidad espacial (distribución por parches) observada en muestras recolectadas a menos de 1 km de distancia entre ellas y en períodos de muestreo que duraron menos de 2 h. Otras fuentes potenciales de Cd_d podrían ser aguas advectadas desde el PE; sin embargo, las concentraciones de Cd_d medidas dentro del puerto fueron bajas (0.23 ± 0.15 nM, $n = 5$) cuando la abundancia de *L. polyedrum* fue baja ($< 10^5$ células L^{-1} ; años 2011, 2012, 2013). Adicionalmente, estudios previos reportan concentraciones de Cd_d dentro del puerto durante primavera (0.22 y 0.33 nM; Mendoza-Lavaniegos, 2010) similares a los valores encontrados en el presente estudio. El aporte de Cd_d por aguas de escorrentías tampoco es una justificación plausible ya que en esta región las lluvias son escasas (210.4 mm año $^{-1}$, CONAGUA, 2014), además de que no se presentaron lluvias antes o durante el FAD-2011. Por otro lado, sí hubo precipitación pluvial durante el periodo en que se registró el FAD-2012 (77.1 mm en todo el mes de diciembre; CONAGUA, 2014), pero las concentraciones de Cd_d en la BTS fueron bajas ($0.123 - 0.350$ nM). Por último, se puede considerar que la contribución de metales traza por el transporte de barcos cargueros y cruceros en la BTS no es relevante en el caso del Cd, ya que estudios llevados a cabo en las bahías de San Diego y San Francisco (EUA, Flegal y Sañudo-Wilhelmy, 1993) muestran que la contribución de las embarcaciones al enriquecimiento de metales en aguas superficiales de estas dos bahías es significativa únicamente para el caso del Cu.

Referencias

- CONAGUA (COMISION NACIONAL DEL AGUA). 2014. Normales climatológicas, datos disponibles en: http://smn.conagua.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=161&tmpl=component.
- Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Diaz, M.A., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S.G., Segovia, J.A., Peña-Manjarrez, J.L., García-Mendoza, E., Castro, R. 2015. Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO $_4$ ratio in Todos Santos Bay: a retention site of upwelled waters in the Baja California península, México. *Mar. Chem.* 168: 37-48.
- Flegal, A.R., Sañudo-Wilhelmy, S.A., 1993. Comparable levels of trace metal contamination in two semi-enclosed embayments: San Diego bay and south San Francisco. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1934-1936.
- Kudo, I., Matsunaga, K., 1998. Behavior of Cu, Ni and Cd during nutrient depletion in a spring bloom in Funka Bay. *J. Oceanogr.* 54: 619-627.
- Luoma, S.N., van Geen, A., Lee, B.G., Cloern, J.E. 1998. Metal uptake by phytoplankton during a bloom in South San Francisco Bay: Implications for metal cycling in estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1007-1016.

- Mendoza-Lavaniegos, V. 2010. Variabilidad espacio-temporal de cobre y cadmio en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California, en el periodo verano 2001 – primavera 2002. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 74 p.
- Ruiz-de la Torre, M.C., Maske, H., Ochoa, J., Almeda-Jauregui, C.O. 2013. Maintenance of coastal surface blooms by surface temperature stratification and wind drift. PLoS ONE 8(4): e58958.
- NOAA-CoastWatch (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2015. Near real-time satellite data for the coastal ocean. Datos disponible en <http://coastwatch.pfel.noaa.gov/data.html>