



Maestría en Ciencias Marinas y Costeras



REVMAR

REVISTA CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS



Rector: Francisco González Alvarado

Comité Editorial Revista Ciencias Marinas y Costeras**Director**

Ricardo Jiménez Montealegre Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.

Editora

Nidya C. Nova Bustos Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.

Miembros Nacionales

Luis A. Villalobos Chacón Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.
Luis M. Sierra Sierra Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.
Maurizio Protti Quesada Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Costa Rica.
Daniel A. Ballesterio Sakson Departamento de Física, Universidad Nacional, Costa Rica.
Jorge Cortés Nuñez Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), Universidad de Costa Rica.
Álvaro Morales Ramírez Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), Universidad de Costa Rica.

Miembros Internacionales

Aida C. Hernández-Zanuy Instituto de Oceanología, Agencia de Medio Ambiente, CITMA, Cuba.
Pedro M. Alcolado Instituto de Oceanología, Agencia de Medio Ambiente, CITMA, Cuba.
Silvia Salas Márquez CINVESTAV-Mérida, México.
José L. Carballo Cenizo Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM), México.
Gabriel Márquez Couturier Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
Juan Antonio Baeza Universidad Católica del Norte de Chile, Coquimbo, Chile.
M. Soledad Fuentes Postdoctoral Associate, National Oceanic and Atmospheric Administration.
Carlos Jara Instituto de Zoología, "Ernst F. Kilian", Universidad Austral de Chile.
Anelio Aguayo-Lobo Instituto Antártico Chileno. INACH.
Georgina A. Rivera-Ingraham Alfred-Wegener-Institute for Polar and Marine Research, Bremerhaven, Alemania.
Galdy Hernández Zárate Instituto Tecnológico de Boca del Río, Boca del Río, Veracruz, México.
Jorge Eduardo Zamora Castro Instituto Tecnológico de Boca del Río, Boca del Río, Veracruz, México.
Allyse Ferrara Department of Biological Sciences, Nicholls State University.
Quenton Fontenot Department of Biological Sciences, Nicholls State University.
Esteban Fernando Félix Pico Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR-IPN, México.
Francisco J. Ocampo Torres Oceanografía Física, CICESE, Ensenada, México.
Néstor Hernando Ocampo CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe, Santa Marta, Colombia.
Julio Lamilla Gómez Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile.

Consejo Editorial de la Universidad Nacional

Dr. Marco Vinicio Méndez Coto Presidente, Consejo Editorial
Dr. Francisco Vargas Gómez
Dr. Jorge Herrera Murillo
Ing. Erick Álvarez Ramírez
Dra. Iliana Araya Ramírez
Dra. Shirley Benavides Vindas

Producción editorial: Alexandra Meléndez

578.77

R454r Revista Ciencias Marinas y Costeras / Maestría en Ciencias Marinas y Costeras y Escuela de Ciencias Biológicas. Heredia, C.R. : EUNA, 2021.
v.1: il. ; 25 cm.

ISSN 1659-455X
Semestral

1. BIOLOGÍA MARINA. 2. ECOLOGÍA EVOLUCIÓN. 3. OCEANOGRAFÍA. 4. RECURSOS MARINOS. 5. GEOLOGÍA MARINA. 6. SEDIMENTOS MARINOS. 7. TAXONOMÍA. 8. BIOTECNOLOGÍA. 9. CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS.
I. Título.

Dirección postal para canje:**Revista Ciencias Marinas y Costeras**

Escuela de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional

Apartado 86-3000, Heredia, Costa Rica.

Telefax: (506)2277-3438. Tel: (506)2277-3480

Página Web: www.una.ac.cr/revmarCorreo electrónico: revmar@una.ac.crrevcienmarycos@gmail.com

CONTENIDO

Caracterización de bacterias cultivables aisladas de sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba

Characterization of culturable bacteria isolated from mesophotic reef sites in Cuba

Eudalys Ortiz Guilarte, María Victoria Iglesias Rodríguez, Roberto Rafael Núñez Moreira, Valia Caballero Barreto, Daymarlen González Tamayo & Gladys Margarita Lugioyo Gallardo..... 9-26

Effect of metal concentration on growth and luminescence of luminous bacteria strains isolated from golfo de Nicoya, Costa Rica

Efecto de la concentración de metales en el crecimiento y la luminiscencia de cepas de bacterias luminiscentes aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica

Luis Vega-Corrales & Carolina Marín-Vindas..... 27-38

Identificación de cuatro especies de Clupeiformes (Actinopterygii) mediante análisis de secuencias de ADN mitocondrial en zonas de explotación pesquera del Golfo de Nicoya, Costa Rica

Identification of four species of Clupeiformes (Actinopterygii) through analysis of mitochondrial DNA sequences in fishing exploitation areas of the Gulf of Nicoya, Costa Rica

Carolina Sancho-Blanco, Luis Hernández-Noguera, Luis Vega-Alpízar, Rosa Soto-Rojas y Rodolfo Umaña-Castro 39-56

Condición ambiental del sedimento del sector oriental del golfo de Cariaco

Environmental condition of sediment in the eastern sector of Cariaco Gulf

María Valentina Fuentes Hernández 57-76

Anfípodos pelágicos (Amphilochea, Hyperiidea y Senticaudata) del Pacífico de Costa Rica: nuevos registros y una lista de especies actualizada

Pelagic amphipods (Amphilochea, Hyperiidea and Senticaudata) from the Pacific of Costa Rica: new records and an updated list of species

Marco Violante-Huerta, Álvaro Morales-Ramírez & Laura Sanvicente-Añorve 77-98

Instrucciones a los autores 99-129

Presentación

La Universidad Nacional de Costa Rica tiene una trayectoria de casi 30 años en el campo de las Ciencias Marinas, elaborando documentos científicos, pero con limitadas opciones de proyección del conocimiento en el campo marino. En respuesta a la necesidad de ofrecer a los investigadores nacionales e internacionales un espacio de divulgación científica de alto nivel, de publicación anual y de amplia visión, surge la creación de la *Revista Ciencias Marinas y Costeras (REVMAR)*. El propósito de esta es incorporar publicaciones originales relacionadas con las ciencias marinas, tales como: biología, geología y ecología marina, evolución, sistemática y taxonomía de los organismos marinos, oceanografía, contaminación, pesquerías, maricultura, biotecnología marina, conservación y manejo integrado de los recursos marinos y costeros. La *REVMAR* se ofrecerá de forma impresa anualmente, con su correspondiente versión digital en su sitio web, elaborado convenientemente para esos efectos. La Revista cuenta con un Comité Editorial constituido por investigadores (as) de diferentes instituciones de América Latina, que tienen un gran prestigio intelectual en el campo de las ciencias marinas y costeras y son los (as) encargados (as) de velar por la calidad científica de los trabajos que se publiquen.

Caracterización de bacterias cultivables aisladas de sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba

Characterization of culturable bacteria isolated from mesophotic reef sites in Cuba

Eudalys Ortiz Guilarte^{1*}, *María Victoria Iglesias Rodríguez*¹, *Roberto Rafael Núñez Moreira*¹,
*Valia Caballero Barreto*¹, *Daymarlen González Tamayo*¹ &
Gladys Margarita Lugioyo Gallardo^{1*}

RESUMEN

Las comunidades bacterianas de sitios de arrecifes mesofóticos constituyen información genética de interés por las condiciones particulares de temperatura, presión, salinidad y disponibilidad de materia orgánica y nutrientes en la que se desarrollan. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la diversidad bacteriana en aguas aleñañas a los arrecifes mesofóticos de Cuba en mayo-junio de 2017; así como algunas de sus potencialidades biotecnológicas. Los cultivos fueron aislados en medio agar marino, en dos niveles de la columna de agua, en 10 sitios de muestreos. Posteriormente se evaluaron las capacidades metabólicas de los aislados, relacionadas con la asimilación de diferentes fuentes de carbono y la producción de metabolitos bioactivos. Los resultados permitieron la caracterización de 30 aislados bacterianos de aguas del nivel subsuperficial y 32 de aguas profundas. El mayor porcentaje corresponde a bacilos esporulados Gram positivos y bacilos Gram negativos. Asimismo, se demostró que el 85.5% degradan carbohidratos de diferente naturaleza y el 96.8% producen enzimas hidrolíticas con actividad caseinasa, gelatinasa, lipasa o amilasa. La capacidad de degradar petróleo y compuestos fenólicos indistintamente fue detectada en el 61.3% de los aislados. Entre las potencialidades de interés biomédico e industrial se detectó actividad tensioactiva y asparaginasa en el 53% y 32% de los cultivos, respectivamente. Por su parte, la caracterización taxonómica de 40 cultivos seleccionados por sus potencialidades metabólicas demostró que el género *Bacillus* presentó mayor actividad biológica. Estos resultados constituyen el primer acercamiento a la caracterización de la diversidad bacteriana en sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba.

Palabras claves: aguas profundas, bacterioplancton, degradación, enzimas hidrolíticas, metabolitos

1 Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), calle Loma # 14, entre 35 y 37, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. laly@icimar.cu* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8043-4076>, victoria@icimar.cu ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1548-4285>, robertico@icimar.cu ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7327-9442>, valia@icimar.cu ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6452-2065>, mimi@icimar.cu ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4653-1347>, margarita@icimar.cu* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7517-8063>

ABSTRACT

The bacterial communities of mesophotic reef sites constitute genetic information of interest due to the particular conditions of temperature, pressure, salinity and availability of organic matter and nutrients in the environment in which they develop. The present work aimed to evaluate the bacterial diversity in waters surrounding the mesophotic reefs of Cuba during the period May-June 2017; as well as some of its biotechnological potentialities. Bacterial cultures were isolated on marine agar medium for two water column depth levels at 10 sampling sites. Subsequently, the metabolic capacities of the isolates were evaluated and related to the assimilation of different carbon sources and the production of bioactive metabolites. The results allowed the characterization of 30 bacterial cultures from subsurface-level and 32 from deep-sea waters. The highest percentage corresponds to Gram positive (G+) sporulated bacilli and Gram negative (G-) bacilli. Likewise, it was shown that 85.5% of the isolates degrade carbohydrates of different nature and 96.8% produce hydrolytic enzymes with caseinase, gelatinase, lipase or amylase activity. The ability to degrade petroleum oil and phenolic compounds indistinctly was detected in 61.3% of the isolates. Among the potentialities of biomedical and industrial interest, surfactant and L-asparaginase activity was detected in 53% and 32% of the cultures, respectively. For its part, the taxonomic characterization of 40 cultures selected for their metabolic potentials showed that the genus *Bacillus* presented greater biological activity. These results constitute the first approach to the characterization of bacterial diversity in mesophotic reef sites of Cuba.

Keywords: Deep-sea waters, bacterioplankton, degradation, hydrolytic enzymes, metabolites

INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas en los ecosistemas marinos desempeñan un papel importante en la mineralización de materia orgánica, así como en la transferencia de energía a otros niveles tróficos (Sivaperumal *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018; Cui *et al.* 2019). Además, los microorganismos son un componente esencial dentro de la diversidad biológica por su elevada diversidad genética y metabólica para la búsqueda de nuevos compuestos con aplicaciones biotecnológicas (Glöckner *et al.* 2012; Prabhu *et al.* 2017).

En la literatura especializada está documentado que la diversidad genética y la actividad de las bacterias marinas planctónicas están significativamente influenciadas por las

condiciones ambientales (Cui *et al.* 2019). Diversas investigaciones han demostrado que la composición de la comunidad bacteriana en los ecosistemas depende de las condiciones físico-químicas tales como temperatura, salinidad, disponibilidad de materia orgánica y nutrientes (Gilbert *et al.* 2012; Ward *et al.* 2017).

En Cuba desde el punto de vista microbiológico solo se han realizado investigaciones de calidad de las aguas en los arrecifes someros del suroeste (SW) de la Isla (Miravet, 2003), en el archipiélago Sabana-Camagüey, ubicado en la zona norcentral de Cuba (Miravet *et al.* 1994) y más recientemente en los arrecifes del golfo de Cazonés, SW de Cuba (Lugioyo *et al.* 2020), por lo que este estudio constituye el primer acercamiento al conocimiento de la

microbiota aledaña a sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba.

Los ecosistemas coralinos mesofóticos son comunidades arrecifales caracterizadas por la presencia de corales fotodependientes y comunidades asociadas en regiones tropicales y subtropicales. Estos arrecifes presentan una menor diversidad de especies en comparación con los arrecifes someros, pero comúnmente tienen mayores porcentajes de cobertura coralina (40-60%) (Olson & Kellogs, 2010). La diversidad de los arrecifes mesofóticos resulta poco conocida en la región del Caribe (Loya *et al.* 2016; Roman, 2018) y en Cuba, nunca antes se habían estudiado debido a las dificultades que impone la colecta y toma de muestras a estas profundidades.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar algunas de capacidades

metabólicas de aislados bacterianos de aguas aledañas a arrecifes mesofóticos de Cuba; así como la caracterización taxonómica de los cultivos más promisorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

La expedición científica conjunta Cuba-Estados Unidos fue realizada entre el 15 de mayo y 11 de junio de 2017, donde se muestrearon 10 sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba (Cuadro 1). Las muestras para los análisis microbiológicos se colectaron en frascos de vidrio estériles de 250 mL de capacidad y se tomaron de la capa subsuperficial (5 m) y de las aguas de las máximas profundidades (135-450 m); utilizando una roseta con botellas oceanográficas Niskin de 10 L de capacidad.

Cuadro 1. Georreferenciación de los sitios de muestreo de los arrecifes mesofóticos alrededor de Cuba

Table 1. Georeferencing of mesophotic reef sampling sites around Cuba

Estaciones	Región	Profundidad (m)	Latitud	Longitud
C-04	NW	397	22° 53.9640'	83° 35.1060'
C-10	NW	358	22° 02.3900'	85° 04.0550'
C-23	SW	450	21° 29.2540'	82° 39.3100'
C-28	SW	315	21° 33.4260'	81° 44.4540'
C-33	SW	350	22° 07.6440'	81° 07.7400'
C-48	SE	320	19° 49.4000'	77° 44.0000'
C-50	SE	301	19° 56.4000'	76° 24.0000'
C-53	NE	280	20° 19.1000'	74° 16.2999'
C-54	NE	253	21° 05.5400'	75° 39.6500'
C-58	NE	135	22° 34.0000'	78° 23.6000'

Para el aislamiento de los cultivos puros de bacterias heterótrofas se utilizó el medio ZoBell 2216E (Oppenheimer & ZoBell, 1952) de acuerdo a la metodología propuesta por [Miravet *et al.* \(2009\)](#) y el criterio de selección de las colonias fue la frecuencia de aparición de características culturales diferentes. Los cultivos axénicos fueron conservados según la metodología establecida por [Benson \(2001\)](#) y depositados en la Colección de Bacterias Marinas del ICIMAR.

Para la caracterización metabólica de los aislados fue evaluada la asimilación de carbohidratos como fuentes de carbono, suplementado con glucosa, manosa, sacarosa, lactosa y almidón al 1.0%, de acuerdo a las metodologías descritas por [Atlas \(2010\)](#). Además, se evaluó el crecimiento microbiano en compuestos xenobióticos en medio [Vela & Ralston \(1978\)](#) agarizado y utilizando indistintamente como fuente de carbono petróleo Mesa 30 (10 g/mL), fenol y pentaclorofenol (1 g/mL). Las condiciones de cultivos fueron establecidas según la metodología de [Miravet *et al.* \(2009\)](#).

La evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas se realizó a partir del crecimiento microbiano ([Harrigan & McCance, 1968](#)). Para la actividad caseinasa, amilasa y lipasa los cultivos fueron inoculados en placas Petri con medios suplementados indistintamente con caseína, almidón y Tween 80 al 1%. La actividad geletinasa se evaluó

mediante la siembra por punción del medio con gelatina al 1%. Todos los ensayos fueron incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 o 72 h de acuerdo a la experiencia. La actividad se evaluó por la formación de halos alrededor de la colonia, excepto para la gelatina determinada por la licuación del medio luego del crecimiento microbiano. La determinación semicuantitativa de la actividad caseinasa, amilasa y lipasa se calculó por la diferencia entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia ([Dias *et al.* 2009](#)).

La actividad asparaginasa fue detectada mediante el crecimiento en placas Petri con medio Glicerol Asparagina Agar suplementado con 0.3 mL de una solución de rojo fenol al 2.5% y el pH ajustado a 6.5. Los cultivos fueron incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco días, considerando como positivo la aparición de un halo de coloración rosado alrededor del crecimiento microbiano ([Sivasankar *et al.* 2013](#)).

La producción de tensioactivos se determinó a partir del cultivo fermentado en el medio propuesto por [Finnerty \(1994\)](#) y suplementado con sacarosa al 2%; durante 18 h a 125 r/min y $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en zaranda orbital (Infors HT Ecotron). Las determinaciones se realizaron a los cultivos libres de células, obtenidos por centrifugación a 7 000 xg y 4°C durante 30 min., en una centrífuga Beckman J2-H5; mediante el método de anillo de Du Noüy en un tensiómetro Krüss K 10 T. Como control negativo se empleó el

medio de cultivo. Los cultivos con valores de tensión superficial ≤ 35 mN/m fueron considerados como productores de tensioactivos.

La caracterización taxonómica de los cultivos seleccionados por sus capacidades metabólicas fue realizada mediante el sistema API con la utilización del software de identificación bacteriana APILAB Plus. Para el grupo de los bacilos Gram negativos (G-) no enterobacterias se utilizaron las tiras API 20NE, mientras para el estudio metabólico de carbohidratos y la identificación de bacilos Gram positivos (G+) esporulados se utilizó el medio API 50CHB/E, API 50CH y API 20 E.

El análisis de similitud de los aislados seleccionados se realizó por métodos aglomerativos jerárquicos mediante el coeficiente de similitud de Brays-Curtis empleando el programa

estadístico PRIMER 6.1.6. (Clarke & Warwick, 2001).

RESULTADOS

A partir de las características culturales se obtuvieron 62 aislados de bacterias heterótrofas, 30 pertenecen a las aguas del nivel subsuperficial y 32 a las aguas profundas de los sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba. La caracterización microscópica de los cultivos evidenció que el 50% de los aislados del nivel subsuperficial pertenecían al grupo de los bacilos G+ esporulados y en menor proporción los bacilos Gram positivos asporógenos (27.0%) y los bacilos G- (23.0%). En las aguas del nivel de fondo predominaron los bacilos G- (53.0%), seguido de los bacilos esporulados G+ (44.0%) y en un porcentaje bajo los bacilos G+ asporógenos (Fig. 1).



Fig. 1. Distribución de los grupos fenotípicos de las bacterias heterótrofas aisladas del nivel subsuperficial (5 m) y de las aguas profundas de sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba, en mayo-junio 2017

Fig. 1. Distribution of phenotypic groups of heterotrophic bacteria isolated from subsurface-level (5 m) and deep-sea waters of mesophotic reef sites in Cuba. Sampling period: May-June 2017

Los resultados de la asimilación de diferentes carbohidratos demostraron que el 85.5% (53/62) de los cultivos fueron capaces de utilizar al menos uno de los carbohidratos evaluados para el crecimiento celular. En particular, se demostró que más del 50.0% de los aislados de cada nivel crecieron en presencia de estos compuestos, con excepción de los polisacáridos para los aislados del nivel de fondo de los sitios de arrecifes mesofóticos (Fig. 2).

Por otra parte, se encontró que un alto porcentaje de los aislados fueron capaces de utilizar el petróleo para los procesos de multiplicación celular (53.2%, 33/62) o al menos uno de los compuestos fenólicos ensayados (50.0%, 31/62). Debe destacarse que 38 de las cepas evaluadas fueron capaces de emplear hidrocarburos y fenoles como fuente de carbono y energía.

Los aislados del grupo de bacilos G+ esporulados de ambos niveles fueron los más representados.

En general, un alto porcentaje de los aislamientos fueron capaces de emplear indistintamente monosacáridos (79.0%), disacáridos (77.4%), polisacáridos (62.9%), petróleo (53.2%) y fenoles (50.0%) como única fuente de carbono y energía. Asimismo, se evidenció que el porcentaje de cepas degradadoras varió en función de la complejidad y accesibilidad del compuesto, independiente de los niveles de la columna de agua, aunque para el nivel subsuperficial el porcentaje de cultivos degradadores fue mayor que para el nivel de fondo (Fig. 2).

Por otra parte, el 96.8% (60/62) de los aislados produjeron enzimas hidrolíticas exocelulares para al menos uno de los sustratos evaluados; aunque

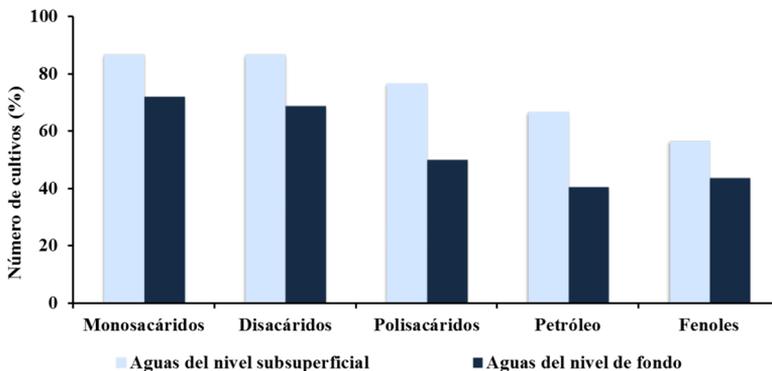


Fig. 2. Porcentaje de aislados de bacterias heterótrofas que asimilan diferentes fuentes de carbono por niveles de la columna de agua

Fig. 2. Percentage of heterotrophic bacteria isolates assimilating different carbon sources as a function of water column level

resultó notable la baja incidencia de cultivos que hidrolizan la gelatina con respecto al resto de los sustratos (Fig. 3). Los bacilos G⁺ esporulados y los bacilos G⁻ fueron los que presentaron mayor actividad hidrolítica en ambos niveles, mientras para las aguas del nivel de fondo se detectó un mayor porcentaje de cultivos del grupo de los G⁻ con actividad lipolítica (Fig. 3).

Resulta interesante que el 73.3% (44/60) de los cultivos con actividad hidrolítica presentaron la capacidad de hidrolizar entre dos o tres de los sustratos evaluados, con una distribución similar entre los aislados de las aguas subsuperficiales (23/29) y los de aguas del nivel de fondo (21/31).

A partir de la determinación semicuantitativa de la producción de

las enzimas caseinasa, amilasa y lipasa se estableció la clasificación de los cultivos positivos según Ong *et al.* (2011). En particular, se demostró que 46 cultivos presentaron alta actividad enzimática para al menos una de las enzimas hidrolíticas evaluadas, con la formación de halos de hidrólisis >8mm. Asimismo, se detectó que predominó una alta (>8 mm) y moderada (>2; ≤8 mm) actividad enzimática en las aguas de ambos niveles, independientemente de la complejidad de los sustratos (Fig. 4). Es de destacar los elevados porcentajes de cultivos del nivel de fondo con alta actividad caseinasa y lipasa (>8 mm) con respecto a los del nivel subsuperficial (Fig. 4).

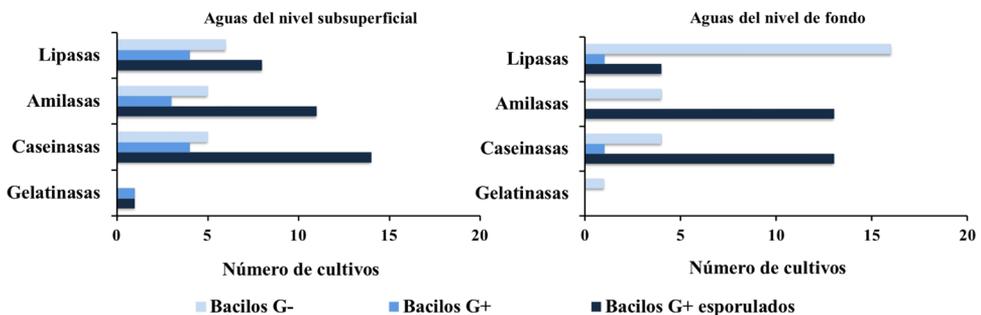


Fig. 3. Distribución de la actividad de enzimas hidrolíticas de acuerdo a los grupos fenotípicos de las bacterias heterótrofas aisladas del nivel subsuperficial y de las aguas profundas de sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba

Fig. 3. Activity distribution of hydrolytic enzymes according to phenotypic group of heterotrophic bacteria isolated from subsurface-level and deep-sea waters of Cuban mesophotic reef sites

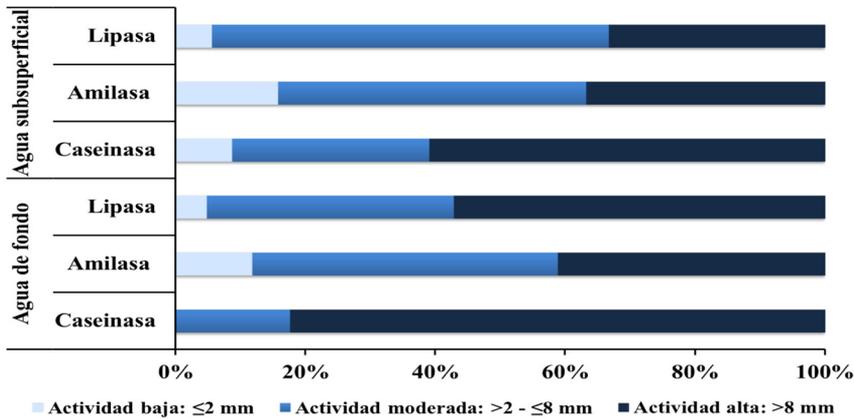


Fig. 4. Distribución del porcentaje de acuerdo a la clasificación semicuantitativa de la producción enzimática de los aislados de agua subsuperficial y aledañas a los arrecifes mesofóticos

Fig. 4. Percentage distribution according to the semi-quantitative classification of the enzymatic production in isolates obtained from subsurface-level and deep-sea waters of Cuban mesophotic reef sites

Del total de aislados un alto porcentaje produjeron sustancias con actividad superficial (53.2%, 33/62) (Fig. 5A). Los resultados demostraron una distribución similar en el porcentaje de cultivos productores tensioactivos procedentes tanto de las aguas del nivel de fondo (29.0%) como del nivel subsuperficial (24.2%); con valores ≤ 35.0 mN/m con respecto al control (50.3 mN/m) (Fig. 5A). Debe destacarse que el 27.3% (9/33) producen compuestos que disminuyen la tensión superficial a valores ≤ 30 mN/m. Asimismo, se encontró que el 60.6% de los cultivos (20/33) que produjeron compuestos tensioactivos presentan actividad lipolítica; mientras el 24.2%

(8/33) presentaron además, la capacidad para degradar los hidrocarburos del petróleo.

Por su parte, la evaluación cualitativa de la actividad asparaginasa demostró que el 68.0 % de los cultivos no presentó la actividad (Fig. 5B). Para ambos niveles de la columna de agua se encontraron porcentajes similares de cultivos capaces producir la enzima L-asparaginasa (16.0%) (Fig. 5B). Debe destacarse que los grupos fenotípicos con mayor incidencia corresponden a los bacilos G+ esporulados y los bacilos G- para un 35.0 % (7/20) y 45.0% (9/20), respectivamente.

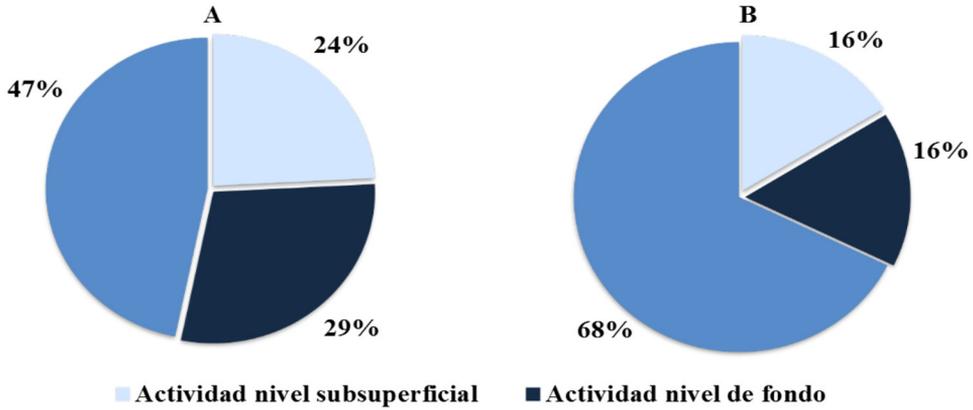


Fig. 5. Porcentaje de aislados con capacidades metabólicas de interés biotecnológico aislados de zonas de arrecifes mesofóticos de Cuba. A: Actividad tensioactiva ($TS \leq 35$ mN/m), B: Actividad L-asparaginasa

Fig. 5. Percentage of isolates exhibiting metabolic capacities of biotechnological interest obtained from Cuban mesophotic reef sites. A: Surfactant activity (surface tension ≤ 35 mN/m), B: L-Asparaginase activity

Para la caracterización taxonómica de los aislados se seleccionaron 20 del nivel subsuperficial y 20 de las aguas del nivel de fondo en los sitios de arrecifes mesofóticos, atendiendo a la elevada actividad metabólica, al presentar entre tres y siete de las bioactividades consideradas en este estudio.

Los cultivos seleccionados del grupo de los bacilos Gram- correspondieron al phylum Proteobacteria e identificados como *Ochrobactrum anthropi*, *Aeromonas hydrophila* y *Photobacterium damsela* de las familias Brucellaceae, Aeromonadaceae y Vibrionaceae, respectivamente (Fig. 6). Por su parte, todos los cultivos Gram+ esporulados seleccionados por su actividad metabólica correspondieron al

phylum Firmicutes, de la familia Bacillaceae y al género *Bacillus*, con 11 especies para las aguas subsuperficiales y ocho para las aguas del nivel de fondo de los sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba (Fig. 6).

En la distribución de las especies por niveles de la columna de agua, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus firmus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis* y *Ochrobactrum anthropi* fueron aisladas del nivel subsuperficial y no estuvieron presentes en las aguas del nivel de fondo; mientras las especies *Bacillus lentus* y *Bacillus cereus* solo se encontraron en las aguas profundas. El resto de las especies identificadas están presentes en ambos niveles (Fig. 6).

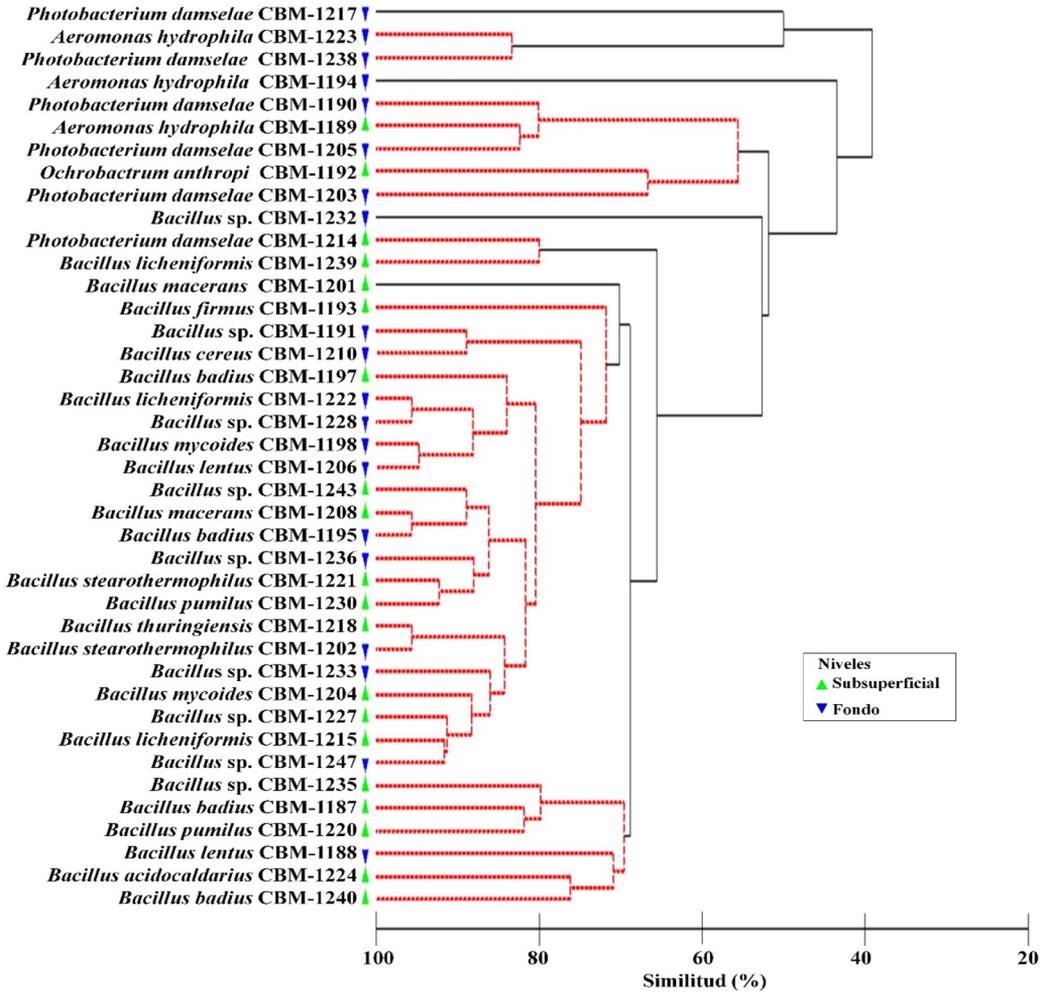


Fig. 6. Agrupamiento de las cepas de bacterias seleccionadas de ambos niveles de la columna de agua a partir de las características fisiológicas y potencialidades biotecnológicas (Índice de similitud de Brays-Curtis)

Fig. 6. Grouping of bacterial strains selected from both water column depth levels based on physiological characteristics and biotechnological potential (Brays-Curtis similarity index)

En el análisis de similitud de las cepas seleccionadas por sus capacidades metabólicas se demostró que la mayoría de los cultivos pertenecientes

al género *Bacillus* se agrupan con un porcentaje de similitud $\geq 70\%$, independientemente del nivel de la columna de agua de donde fueron aislados. A

su vez todos los cultivos pertenecientes al phylum Proteobacteria de tres géneros diferentes mostraron menores porcentajes de similitud (Fig. 6).

DISCUSIÓN

La caracterización macroscópica de los aislados de ambos niveles de la columna de agua en sitios de arrecifes mesofóticos de Cuba, demostró que existe una elevada variedad cultural de bacterias heterótrofas. En particular, las bacterias Gram- mostraron dominancia en las aguas de mayor profundidad; que pudieran incluirse en géneros de las clases Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Flavobacteria, entre otras; identificados frecuentemente en muestras de agua de niveles pelágicos (Kai *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018; Cui *et al.* 2019; Sanz-Sáez *et al.* 2020). Para las aguas profundas del presente estudio, que abarcan entre los 135-450 m, se ha descrito un predominio de bacterias heterótrofas cultivables pertenecientes al phylum Proteobacteria y que existe un gradiente de diversidad descendente hacia las profundidades, por debajo de la capa fótica (Kai *et al.* 2017; Sanz-Sáez *et al.* 2020).

Tanto en la capa fótica como en las de mayor profundidad se ha demostrado que las bacterias heterótrofas están adaptadas a diferentes temperaturas, luz y presión; lo que sugiere que tienen

metabolismos versátiles para responder a la disponibilidad de nutrientes. Estas características permiten una amplia distribución vertical y horizontal en los ecosistemas marinos (Jones & Lennon, 2010).

La asimilación de diferentes carbohidratos como fuentes de carbono demostró la versatilidad metabólica de las bacterias heterótrofas aisladas de ambos niveles de la columna de agua, relacionado con diversas rutas del metabolismo microbiano para la degradación preferencial de estos compuestos (Shon *et al.* 2006). En general, estas capacidades metabólicas deben estar sustentadas por la presencia de compuestos glucosídicos en los ecosistemas marinos, incluso provenientes del metabolismo microbiano (Sivaperumal *et al.* 2017; Casillo *et al.* 2018). Es reconocida la biosíntesis de exopolisacáridos con funciones que incluyen la adhesión y colonización de superficies, la protección de las células bacterianas, entre otras (Dang & Lovell, 2016; Casillo *et al.* 2018).

En el presente estudio se demostró la capacidad de degradación bacteriana de compuestos orgánicos tóxicos, como los hidrocarburos del petróleo y fenoles, que evidencian la participación de la comunidad bacteriana en esos procesos y su contribución a la autodepuración de los ecosistemas marinos. Especial interés representan los cultivos que fueron capaces de utilizar ambas sustancias como fuente

carbono y energía, relacionado con la capacidad de los microorganismos de aprovechar rutas metabólicas comunes para degradar compuestos orgánicos diferentes (Seeger & Pieper; 2010; Fuentes *et al.* 2014).

Las bacterias heterótrofas evaluadas también fueron capaces de producir diferentes enzimas hidrolíticas, independientemente de los niveles de la columna de agua, similar a lo informado para diferentes ecosistemas marinos (Liu *et al.* 2018; Gawas *et al.* 2019). Resulta interesante la marcada incidencia de cultivos de las aguas profundas con alta actividad enzimática, probablemente relacionada con la naturaleza de compuestos de alto peso molecular y polímeros como proteínas, almidón, ácidos nucleicos, lípidos complejos, entre otros (Arnosti, 2014; Dang & Lovell, 2016).

Las diferencias en la actividad enzimática entre las bacterias cultivables de cada nivel de la columna de agua evaluada, con una mayor actividad hidrolítica (>8 mm) para proteasas y lipasas en las aguas profundas con respecto al nivel subsuperficial, debe estar relacionado con la complejidad de los compuestos orgánicos presentes en el agua mar. Liu *et al.* (2018) informan diferencias sustanciales en las capacidades enzimáticas de las bacterias cultivables a diferentes profundidades, sugiriendo que los carbohidratos probablemente no constituyen un componente mayoritario de la

materia orgánica disuelta en las aguas profundas. Así por ejemplo de los aislamientos del nivel de fondo, los bacilos G⁻ predominan por su actividad lipolítica, característico de phylum Proteobacteria de aguas profundas (Liu *et al.* 2018; Delabary *et al.* 2020).

Entre los grupos fenotípicos más representados para ambos niveles de los sitios mesofóticos se destacan los bacilos G⁺ esporulados; donde se incluye el género *Bacillus*, reconocido como productores de diferentes exoenzimas (Odisi *et al.* 2012; Lailaja & Chandrasekaran, 2013; Gawas *et al.* 2019; Jin *et al.* 2019).

El elevado porcentaje de aislados bacterianos de las aguas de los sitios mesofóticos de Cuba, capaces de degradar carbohidratos de diferente complejidad y compuestos tóxicos; así como de producir enzimas hidrolíticas, evidencian el papel de las bacterias heterótrofas en la mineralización de la materia orgánica en la columna de agua. En particular, la producción de enzimas hidrolíticas es considerada una adaptación para el aprovechamiento de sustratos disponibles en la columna de agua como fuente de carbono, nutrientes y energía (Arnosti, 2014; Liu *et al.* 2018), que tiene implicaciones ecológicas relevantes en el reciclaje de materia orgánica y nutrientes, particularmente en el ciclo del carbono en el océano (Becker *et al.* 2017; Liu *et al.* 2018).

Las capacidades metabólicas de los microorganismos para desarrollar procesos de biorremediación también está relacionada con la excreción de enzimas que hidrolizan macromoléculas en monómeros fácilmente degradables (Sivaperumal *et al.* 2017). Los aislados bacterianos con capacidad de producir enzimas hidrolíticas y degradar hidrocarburos del petróleo y fenoles representan un potencial para el desarrollo de tecnologías eficientes para la biorremediación de compuestos xenobióticos con implicaciones para la salud humana, que incluyen efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos (Ifegwu & Anyakora, 2015; Chen *et al.* 2019).

La evaluación de la producción de tensioactivos microbianos estuvo dirigida a la búsqueda de sustancias que disminuyan la tensión superficial del caldo fermentado, que evidencian la síntesis exocelular de estos compuestos y su posible utilización en procesos de biorremediación. En particular, los cultivos que producen agentes con actividad superficial y enzimas específicas como las lipasas, puede ser de gran interés para favorecer tratamientos biológicos en la remoción y biodegradación de hidrocarburos (Karlapudi *et al.* 2018).

En los últimos años son notables los esfuerzos dirigidos a la bioprospección de compuestos bioactivos a partir de fuentes marinas (Glöckner *et al.* 2012; Blunt *et al.* 2018), teniendo en

cuenta sus potencialidades como nuevos metabolitos de interés biomédico. La actividad L-asparaginasa detectada en los cultivos de los sitios de arrecifes mesofóticos guarda relación con lo informado sobre las potencialidades de los microorganismos marinos como productores de esta enzima; las cuales se caracterizan por ser extracelulares, a diferencia de las obtenidas de otros orígenes (Izadpanah Qeshmi *et al.* 2018). Entre los géneros más representados de fuentes marinas se incluyen *Bacillus* y *Pseudomonas* (Rudrapati & Audipudi, 2015; Izadpanah Qeshmi *et al.* 2018)

La enzima L-asparaginasa es considerada un producto natural para el tratamiento oncogénico, debido a que las células tumorales dependen de una fuente exógena de L-asparagina, a diferencia de las células normales (Rudrapati & Audipudi, 2015). En particular, la síntesis microbiana de esta enzima como metabolito secundario ha demostrado actividad antineoplásica y con amplio espectro de actividad antitumoral (Jain *et al.* 2012).

La caracterización taxonómica de los cultivos de bacterias seleccionados por sus potencialidades demostró conectividad entre las aguas procedentes de las diferentes profundidades, teniendo en cuenta la ubicuidad de los grupos bacterianos identificados. Esta particularidad ha sido demostrada a partir del análisis filogenético de bacterias cultivables en la columna de

agua a diferentes profundidades oceánicas (Sanz-Sáez *et al.* 2020).

El predominio del género *Bacillus* entre los aislados de ambos niveles de la columna de agua, debe estar relacionado con la amplia distribución de este grupo en diferentes ecosistemas marinos, ya que este género se caracteriza por presentar esporas como estructura de resistencia y supervivencia ante cambios ambientales; así como una alta versatilidad metabólica para su adaptación a las condiciones extremas (Izadpanah Qeshmi *et al.* 2018; Gawas *et al.* 2019). También Lugioyo *et al.* (2010) refirieron un predominio de la familia Bacillaceae, específicamente al género *Bacillus*, en muestras de aguas oceánicas adyacentes a Cuba. Para ese estudio se demostró que las capacidades metabólicas de una misma especie de bacterias pueden variar de acuerdo al grado de riqueza de los ecosistemas.

La literatura especializada refiere que las especies de este género son productores de sustancias biológicamente activas, entre las que se encuentran antimicrobianos, tensioactivos, enzimas hidrolíticas y degradadoras de los hidrocarburos del petróleo (Sardesai & Bhosle, 2002; Odisi *et al.* 2012).

En general en este estudio se obtuvo un elevado porcentaje de cultivos con diversas capacidades metabólicas, que constituyen un recurso potencial de aplicación industrial. Así, por ejemplo, la obtención de metabolitos

microbianos resulta sencilla y sus rendimientos pueden ser incrementados optimizando las condiciones de cultivo o a través de la modificación del genoma microbiano (Glöckner *et al.* 2012; Liu *et al.* 2013).

A partir de los resultados de esta investigación se logró actualizar el conocimiento de la diversidad bacteriana marina; y en especial de las aguas aledañas a los arrecifes mesofóticos de Cuba, que no habían sido estudiados con anterioridad. En particular, los aislados bacterianos procedentes de aguas profundas resultaron de interés, teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrollan, como alta salinidad, baja disponibilidad de oxígeno, pH y presiones hidrostáticas extremas, entre otras; de manera que sus metabolitos pudieran presentar novedosas estructuras moleculares con interesantes propiedades de aplicación industrial y biotecnológica (Ramalath *et al.* 2018; Trincone, 2018; Jin *et al.* 2019).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible por el financiamiento del Instituto para la Exploración, Investigación y Tecnología Oceánica de la Universidad Atlántica de la Florida y el Instituto de Estudios Marinos y Atmosféricos de la Universidad de Miami. Además, la investigación fue cofinanciada por el Programa Nacional de Ciencia,

Tecnología e Innovación “Uso sostenible de los componentes de la diversidad biológica en Cuba”, a través del Proyecto *Arrecifes mesofóticos de Cuba*. También agradecemos el trabajo de los evaluadores y editores de la revista por su contribución a la calidad del presente manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnosti, C. (2014). Patterns of microbially driven carbon cycling in the ocean: links between extracellular enzymes and microbial communities. *Ad. Oceanogra.*, 2014, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/706082>
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. EE. UU.: CRC Press.
- Becker, S., Scheffel, A., Polz, M. F. & Hehemann, J. H. (2017). Accurate quantification of laminarin in marine organic matter with enzymes from marine microbes. *Appli. Environ. Microbiol.*, 83(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.03389-16>
- Benson, T. (2001). *Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. 8th Edition. EE. UU.: The McGraw-Hill.
- Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. & Prinsep, M. R. (2018). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 35(1), 8-53. <https://doi.org/10.1039/c7np00052a>
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M. & Corsaro, M. M. (2018). Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. *Mar. Drugs*, 16(2), 69. <https://doi.org/10.3390/md16020069>
- Chen, Y.-Y., Kao, T.-W., Wang, C.-C., Chen, Y.-J., Wu, C.-J., Lai, C.-H. & Chen, W.-L. (2019). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of disability among an elderly population. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04498-3>
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (2001). *Change in Marine Communities: An approach to statistical analysis and interpretation* (2nd ed.). United Kingdom: PRIMER-E Ltd.
- Cui, Y., Chun, S. J., Baek, S. H., Lee, M., Kim, Y., Lee, H. G., ... & Oh, H. M. (2019). The water depth-dependent co-occurrence patterns of marine bacteria in shallow and dynamic Southern Coast, Korea. *Sci. Rep.*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45512-5>
- Dang, H. & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 91-138. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-15>
- Delabary, G. S., Silva, M. C. D., Silva, C. S. D., Baratieri, L. Z., Melo, T. M. D., Stramosk, C. A., ... & Silva, M. A. C. D. (2020). Influence of temperature and culture media on growth and lipolytic activity of deep-sea *Halomonas sulfidaeris* LAMA 838 and *Marinobacter excellens* LAMA 842.0 *Ocean Coast. Res.*, 68(e20282) 1-11. <https://dx.doi.org/10.1590/S2675-28242020068282>
- Dias, A. C., Andreote, F. D., Dini-Andreote, F., Lacava, P. T., Sá, A. L., Melo, I. S., ... & Araújo, W. L. (2009). Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7), 1305-1311. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0013-7>

- Finnerty, W. R. (1994). Biosurfactants in environmental biotechnology. *Current Opinion Biotechnol.*, 5(3), 291-295. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90031-0)
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 98(11), 4781-4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>
- Gawas, V. S., Shivaramu, M. S., Damare, S. R., Pujitha, D., Meena, R. M. & Shenoy, B. D. (2019). Diversity and extracellular enzyme activities of heterotrophic bacteria from sediments of the Central Indian Ocean Basin. *Sci. Rep.*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45792-x>
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., ... & Somerfield, P. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.*, 6(2), 298-308. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.107>
- Glöckner, F. O., Stal, L. J., Sandaa, R.-A., Gassol, J. M., O'Gara, F., Hernandez, F., ... & Pitta, P. (2012). Marine Microbial Diversity and its role in Ecosystem Functioning and Environmental Change. In J. B. Calewaert & N. McDonough (Eds.), *Marine Board Position Paper 17* (pp. 5-77) Belgium: Marine Board-ESF. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5138.6400>
- Harrigan, W. F. & McCance, M. E. (1968). *Métodos de laboratorio en microbiología*. España: Academia.
- Ifegwu, O. C. & Anyakora, C. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons: part I. Exposure. In G. Makowki (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry* (pp. 277-304). EE.UU.: Academic Press. <https://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2015.08.001>
- Izadpanah Qeshmi, F., Homaei, A., Fernandes, P. & Javadpour, S. (2018). Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiol. Res.*, 208, 99-112. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.011>
- Jain, R., Zaidi, K. U., Verma, Y. & Saxena, P. (2012). L-asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia. *People's J. Sci. Res.*, 5(1), 29-35.
- Jin, M., Gai, Y., Guo, X., Hou, Y. & Zeng, R. (2019). Properties and applications of extremozymes from deep-sea extremophilic microorganisms: A mini review. *Mar. Drugs*, 17(12), 656. <https://doi.org/10.3390/md17120656>
- Jones, S. E. & Lennon, J. T. (2010). Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(13), 5881-5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107>
- Kai, W., Peisheng, Y., Rui, M., Wenwen, J. & Zongze, S. (2017). Diversity of culturable bacteria in deep-sea water from the South Atlantic Ocean. *Bioengineered*, 8(5), 572-584. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1284711>
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Pet.* 4(3), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Lailaja, V. P. & Chandrasekaran, M. (2013). Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(8), 1349-1360. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1298-0>
- Liu, L., Yang, H., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G. & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of

- microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4(4), 212-223. <https://doi.org/10.4161/bioe.24761>
- Liu, Q., Fang, J., Li, J., Zhang, L., Xie, B. B., Chen, X. L. & Zhang, Y. Z. (2018). Depth-resolved variations of cultivable bacteria and their extracellular enzymes in the water column of the New Britain Trench. *Front. Microbiol.*, 9, 135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00135>
- Loya, Y., Eyal, G., Treibitz, T., Lesser, M. P. & Appeldoorn, R. (2016). Theme section on mesophotic coral ecosystems: advances in knowledge and future perspectives. *Coral Reefs*, 35(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1410-7>
- Lugioyo, G. M., Coto, O., Álvarez, C. & Espinosa, G. (2010). Bacillus species in the oceanic waters adjacent to Cuba: Association between their distribution and metabolic activity. *Rev. Cien. Mar. Cost.*, 2(1), 61-72. <https://doi.org/10.15359/revmar.2.5>
- Lugioyo, G. M., González, D. & García, I. (2020). Evaluación de la calidad del agua de los arrecifes del golfo de Cazonas, sur de Cuba, a partir de algunos indicadores microbiológicos y químicos. *Rev. Cien. Mar. Cost.*, 12(1), 9-26. <https://dx.doi.org/10.15359/revmar.12-1.1>
- Miravet, M. E. (2003). *Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadoras ambientales*. (Tesis de doctorado no publicada). Universidad de La Habana, Cuba.
- Miravet, M. E., Lugioyo, M., Loza, S., Enríquez, D., Delgado, Y., Carmenate, M. & Pérez, D. (2009). *Procedimientos para el Monitoreo de la Calidad Ambiental en la Zona Marino Costera a partir de Microorganismos*. República Dominicana: Ediciones Centenario.
- Miravet, M. E., Martínez-Daranas, B. & Penie, I. (1994). *Indicadores microbiológicos del estado de salud de los arrecifes que bordean el archipiélago Sabana-Camagüey*. Cuba: Instituto de Oceanología.
- Odisi, E. J., Silvestrin, M. B., Takahashi, R. Y. U., da Silva, M. A. C. & Lima, A. O. D. S. (2012). Bioprospection of cellulolytic and lipolytic South Atlantic deep-sea bacteria. *Electron. J. Biotechnol.*, 15(5). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-17>
- Olson, J. B. & Kellogg, C. A. (2010). Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73(1), 17-30. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00862.x>
- Ong, K. S., Chin, H. S. & Teo, K. C. (2011). Screening of antibiotic sensitivity, antibacterial and enzymatic activities of microbes isolated from ex-tin mining lake. *African J. Microbiol. Res.*, 5(17), 2460-2466. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.170>
- Oppenheimer, C. H. & ZoBell, C. E. (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11(1), 10-18.
- Prabhu, R. H., Bhise, K. S. & Patravale, V. B. (2017). Marine enzymes in cancer: a new paradigm. In S. Kim & F. Toldrá (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research. Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part III - Application of Marine Enzymes* (pp. 1-14). EE. UU.: Academic Press.
- Ramlath, L., Keerthana, P. P., Safvana Fathima, P. & Mashoor, K. (2018). Bacteria from Coral Ecosystem of Kiltan

- Island, Lakshadweep: Resource for Hydrolytic Enzymes. *Int. J. Cell Sci. Biotechnol.*, 7, 1-9.
- Roman, J. (2018). The ecology and conservation of Cuba's coastal and marine ecosystems. *Bull. Mar. Sci.*, 94(2), 149-169. <https://doi.org/10.5343/bms.2017.1164>
- Rudrapati, P. & Audipudi, A. V. (2015). Characterization and bioprocessing of oncolytic enzyme-L-asparaginase isolated from marine bacillus AVP 14. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 30(2), 195-201.
- Sanz-Sáez, I., Salazar, G., Sánchez, P., Lara, E., Royo-Llonch, M., Sà, E. L., & Acinas, S. G. (2020). Diversity and distribution of marine heterotrophic bacteria from a large culture collection. *BMC Microbiol.*, 20(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01884-7>
- Sardesai, Y. N. & Bhosle, S. (2002). Organic solvent-tolerant bacteria in mangrove ecosystem. *Current Sci.*, 82(6), 622-623.
- Seeger, M. & Pieper, D. H. (2010). Genetics of biphenyl biodegradation and co-metabolism of PCBs. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1180-1198). Germany: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_82
- Shon, H. K., Vigneswaran, S. & Snyder, S. A. (2006). Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 36(4), 327-374. <https://doi.org/10.1080/10643380600580011>
- Sivaperumal, P., Kamala, K., & Rajaram, R. (2017). Bioremediation of industrial waste through enzyme producing marine microorganisms. In S. Kim & F. Toldrá (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research. Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part III - Application of Marine Enzymes* (pp. 165-179). EE. UU.: Academic Press.
- Sivasankar, P., Sugesh, S., Vijayan, P., Sivakumar, K., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. & Mayavu, P. (2013). Efficient production of L-asparaginase by marine *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal, India. *African J. Microbiol. Res.*, 7(31), 4015-4021.
- Trincon, A. (2018). Update on marine carbohydrate hydrolyzing enzymes: biotechnological applications. *Molecules*, 23(4), 901. <https://doi.org/10.3390/molecules23040901>
- Vela, G. R. & Ralston, J. R. (1978). The effect of temperature on phenol degradation in wastewater. *Canadian J. Microbiol.*, 24(11), 1366-1370. <https://doi.org/10.1139/m78-219>
- Ward, C. S., Yung, C. M., Davis, K. M., Blinebry, S. K., Williams, T. C., Johnson, Z. I. & Hunt, D. E. (2017). Annual community patterns are driven by seasonal switching between closely related marine bacteria. *ISME J.*, 11(6), 1412-1422. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.4>

Effect of metal concentration on growth and luminescence of luminous bacteria strains isolated from golfo de Nicoya, Costa Rica

Efecto de la concentración de metales en el crecimiento y la luminiscencia de cepas de bacterias luminiscentes aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica

Luis Vega-Corrales^{1*} & Carolina Marín-Vindas^{1,2}

ABSTRACT

Luminescence in bacteria is catalyzed by luciferase. When these microorganisms are exposed to toxic substances, the bioluminescent enzyme system can be inhibited. The objective of this study was to analyze the potential that these microorganisms offer as native bioindicators of coastal marine pollution. The dynamics of luminescence intensity by visual classification and the effect of metal concentration on the growth and luminescence of 25 strains of luminescent bacteria, isolated during 2016 from seawater samples from the gulf of Nicoya, Costa Rica, was evaluated by the disk diffusion method. The sensitivity of each strain to different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg mL⁻¹) of Cd, Cu, Cr, Pb and Zn was determined by its bioluminescent phenotype. In susceptible strains, a range of metal concentrations less than the growth inhibitory concentration affected the expression of luminescence. Strains with intense luminescence and defined zones of luminescence inhibition were considered to have greater potential as native bioindicators for monitoring environmental toxicity. More studies are required to determine the minimum concentrations that inhibit growth and luminescence with respect to the tested metals and other potentially toxic substances for the coastal marine ecosystems of Costa Rica.

Keywords: ecotoxicology, indicator species, luminous organism, marine biotechnology, luminous organism

RESUMEN

La luminiscencia en bacterias es catalizada por la luciferasa. Cuando estos microorganismos se exponen a sustancias tóxicas, el sistema enzimático bioluminiscente puede ser inhibido. El objetivo de este estudio fue analizar el potencial que tienen estos microorganismos, como

- 1 Laboratorio de Microbiología Marina (LaMMar), Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Puntarenas, Costa Rica. luis.vega.corrales@una.ac.cr* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3389-4373>
- 2 Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, CSIC, Barcelona, Catalunya, Spain. carolina.marin.vindas@una.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9013-2378>

bioindicadores nativos de contaminación marino costera. La dinámica de la intensidad de la luminiscencia por clasificación visual y el efecto de la concentración de metales en el crecimiento y la luminiscencia de 25 cepas de bacterias luminiscentes, aisladas durante el 2016, a partir de muestras de agua marina del golfo de Nicoya, Costa Rica, fue evaluada por el método de difusión en disco. La sensibilidad de cada cepa a diferentes concentraciones (0.1, 0.5 y 1 mg mL⁻¹) de Cd, Cu, Cr, Pb y Zn fue determinada por su fenotipo bioluminiscente. En las cepas sensibles, un rango de concentraciones del metal menor a la concentración inhibitoria del crecimiento afectó la expresión. Se consideró que las cepas con luminiscencia intensa y zonas de inhibición de luminiscencia esta, definidas, tienen un mayor potencial como bioindicadores nativos para la vigilancia de la toxicidad ambiental. Se requieren más estudios para determinar las concentraciones mínimas que inhiben el crecimiento y la luminiscencia con respecto a los metales analizados y demás sustancias, potencialmente tóxicas, para los ambientes marino costeros de Costa Rica.

Palabras claves: biotecnología marina, contaminación marina, ecotoxicología, especies indicadoras, organismos luminiscentes

INTRODUCTION

Most luminous bacteria, which are widely distributed in marine environments, are taxonomically classified as belonging to *Aliivibrio*, *Vibrio*, and *Photobacterium* genera from the Vibrionaceae family. Several of these bacteria emit high levels of light easily visible in laboratory cultures. Luminescence in these microorganisms is produced by the expression of lux genes, and the light emission reaction is catalyzed by luciferase (Dunlap & Urbanczyk, 2013).

Luciferase synthesis and luminescence in these bacteria is regulated by population density through a system called quorum sensing (Dunlap & Urbanczyk, 2013). Hence, there is a relationship between the emission of luminescence with cellular metabolism. The bioluminescent enzyme system can be inhibited by exposing bacteria to toxic

substances, and the intensity of light decreases quickly. Measuring the light intensity of bacteria exposed to different concentrations of a substance is used to evaluate its toxicity (Ma *et al.* 2014). Sensitive, repeatable, and easy to transport luminous bacteria-based assays have been developed to detect environmental contaminants (Camanzi *et al.* 2011; Bolelli *et al.* 2016).

Therefore, luminous bacteria have been used as bioindicators in assessments of environmental pollution (Burga *et al.* 2012; Ma *et al.* 2014), toxicity evaluation of pharmaceutical wastewater (Yu *et al.* 2014) and toxicological tests to assess pollution caused by metals, pesticides, and antibiotics in aquatic systems (Ranjan *et al.* 2012; Shanware *et al.* 2013). Moreover, Bagordo *et al.* (2012) have used them to assess anthropogenic impacts on estuarine ecosystems.

Luminous bacteria represent a powerful tool for the initial assessment of environmental samples or substances with unknown ecotoxicological or toxicological characteristics (Menz *et al.* 2013). In Costa Rica, there are no references of bioassays to assess the effect that toxic compounds might be causing in coastal marine ecosystems and, according to Diepens *et al.* (2014), promotion of ecotoxicological assessments in the country using native species is required. This study aimed to analyze the effect of metal concentration on growth and luminescence of luminous bacteria strains isolated from the golfo de Nicoya, Costa Rica, to generate base information about the application that these microorganisms have as native bioindicators of coastal marine pollution in the country.

MATERIALS AND METHODS

In 2016, twenty-five (25) luminous bacteria strains isolated from surface seawater samples collected at the golfo de Nicoya, Costa Rica, were used. These strains were isolated using Marine Agar (MA) (Difco®) and stored in Brain Heart Infusion (OXOID®) with 20% glycerol at -80°C until they were tested. These strains were numerically identified in a consecutive manner using the CL prefix.

Strains were characterized according to growth and luminescence intensity by visual classification following

the methodology proposed by Kumar *et al.* (2015), with some variations. Every 2 h during a 14 h period, a record was made of growth and luminescence intensity of each strain inoculated by streaking swabs on MA plates (Difco®) from a cell suspension equivalent to a 0.5 McFarland standard in distilled water with 2% NaCl prepared from an overnight MA plate. At the end of the incubation period and according to the final luminescence intensity, the strains were classified as intense, reduced, or dim, based on the luminescence intensity scale defined in Fig. 1.

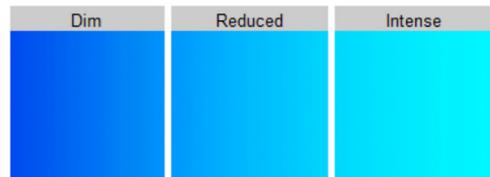


Fig. 1. Luminescence intensity scale defined for the classification of luminous bacteria strains isolated from the golfo de Nicoya, Costa Rica

Fig. 1. Escala de la intensidad de luminiscencia definida por la clasificación de las cepas de bacterias bioluminiscentes aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica

The effect of metal concentration on growth and luminescence of these strains was assessed using the disk diffusion method. Each luminous strain was inoculated by streaking swabs in MA plates plates from a cell suspension equivalent to a 0.5 McFarland standard in distilled water with 2% NaCl. Thereafter that, 6 mm

diameter Whatman #3 filter paper sterile disks were separately impregnated each with 10 μL of 0.1, 0.5, and 1 mg mL^{-1} metal ion solutions; namely, cadmium (Cd), copper (Cu), chromium (Cr), lead (Pb), and zinc (Zn), then they were aseptically dried at room temperature and placed on the agar surface. Disks impregnated with 10 μL of sterile distilled water were used as negative controls. Tests were performed duplicate. Plates were incubated in the dark at 30°C for 24 h.

After the incubation period, records were made concerning the diameter in mm of the growth inhibition zones (in the light) and the diameter in mm of the luminescence inhibition zones (in the dark). Every 2 h during 14 h of incubation, a photographic record was also made of the assay with Cd for CL4 and CL22 strains to illustrate the results. Photographs were taken in the dark with a 30 s exposure and under the same conditions (ISO500, F8) for comparison.

Mean difference and 95% confidence intervals were calculated between the diameters for inhibition zones of growth or luminescence by metals and metal ion concentration. Samples mean pair-wise comparisons were evaluated using a t-test ($P < 0.05$). In a case where the statistical assumption (t-test) was not meet the non-parametric Wilcoxon test was applied ($P < 0.05$). Results

were analyzed and plotted using R (R Core Team, 2018).

RESULTS

The luminescence intensity scale is shown in Fig. 1. All strains grew 4 h after the incubation time started, and showed luminescence from 6 to 8 h after the start of the incubation (Fig. 2). The luminous strains assessed did not show growth and luminescence inhibition zones for the tested Cr concentrations. CL6, CL11, CL12, and CL19 strains showed dim luminescence (Fig. 2), and no inhibition zones (growth or luminescent) were observed (Fig. 5).

CL1, CL4, CL5, CL21, CL23, CL24, and CL25 strains showed reduced luminescence intensities (Fig. 2) and undefined luminescence inhibition zones. Only a degradation in luminescence (Fig. 3) was observed mainly around disks impregnated with Cd and with 1 mg mL^{-1} of Cu, Pb, and Zn (Fig. 4). CL2 showed intense luminescence (Fig. 1.), and undefined luminescence inhibition zones for Cd, Pb, and Zn (Fig. 4.). Growth inhibition zones were registered for CL1, CL2, CL4, CL5, CL21, and CL25 strains only in the 1 mg mL^{-1} concentration of Cd; the mean of the diameter of the inhibition zones was 8, 10, 10, 11.5, 10, and 10.5 mm, respectively.

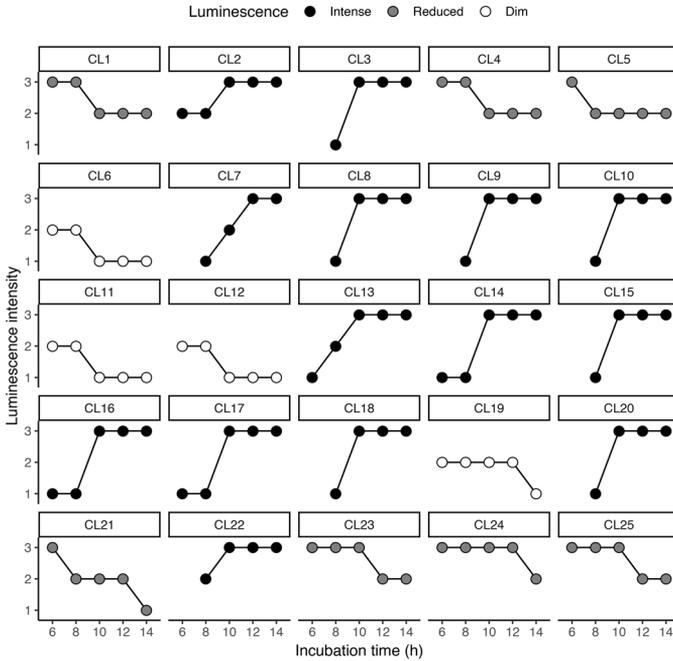


Fig. 2. Dynamic of luminescence intensity by incubation time (h) of luminous bacteria strains isolated from the golfo de Nicoya, Costa Rica. Strains are classified, according to the final luminescence intensity, as intense, reduced, or dim

Fig. 2. Dinámica en la intensidad de luminiscencia por tiempo de incubación (h) de las cepas de bacterias bioluminiscentes aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica. Las cepas se clasificaron de acuerdo con la intensidad de luminiscencia final como intensa, reducida o tenue

After the incubation period, CL3, CL7, CL8, CL9, CL10, CL13, CL14, CL15, CL16, CL17, CL18, CL20, and CL22 strains showed intense luminescence (Fig. 2) and defined luminescence inhibition zones (Fig. 3).

The diameters of the inhibition zones (growth and luminescence) were very similar, and the averages were used (Fig. 5). Most of the strains showed growth inhibition zones for 0.5 and 1 mg mL⁻¹ concentrations of

Cd, 1 mg mL⁻¹ of Zn, and minimum diameters of 7 mm for 1 mg mL⁻¹ concentration of Cu and Pb (Fig. 5).

Those as mentioned above showed luminescence inhibition zones concerning Pb at all assayed concentrations. These strains showed defined luminescence inhibition zones for 0.5 and 1 mg mL⁻¹ Cd and Zn, respectively. Only CL15 and CL17 strains showed the same condition for 0.1 mg mL⁻¹ Cd. CL9, CL10, and CL17 strains also

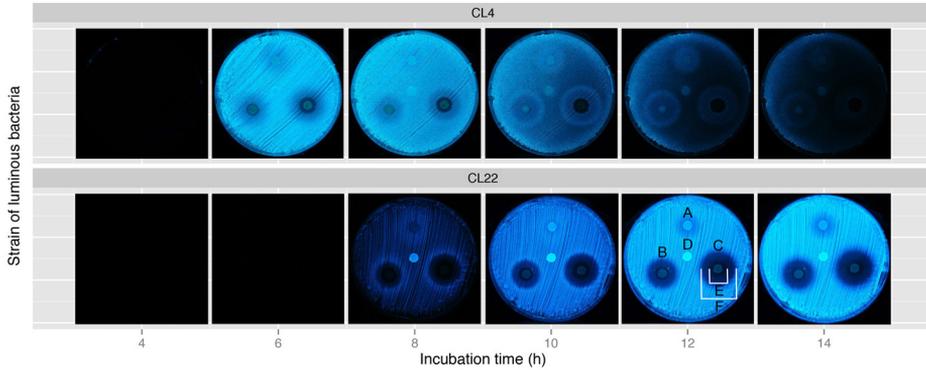


Fig. 3. Photographical record of the effect of 0.1 (A), 0.5 (B), and 1 (C) mg mL⁻¹ cadmium on the variation of luminescence intensity for CL4 and CL22 luminous strains at different incubation times. D = control. Strain CL4 exhibits a degradation of luminescence around disks impregnated with Cd; strain CL22 shows defined growth inhibition zones (E) and luminescence inhibition zones (F) for 0.5 and 1 mg mL⁻¹ Cd. Fig. 3. Registro fotográfico del efecto de 0.1 (A), 0.5 (B) y 1 (C) mg mL⁻¹ de cadmio en la variación de la intensidad de la luminiscencia para las cepas luminiscentes CL4 y CL22 a diferentes tiempos de incubación. D = control. La cepa CL4 muestra degradación de la luminiscencia alrededor de los discos impregnados con Cd, y la cepa CL22 muestra zonas de inhibición del crecimiento (E) y zonas de inhibición de la luminiscencia (F) definidas para concentraciones de Cd de 0.5 y 1 mg mL⁻¹.

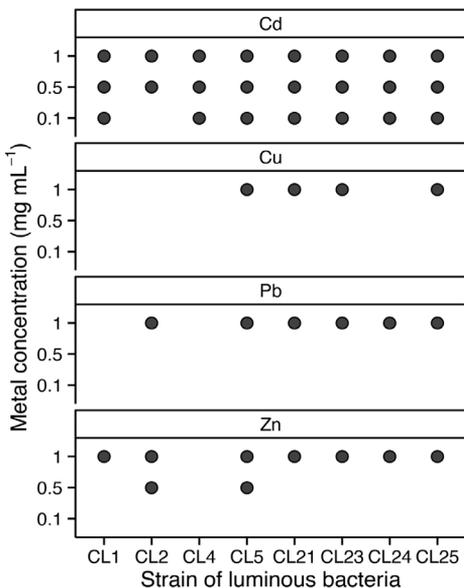


Fig. 4. Luminescence reduction (●) by different concentrations (mg mL⁻¹) of cadmium, copper, lead, and zinc ions on bacterial strains with reduced luminescence intensity isolated from the gulf of Nicoya, Costa Rica. Data for chromium ions not shown due to the absence of growth and luminescence inhibition zones. Fig. 4. Reducción de luminiscencia (●) por concentración (mg mL⁻¹) de cadmio, cobre, plomo y zinc de cepas bacterianas con intensidad de luminiscencia reducida aislada del golfo de Nicoya, Costa Rica. No se muestran los ensayos con cromo debido a que no se observaron halos de inhibición de luminiscencia ni de crecimiento.

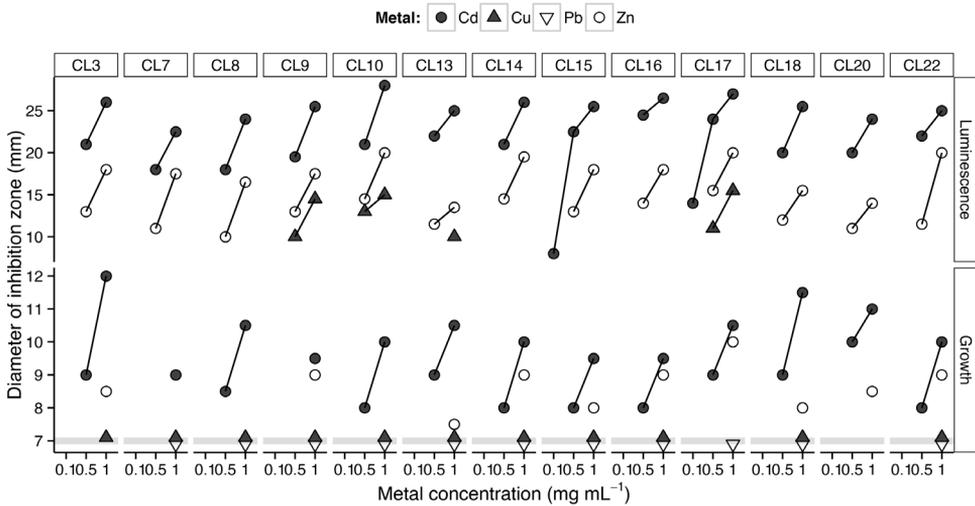


Fig. 5. Diameter (average of duplicates) of the growth and luminescence inhibition zone (mm) for different concentration (mg mL^{-1}) of cadmium, copper, lead, and zinc ions of bacterial strains with intense luminescence isolated from the golfo de Nicoya, Costa Rica. The diameters of the growth inhibition zones (mm) for Cu and Pb are the same. Strains with dim luminescent (CL6, CL11, CL12, and CL19) did not exhibit growth or luminescent inhibition zones

Fig. 5. Diámetro (promedio de las réplicas) de las zonas de inhibición de crecimiento y de luminiscencia (mm) por concentración (mg mL^{-1}) de cadmio, cobre, plomo y zinc de cepas bacterianas con luminiscencia intensa aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica. El diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento (mm) para Cu y Pb es el mismo. Las cepas con luminiscencia tenue (CL6, CL11, CL12 and CL19) no mostraron zonas de inhibición de crecimiento o luminiscencia

showed luminescence inhibition zones for 0.5 and 1 mg mL^{-1} Cu, while CL13 strain only for 1 mg mL^{-1} Cu (Fig. 5).

Strains affected by two or more concentrations of the same metal showed a directly proportional relationship between the diameter of the growth and luminescence inhibition zones and the corresponding metal concentration. CL9, CL10, CL13, and CL17 strains showed that diameters of

the luminescence inhibition zones vary in the order of $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu}$ (Fig. 5).

The mean difference between inhibition zones of growth or luminescence by metal and metal concentration is shown in Table 1. According to the statistical tests, growth inhibition zones by Cd and luminescence inhibition zones by Zn and Cd were significantly higher at 1 mg mL^{-1} than 0.5 mg mL^{-1} for each metal. Luminescence

Table 1. Pair-wise comparison between the diameter of the growth inhibition zone or luminescence inhibition zone caused by different metals at different concentration (mg mL^{-1}) levels upon luminous bacteria strains isolated from golfo de Nicoya, Costa Rica

Cuadro 1. Comparación por pares entre el diámetro de las zonas de inhibición del crecimiento o zonas de inhibición de luminiscencia causada por distintos metales a diferentes concentraciones (mg mL^{-1}) sobre las cepas de bacterias luminiscentes aisladas del golfo de Nicoya, Costa Rica

Comparison			Mean difference	Significance
Inhibition	Metal	mg mL^{-1}	mm (\pm 95% CI)	($P < 0.05$)**
Growth:Growth	Cd:Cd	1:0.5	1.86 (1.49, 2.23)	1
	Cd:Zn	1:1	1.75 (0.85, 2.65)	0
Luminescence:Luminescence	Cd:Cd	1:0.5	4.38 (3.47, 5.30)	1
	Zn:Zn	1:0.5	4.88 (3.87, 5.90)	1
	Cd:Zn	1:1	7.88 (6.75, 9.02)	1
	Cd:Zn	0.5:0.5	8.38 (7.46, 9.31)	1
Luminescence:Growth	Cd:Cd	1:1	15.15 (14.22, 16.09)	1
	Cd:Cd	0.5:0.5	12.86 (11.43, 14.30)	1
	Zn:Zn	1:1	8.75 (7.41, 10.09)	1

Notes: *CI = confidence interval; **1 and 0 denote significant and *insignificant*, respectively, at the 0.05 *significance* level.

inhibition zones for 1 and 0.5 mg mL^{-1} Cd and 1 mg mL^{-1} Zn were statistically significantly higher than the corresponding growth inhibition zones. These strains showed higher luminescent inhibition zones ($P < 0.05$) by Cd than Zn at 0.5 and 1 mg mL^{-1} . The difference for mean pair-wise comparison for growth inhibition zones by Cd and Zn at 1 mg mL^{-1} did not show a statistical significance.

DISCUSSION

This study's culture medium promoted the growth and luminescence of the tested strains; therefore, it was appropriate for the assays. Most research on luminous bacteria use the SWC (Seawater Complete) culture medium (Bagordo *et al.* 2012; Martini *et al.* 2013; Jabalameli *et al.* 2015) or culture media with a similar composition (Efremenko *et al.* 2014; Drozdov *et al.* 2015; Urbanczyk *et al.* 2015). In this study, strains grew over (4 h) in

the Marine Agar (MA) and luminescence occurred 2 or 4 h later.

The assessment luminescence intensity dynamics of the assayed strains confirms that bacterial luminescence is an indicator of the activity of intracellular metabolic processes. The maximum luminescence intensity in a bacterial culture occurs during the exponential growth phase. Then luminescence dynamics is affected because of the reduction in metabolic processes kinetics (Drozdov *et al.* 2015). Efremenko *et al.* (2014) report that the luminescence intensity in free cells of *Photobacterium phosphoreum* decreases with time.

Differences between assessed strains in terms of luminescence duration and intensity coincide with the findings reported by Efremenko *et al.* (2014). The authors indicate that duration and intensity significantly differ between species and strains of the *Photobacterium* genus. In this way, the amount of light produced by luminous bacteria, even belonging to the same genus, makes these microorganisms show different bioluminescent phenotypes even though bioluminescence is regulated by a similar basic genetic system (Jabalamei *et al.* 2015).

Although the classification of the bioluminescence intensity used in this study is not a quantitative method, it is adequate for the determination of bacterial luminescence dynamics (mainly in solid culture media)

without requiring specialized equipment. It could also be considered a useful technique for the screening of isolated strains and to define the optimal incubation period of each strain in view of evaluating the effects of toxic substances in solid-phase bioluminescence assays.

The luminescence inhibition rate of some bacterial strains has been used in toxicological and ecotoxicological assessments (Menz *et al.* 2013; Ma *et al.* 2014). Our results show that some metals at different concentration levels affect the growth and luminescence of luminous bacterial strains to different degrees. Also, we observed that the luminescence of some bacteria was inhibited by a metal ion concentration lower than the minimum growth inhibitory concentration.

The sensitivity of each strain to different concentrations of metal ions is determined by its bioluminescent phenotype and for practical bioassay applications the higher intensity luminescent strains with luminescence inhibition zones afford greater potential as pollution indicators. For example, strain CL17 that is potentially sensitive to cadmium at concentrations lower than 0.1 mg mL⁻¹.

The intensity of the luminescence (in free and immobilized cells) decreases with increasing metal concentration. Kumar *et al.* (2015) reported the effect of copper and zinc at 1 mg mL⁻¹ on luminescence sensitivity of 20

strains isolated from the Bay of Bengal While Efremenko *et al.* (2014) showed that luminescence intensity in cells of *P. phosphoreum*, immobilized in a polyvinyl alcohol cryogel, decreases with increasing metal ion concentration, and further concluded that metal toxicity for these immobilized cells varies in the order $\text{Cu}^{+2} > \text{Co}^{+2} > \text{Hg}^{+2} > \text{Zn}^{+2}$. Our study reveals the order $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Cu}$, as well as the absence of luminescence inhibition by Cr^{+3} and Pb^{+2} at all the tested concentrations.

Many application tests employing luminous bacteria are known, and their distinctive features depend on the specific characteristics of the bacterial strain used. The isolation of native luminous bacteria allows bioprospecting for strains useful for monitoring environmental toxicity. Moreover, the isolation of strains of microorganisms resistant to metals is significant. The expectation is that microorganisms designated for bioremediation are tolerant of metals (Kumar *et al.* 2015).

CONCLUSION

Differences in luminescence intensity dynamics between strains, the definition of luminescence inhibition zones, and the determination of growth inhibition zone diameters and luminescence inhibition zone diameters for different metals ions at different concentration levels were determined.

For sensible strains, a range of concentrations of the metal ion lower than the growth inhibition concentration affected the expression of luminescence. Strains showing intense luminescence and defined luminescence inhibition zones were assigned greater application potential as bioindicators for environmental toxicity monitoring. However, more studies are required to determine the minimum growth and luminescence inhibition concentrations for the assayed metals ions and other substances potentially toxic to coastal marine ecosystems in Costa Rica.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Ley de Pesca y Acuicultura (Fishery and Aquaculture Act) from the Government of Costa Rica as part of the project entitled “Distribución y abundancia de bacterias luminiscentes y su potencial como indicadoras de contaminación en el Golfo de Nicoya, Costa Rica” (Distribution and abundance of luminous bacteria and their potential as pollution indicators in the Golfo de Nicoya, Costa Rica), UNA-SIA-0338-13. Special thanks to Oscar Pacheco Prieto for taking the photographs and two anonymous reviewers for improving the manuscript.

REFERENCES

- Bagordo, F., Serio, F., Lugoli, F., Idolo, A., Gabutti, G. & De Donno, A. (2012). Phenotypic characterization of culturable marine luminous bacteria isolated from coastal waters of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy). *Cienc. Mar.*, 38(4), 599-608. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i4.2119>
- Bolelli, L., Ferri, E. N. & Girotti, S. (2016). The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial. *Analytica Chimica Acta.*, 934, 22-35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.038>
- Burga, K. F., Charlatchka, R., Sahli, L. & Férard, J. (2012). New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. *Chemosphere.*, 86, 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.042>
- Camanzi, L., Bolelli, M., Girotti, S. & Matteuzzi, D. (2011). Optimal conditions for stability of photoemission and freeze drying of two luminescent bacteria use in a biosensor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 30(4), 801-805. <https://doi.org/10.1002/etc.452>
- Diepens, N. J., Pfenning, S., Van den Brink, P. J., Gunnarsson, J. S., Ruepert, C. & Castillo, L. E. (2014). Effect of pesticides used in banana and pineapple plantations on aquatic ecosystems in Costa Rica. *J. Environ. Biol.*, 35(1), 73-84.
- Drozdov, A. V., Gromozova, E. N. & Gretskey, I. A. (2015). An analysis of the bioluminescence intensity dynamics of the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum*. *PLoS One*, 10(2), 251-255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150200>
- Dunlap, P. V. & Urbanczyk, H. (2013). Luminous Bacteria. In E., Rosenberg E.F., DeLong S., Lory E. Stackebrandt & F. Thompson (Eds), *The Prokaryotes*. (4th, pp. 495-528). Springer, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_75
- Efremenko, E. N., Senko, O. V., Aleskerova, L. E., Alenina, K. A., Mazhul, M. M. & Ismailov, A. D. (2014). Biosensors based in luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants. *Applied Biochem. Microbiol.*, 50(5), 477-482. <https://doi.org/10.1134/S0003683814050032>
- Jabalameli, L., Razavi, M. R., Hosseinkhani, S. & Akhavan Sepahi, A. (2015). Isolation, identification and characterization of new luminous bacteria from Chah Bahar Port, southern marine habitat of Iran. *Iranian J. Fish. Sci.*, 14(3), 555-566.
- Kumar, A. R., Jayaprakashvel, M., FeuK-Lagerstedt, E. & Hussain, A. J. (2015). Factors affecting bioluminescence in free living *Photobacterium* spp. Isolated from Bay of Bengal, India. *J. Mar. Biosci.*, 1(1), 33-49.
- Ma, X. Y., Wang, X. C., Hao, H., Guo, W., Wu, M. N. & Wang, N. (2014). Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications. *Sci. Total Environ.*, 468-469, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028>
- Martini, S., Al Ali, B., Garel, M., Nerini, D., Grossi, V., Pacton, M., & Tamburini, C. (2013). Effects of hydrostatic pressure on growth and luminescence of a moderately-piezophilic luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200. *PLoS One*, 8(6), e66580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066580>
- Menz, J., Schneider, M. & Kümmerer, K. (2013). Toxicity testing with luminescent bacteria- Characterization of an automated method for the

- combined assessment of acute and chronic effects. *Chemosphere.*, 93(6), 990-996. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.067>
- R Core Team. (2018). R: a language and environment for statistical computing. Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ranjan, R., Rastogi, N. K. & Thakur, M. S. (2012). Development of immobilized biophotonic beads consisting of *Photobacterium leiognathi* for the detection of heavy metals and pesticide. *J. Hazardous Mat.*, 225-226, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.076>
- Shanware, A., Thakre, N. & Pande, S. (2013). Isolation and characterization of novel marine luminescent bacteria from Diu beach, India. *J. Pharm. Res.*, 7(6), 529-533. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.019>
- Urbanczyk, Y., Ogura, Y., Hayashi, T. & Urbanczyk, H. (2015). Description of a novel marine bacterium, *Vibrio hyugaensis* sp. nov., based on genomic and phenotypic characterization. System. *Applied Microbiol.*, 38, 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.04.001>
- Yu, X., Zuo, J., Tang, X., Li, R., Li, Z. & Zhang, F. (2014). Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmus obliquus* and the bacterium *Vibrio fischeri*. *J. Hazardous Mat.*, 266, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.012>

Identificación de cuatro especies de Clupeiformes (Actinopterygii) mediante análisis de secuencias de ADN mitocondrial en zonas de explotación pesquera del Golfo de Nicoya, Costa Rica

Identification of four species of Clupeiformes (Actinopterygii) through analysis of mitochondrial DNA sequences in fishing exploitation areas of the Gulf of Nicoya, Costa Rica

Carolina Sancho-Blanco¹, Luis Hernández-Noguera², Luis Vega-Alpizar², Rosa Soto-Rojas² y Rodolfo Umaña-Castro^{1*}

RESUMEN

Las sardinas junto con las anchovetas constituyen unos de los grupos de mayor importancia en la pesquería del golfo de Nicoya. Son alimento para peces de mayor tamaño y aves marinas, por tanto, no solo sufren explotación pesquera, sino también presentan altas tasas de mortalidad natural. Debido a la importancia comercial y ecológica que representan estas especies, es necesario contar con una correcta identificación taxonómica, principalmente para la elaboración de estudios pesqueros. Antes, la determinación de especies de peces se fundamentaba únicamente en características morfológicas externas, sin embargo, no siempre es posible, debido a su similitud morfológica, por lo que el uso combinado de datos morfológicos junto con los genéticos basados en genes mitocondriales puede contribuir en su reconocimiento. Históricamente, estudios taxonómicos han agrupado a las especies *O. libertate*, *O. medirastre* y *O. bulleri* como integrantes del complejo *Opisthonema spp.*, dada la gran similitud de forma. Mientras, para la familia *Engraulidae*, las indagaciones taxonómicas son escasas. En el presente trabajo, se identificaron molecularmente especies del complejo *Opisthonema spp.* y una especie del género *Cetengraulis sp.*, colectadas entre junio y diciembre del 2017, mediante secuenciación de genes mitocondriales: COI, Ctyb y 16S ARNr. Los hallazgos confirman, con datos moleculares, la identidad y presencia de tres especies del complejo *Opisthonema spp.* y una especie de anchoveta,

1 Universidad Nacional. Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Genómico (LAGEN).

carolina.sancho.blanco@una.ac.cr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0378-001X>
rodolfo.umana.castro@una.ac.cr*, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0041-2788>

2 Universidad Nacional. Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Análisis Biológicos-Pesqueros.

luis.hernandez.noguera@una.ac.cr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3698-7161>
luisvega3@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1993-0705>
rosa.soto.rojas@una.ac.cr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1928-2023>

localizadas en zonas de explotación pesquera en el golfo de Nicoya, Costa Rica, información que facilita el uso y manejo de estos recursos pesqueros en un área marina de importancia comercial en el país.

Palabras clave: *Opisthonema spp.*, *Cetengraulis sp.*, ADNmt, ADNr, posicionamiento taxonómico

ABSTRACT

Sardines, together with anchovies, constitute one of the most important groups in the fishery of the Gulf of Nicoya. They are consumed by large fish and seabirds; therefore, they not only suffer from fishing exploitation but also have high rates of natural mortality. Due to their commercial and ecological importance, it is necessary to have a reliable taxonomic identification of these species, mainly for the preparation of fisheries studies. Previously, the identification of fish species was based only on external morphological characteristics; however, this is not always possible due to their morphological similarity, but the combined use of morphological and genetic data based on mitochondrial genes can contribute to their accurate recognition. Historically, taxonomic studies have grouped the species *O. libertate*, *O. medirastre* and *O. bulleri* as members of the *Opisthonema spp.* complex due to their great morphological similarity, while, there are few taxonomic studies of the family *Engraulidae*. In the present work, species of the *Opisthonema spp.* complex and a species of the genus *Cetengraulis sp.*, collected between June-December 2017, were molecularly identified by sequencing mitochondrial genes: COI, Cytb, and 16S rRNA. The findings of the molecular data analysis confirm the identity and presence of three species of the *Opisthonema spp.* complex and a species of anchovy, in areas of fishing exploitation in the gulf of Nicoya, Costa Rica, information that facilitates the use and management of these fishing resources in a marine area of commercial importance for the country.

Keywords: *Opisthonema spp.*, *Cetengraulis sp.*, mtDNA, rDNA, taxonomic placement

INTRODUCCIÓN

El orden Clupeiformes incluye especies conocidas como arenques, sardinas y anchovetas, todas de gran importancia comercial para las pesquerías globales. Asimismo, abarca familias como Chirocentridae, Clupeidae, Denticipitidae, Dussumieriidae, Engraulidae, Pristigasteridae y Sundasalangidae; sin embargo, la taxonomía de especies de las familias Clupeidae y Engraulidae aún sigue siendo controversial en

términos morfológicos y genéticos (Li & Ortí, 2007; Bloom & Lovejoy, 2014; Vicente *et al.* 2020).

Tanto los Clupeidos como los Engraulidos son individuos de tallas pequeñas generalmente, se agrupan en grandes cardúmenes, son filtradores y conforman la base de la cadena alimenticia de los ecosistemas (Fischer *et al.* 1995); por tanto, no solo sufren de la explotación pesquera, sino que también presentan altas tasas de mortalidad natural, al ser el alimento para

otros organismos como peces de mayor tamaño y aves marinas (Bussing & López, 1994).

En las costas del Pacífico, el género *Opisthonema* Gill, 1861 está representado por cuatro especies: *Opisthonema libertate* Günther, 1867, *Opisthonema mediraastre* Berry & Barrett, 1963, *Opisthonema bulleri* Regan, 1904 y *Opisthonema berlangai* Berry & Barrett, 1963 (Froese & Pauly, 2019). En Costa Rica, debido a su difícil diferenciación morfológica, históricamente las especies *O. libertate*, *mediraastre* y *bulleri* se han agrupado como integrantes del complejo *Opisthonema spp.* y han sido utilizadas para la industria de enlatados con un mismo valor comercial (Soto & Rodríguez, 1999; Vega-Corrales, 2010). Por su parte, la familia Engraulidae se encuentra representada, principalmente, por *Cetengraulis mysticetus*, el cual es un recurso pesquero de importancia, al emplearse como carnada viva por la flota pesquera artesanal en la zona interna del golfo de Nicoya, Costa Rica (Rodríguez & Gómez, 1998; Soto & Rodríguez, 1999; Murase *et al.* 2014).

Estudios enfocados en la identificación y taxonomía del género *Opisthonema* señalan si las diferencias encontradas en el nivel morfológico son el resultado de variaciones intraespecíficas o de características diagnósticas (Pérez-Quiñónez *et al.* 2017). Por otro lado, para la familia Engraulidae, los hallazgos en cuanto a taxonomía

molecular son escasos, a pesar de su importancia pesquera y del impacto ecológico potencial que las pesquerías pueden tener en el ecosistema pelágico (Wang *et al.* 2018). A partir del desarrollo de técnicas moleculares, se inició la incorporación de datos genéticos, basados en el ADN mitocondrial y nuclear, que permitieran esclarecer interrogantes taxonómicas no resueltas mediante características morfológicas y merísticas (Ward *et al.* 2005; Teletchea, 2009; Ardura *et al.* 2010; Carvalho *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2013; Pérez-Quiñónez, 2014; Durand *et al.* 2017; Pérez-Quiñónez *et al.* 2017; Goodbody-Gringley *et al.* 2019; Pérez-Quiñónez *et al.* 2019).

En peces, los marcadores genéticos más utilizados para la identificación de especies se basan en regiones del ADN mitocondrial (Jahan *et al.* 2017), los cuales, al mostrar alta tasa de mutación y gran variabilidad interespecífica, hacen posible una adecuada distinción entre especies (Rocha *et al.* 2005; Paine *et al.* 2007). Entre dichos marcadores mitocondriales, se encuentran el gen del 16S del ARN ribosómico (16S ARNr), el gen del citocromo oxidasa I (COI), el gen citocromo oxidasa b (Cytb), entre otros. El 16S ARNr es altamente conservado; variaciones de unos pocos nucleótidos en su estructura permiten inferir relaciones taxonómicas en diferentes niveles, inclusive entre taxa estrechamente relacionados (Chakraborty &

Iwatsuki, 2006). Por su parte, el gen COI, a pesar de ser muy conservado, posee regiones polimórficas que facilitan la identificación de especies (Hebert *et al.* 2003). Mientras, la secuencia de nucleótidos del gen Cytb contiene información específica de la especie; posibilita reconstruir tanto relaciones inter- o intraespecíficas como de nivel superior, por lo cual se considera un gen con alto rendimiento en filogenia molecular (Peng *et al.* 2004).

La identificación taxonómica de estas especies en las capturas, a través de los diferentes artes de pesca en el golfo de Nicoya, permite evaluar el estado actual de sus poblaciones; fijar la cuota de pesca, el establecimiento correcto de las vedas; recomendar medidas de ordenamiento y pautas de captura, así como para garantizar los niveles de biomasa del *stock* desovante (Kochzius *et al.* 2010; Pérez-Quiñónez *et al.* 2018). De esta forma, se mantiene, además, la sostenibilidad de otras especies de interés pesquero-corvinas, pargos, jureles- y ecológico-las aves- (FAO, 2018).

En el presente estudio, se identificó, molecularmente, a partir de secuencias del ADN mitocondrial (ADNmt) junto con caracteres morfológicos, algunas especies que integran las familias Engraulidae y Clupeidae. Con ello, se proporcionan elementos suficientes que instan a diferenciar entidades taxonómicas en una zona de explotación

pesquera en el golfo de Nicoya, Costa Rica. La información obtenida facilitará el uso y manejo de estos recursos pesqueros en una zona marina de importancia comercial en el país, al detectar posibles sesgos en la identificación tradicional basada en caracteres morfológicos diagnósticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se recolectaron especímenes del complejo *Opisthonema spp.* y *Cetengraulis sp.* distribuidos específicamente en el golfo de Nicoya, Pacífico Central, Costa Rica, de junio a setiembre de 2017. Se identificaron, en la zona externa del golfo, individuos de *Opisthonema bulleri* (sardina azul), *O. medirastre* y *O. libertate* (sardina gallera), en un rango de longitudes estándar de 137 mm a 184 mm. Por otra parte, en la zona interna del golfo, se detectaron individuos de *C. mysticetus* (anchoveta) (Fig. 1). La identificación preliminar se realizó a partir de caracteres morfológicos diagnósticos, utilizando la metodología previamente descrita por Berry & Barret, 1963; Bussing & López, 1994, Robertson & Allen, 2002; Pérez Quiñones, 2014. (Cuadro 1).

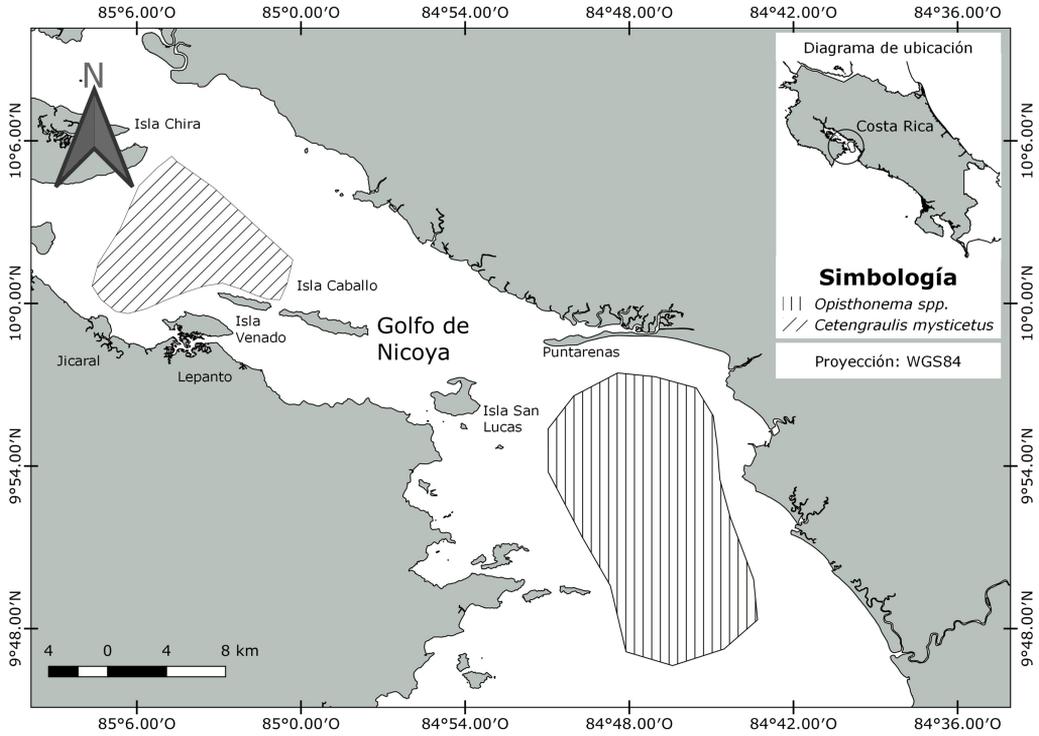


Fig. 1. Áreas de captura de las especies analizadas. Fuente de datos de figura: Atlas 2014 (TEC) y Laboratorio de Análisis Biológicos Pesqueros (UNA) (QGIS, 2018)

Fig. 1. Areas in which the species analyzed were captured. Data source: Atlas 2014 (TEC) and Fisheries Biological Analysis Laboratory (UNA) (QGIS, 2018)

Extracción de ADN, ampli-ficaciones y secuenciación de genes mitocondriales

Se realizó una extracción de ADN total de especies del complejo *Opisthonema spp.*, *O. medirastre* (n = 11), *O. libertate* (n = 4), *O. bulleri* (n = 7) y de la familia Engraulidae *C. mysticetus* (n = 5), a partir de 30 mg de tejido, aproximadamente, mediante el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini

Kit (Thermo Fisher Scientific), bajo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de muestras seleccionadas por especie, en este estudio, se respalda en un trabajo previamente realizado por [Bingpeng et al. 2018](#). El ADN obtenido fue amplificado mediante una PCR punto final (volumen final: 25 μ L) compuesta por 1X de PCR Máster Mix, 0.9 μ M de cada cebador y alrededor de 100 ng de ADN. Se analizaron

Cuadro 1. Características morfológicas diagnósticas evaluadas para las especies de *Opisthonema spp.* analizadas en este estudio para la localidad del Golfo de Nicoya, Costa Rica

Table 1. Diagnostic morphological characteristics evaluated for *Opisthonema spp.*, analyzed in this study for the location of the Gulf of Nicoya, Costa Rica

Espece	Código	bc (unidades)	Media bc	std (mm)	Media std	ph
<i>O. mediraastre</i>	GN04	70	68.0	168	163.6	/
	GN10	63		164		/
	GN11	78		184		/
	GN20	71		172		/
	GN24	62		169		/
	GN28	75		179		/
	PS19	62		140		/
	PS23	69		166		/
	PS29	64		137		/
<i>O. libertate</i>	PS04	88	86.3	151	144.9	+
	PS11	85		142		+
	PS28	86		142		+
<i>O. bulleri</i>	GN01	41	36.6	159	157.9	/
	GN02	37		158		/
	GN03	34		157		/
	GN04	35		163		/
	GN06	37		164		/
	GN12	36		147		/

bc: branquiespinas ceratobranquiales, std: longitud estándar, ph: pecas humerales (ausentes = /, presentes = +)

los genes mitocondriales citocromo oxidasa subunidad I (COI) y citocromo b (Cytb), así como el gen del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) (Cuadro 2). La PCR fue llevada a cabo en las siguientes condiciones: 94°C por 3 min (desnaturalización inicial); 40 ciclos

de 94°C por 30 s (desnaturalización), 48/55°C por 30 s (alineamiento), 72°C por 45 s (extensión) y, finalmente, 72°C por 10 min como extensión final. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La corrida se ejecutó a 80 V por

60 min en una solución amortiguadora TBE 1X (pH 8.0). Los amplicones obtenidos de los tres genes fueron secuenciados en ambas direcciones, utilizando la secuenciación de Sanger en

un analizador genético ABI 3130, bajo una química de secuenciación BigDye Terminator v3.1.

Cuadro 2. Cebadores utilizados en este estudio y sus respectivas secuencias de ADN. Se indica la región mitocondrial (mt) objetivo, las secuencias del cebador en dirección 5'-3', la referencia (Ref.) y el tamaño esperado del amplicón (Te) en pares de bases (pb) Table 2. Primers used in this study and their respective DNA sequences. Target mitochondrial region (mt), 5'-3' primer sequences direction, reference (Ref.), and expected amplicon size (Te) in base pairs (bp) are indicated

Organismo	Región génica (mt)	Secuencia (5'- 3')	Ref.	Te (pb)
<i>Opisthonema</i>	16S	5'CGCCTGTTTAACAAAAA-CAT3' 5'CCGGTTTGAAGTCAGAT-CACGT3'	Palumbi, 1996.	~520
	COI	5'TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC3' 5'ACTTCYGGGTGRCCRAARAATCA3'	Baldwin <i>et al.</i> 2009.	~651
	Cytb	5'AAACTGCAGCCCCTCA-GAATGATATTTGTCCTCA3' 5'AAAAAGCTTCCATCCAA-CATCTCAGCATGATGAAA3' 5'CGAAGCTTGATAT-GAAAAACCATCGTTG3'	Kocher <i>et al.</i> 1989, Meyer <i>et al.</i> 1990.	~370
	16S	5'CGCCTGTTTAACAAAAA-CAT3' 5'CCGGTTTGAAGTCAGAT-CACGT3'	Palumbi, 1996.	~520
	Cytb	5'TGACTTGAAAAACCACTGTTGTTATTCAAC3' 5'CTAGCTTTGGGAGYTAGD-GGTGGRAGTT3'	Bloom & Lovejoy 2012.	~1100
	COI	5'TTCTCAACCAACCACAAA-GACATTGG3' 5'TAGACTTCTGGGTGGC-CAAAGAATCA3'	Ivanova <i>et al.</i> 2006 Ward <i>et al.</i> 2005.	~620
<i>Engraulidae</i>				

Análisis molecular y de posicionamiento taxonómico

Utilizando el programa Geneious versión R9 (Biomatters), se editaron las secuencias nucleotídicas obtenidas, mediante una edición manual de los bordes no alineados. Luego, para corroborar, preliminarmente, su identidad taxonómica en el nivel de género, esas secuencias fueron evaluadas en el programa en línea BLASTn (Altschul *et al.* 1990), disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Benson *et al.* 2012); al final, fueron depositadas en el GenBank (Cuadro 3). Por otra parte, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, usando el programa MAFFT 7.0 (Katoh *et al.* 2009) y aplicando el método iterativo de refinamiento G-INS-i (1PAM/k = 2). Para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica, se analizó el alineamiento múltiple mediante el JModelTest v2.1.10 (Darriba *et al.* 2012), empleando parámetros por defecto, bajo el criterio de información de Akaike con 95% de intervalo de confianza y tomando en cuenta la corrección AICc. El programa arrojó los seis mejores modelos para las matrices correspondientes a los genes 16S ARN ribosomal [GTR + G, GTR + I, GTR + I + G, TVM + I, TVM + I + G, TIM3 + G], citocromo oxidasa subunidad 1 [TVM + G, TPM2uf + G, TVM + I + G, TPM2uf + I + G, GTR + G, TIM2 + G], para el cual $TVM + G = GTR + G$,

y citocromo oxidasa b [TrN + G, TIM1 + G, TrN + I + G, TIM3 + I + G, TIM2 + I + G, GTR + G], para el cual $TrN + G = GTR + G$. La elaboración de las topologías multigénicas de posicionamiento taxonómico se realizó mediante dos métodos: el primero, utilizando el programa raxmlGUI v.7.4.2 (Stamatakis *et al.* 2005), bajo un algoritmo de máxima verosimilitud (ML), con un modelo reversible en tiempo general (GTR-GAMMA) y aplicando 5000 permutaciones como valor bootstrap. El segundo método se efectuó a través de inferencia bayesiana (BI), con el programa MrBayes v.3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), un modelo de sustitución GTR-GAMMA y los siguientes parámetros: nst = 6, rates = gamma, cuatro cadenas simultáneas de Markov Monte Carlo (mcmc) y ngen = 1000000. La visualización y edición de los árboles obtenidos se confeccionó con el programa FigTree v1.4 (Rambaut, 2009); después, se concatenaron manualmente, según la similitud de las topologías y utilizando secuencias nucleotídicas ya reportadas en la base de datos del NCBI (Benson *et al.* 2012).

RESULTADOS

Las características morfológicas diagnósticas evaluadas para las tres especies del género *Opisthonema spp.* muestran que su identificación, tras observar las pecas humerales, permite

distinguir *O. libertate* (presencia de pecas humerales, ph) de *O. medirastre* y *O. bulleri* (ausencia de ph); sin embargo, este análisis se debe realizar con el espécimen fresco o recién capturado, de lo contrario, se dificulta su diferenciación. Por otro lado, medir la longitud estándar (std) y el conteo de las unidades de branquiespinas ceratobranquiales (bc) muestra una media de 86.3 para *O. libertate* (n = 3); 68.0, *O. medirastre* (n = 9), y 36.6, *O. bulleri* (n = 6). Estos resultados se encuentran entre los intervalos de unidades bc y

longitud estándar señalados en la literatura (Cuadro 1).

A partir de las reacciones de PCR, fue posible obtener amplificaciones positivas (tamaño esperado del amplicón en pares de bases), para los tres cebadores utilizados (16S, COI y Cytb), en las especies *O. medirastre*, *O. libertate* y *O. bulleri* del complejo *Opisthonema spp.*, así como para una especie de la familia Engraulidae. Los amplicones recuperados se purificaron y las secuencias parciales conseguidas se depositaron en el Genbank (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias depositadas en el Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) de las tres especies del complejo *Opisthonema spp.*, derivadas de tres marcadores moleculares y una especie del género *Cetengraulis sp.* obtenidas de este estudio

Table 3. Sequences deposited on Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) of three species of *Opisthonema spp.* complex, derived from three molecular markers and one species from the genus *Cetengraulis sp.* obtained from this study

Especie	Código	Localización en Golfo de Nicoya	Números de accesión GenBank		
			16S	COI	Cytb
	Om_GN04		MG889827	MN329855	MK499391
	Om_GN10		MG889828	MN329857	MK499395
	Om_GN11.1		MG889829	MN329858	MK499390
	Om_GN11.2		/	MN329865	/
	Om_GN20		/	MN329853	MK499388
	Om_GN24		MG889830	MN329863	MK499396
<i>O. medirastre</i>	Om_GN28	Zona externa	/	MN329850	MK499389
	Om_PS19		MG889831	MN329854	MK499393
	Om_PS23		MG889832	MN329860	MK499394
	Om_PS29.1		MG889833	MN329859	/
	Om_PS29.2		/	MN329861	/
	Om_voucher02 (UCR-3194.002)		/	/	MK499392

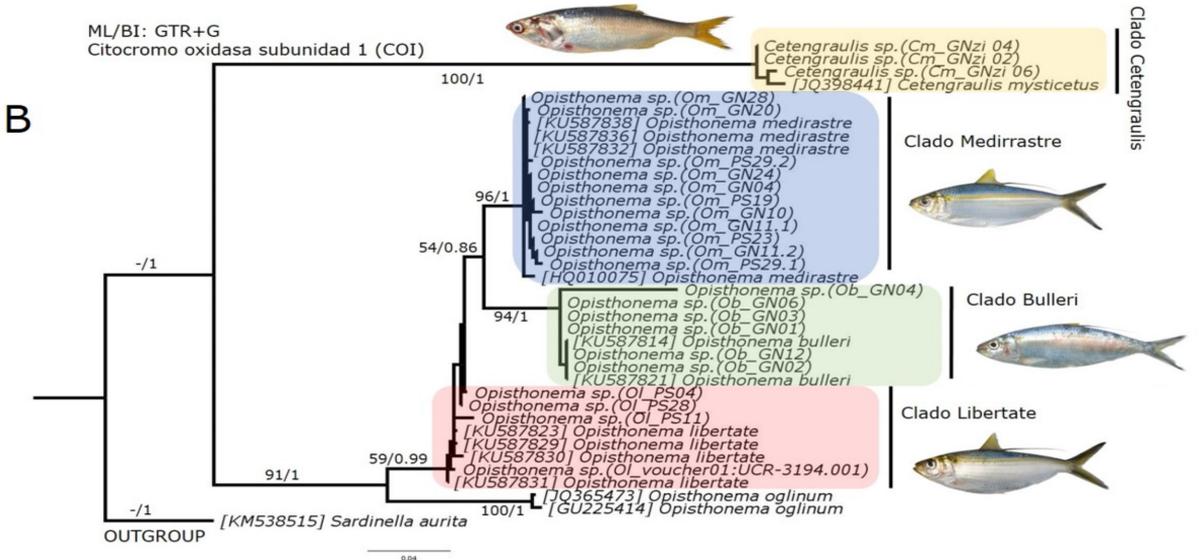
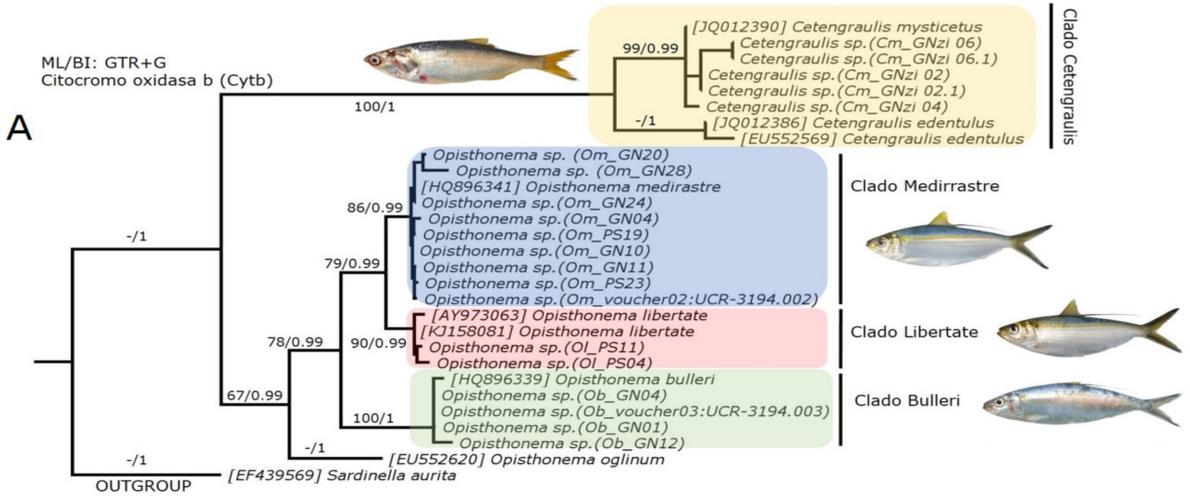
Especie	Código	Localización en Golfo de Nicoya	Números de accesión GenBank		
			16S	COI	Cytb
<i>O. libertate</i>	OI_PS04		MG889834	MN329856	MK499398
	OI_PS11		MG889835	MN329864	MK499397
	OI_PS28	Zona externa	/	MN329851	/
	OI_voucher01 (UCR-3194.001)		/	MN329862	/
	Ob_GN01		MG889836	MN329866	MK499400
<i>O. bulleri</i>	Ob_GN02		MG889837	MN329847	/
	Ob_GN03		MG889838	MN329848	/
	Ob_GN04	Zona externa	MG889839	MN329867	MK499401
	Ob_GN06		/	MN329849	/
	Ob_GN12		/	MN329852	MK499399
	Ob_voucher03 (UCR-3194.003)		/	/	MK499402
	Cm_GNzi 02		/	MN329846	MK499404
<i>C. mysticetus</i>	Cm_GNzi 02.1		/	/	MK499407
	Cm_GNzi_04	Zona interna	/	MN329845	MK499403
	Cm_GNzi 06		/	MN329844	MK499405
	Cm_GNzi 06.1		/	/	MK499406

Las topologías de los árboles filogenéticos construidos con base en regiones parciales de los genes Cytb, COI y 16S (Figuras 2A, 2B, 2C) confirman la existencia, en el golfo de Nicoya, de un grupo monofilético conformado por tres clados genéticamente diferentes, según la alta divergencia de las agrupaciones formadas. Tales clados se definen como *O. medirastre*, *O. libertate* y *O. bulleri*; así, se demuestra la presencia de las tres especies que componen el complejo complejo *Opisthonema spp.* en

el golfo de Nicoya, Puntarenas. Además, se observa que para los genes Cytb y 16S las especies *O. libertate* y *O. medirastre* son similares entre sí a nivel genético. Estos resultados moleculares son congruentes con los datos morfométricos y merísticos obtenidos, acorde con las características diagnósticas (pecas humerales y branquiespinas ceratobranquiales) indicadas por Bussing y Lopez (1994). Por otro lado, los individuos de *C. mysticetus*, analizados mediante marcadores mitocondriales, se posicionan

taxonómicamente en el clado marino *Cetengraulis*: *Cetengraulis edentulus* y *C. mysticetus*, separando en ramas bien soportadas a los especímenes originarios del Pacífico y del Atlántico,

demonstrando la especificidad en el método de identificación taxonómica con herramientas moleculares.



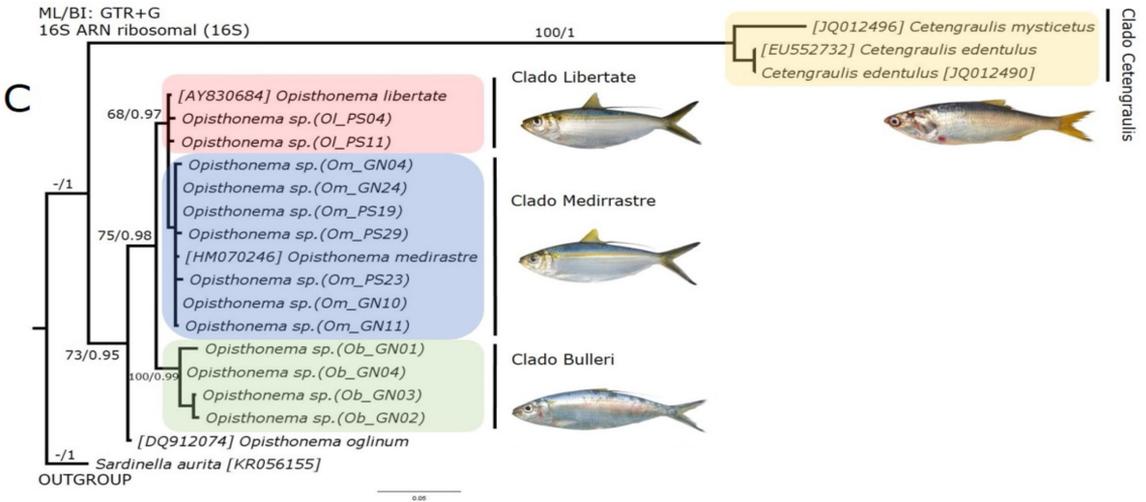


Fig. 2. Topologías de posicionamiento taxonómico mediante Máxima Verosimilitud/ Inferencia Bayesiana (ML/BI), entre secuencias genéticas de *Opisthonema spp.*, *Cetengraulis sp.* del Pacífico costarricense y secuencias parciales de los genes A) citocromo b (Cytb), B) citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y C) 16S ARN ribosomal (16S), obtenidas de la base de datos Genbank. El número en las ramas indica el valor de soporte *bootstrap* (porcentaje derivado de 5 000 permutaciones para ML y 1 000 000 generaciones MCMC para BI). *Sardinella aurita* es definido como grupo externo. La región y el código de colecta de las muestras de este estudio se presentan entre paréntesis. Para las secuencias obtenidas del Genbank, los números de accesoión se muestran entre corchetes. Valores de *bootstrap* o de probabilidad posterior menor a 50% o no obtenidos no se muestran en la topología o se indican con -

Fig. 2. Taxonomic placement topologies using Maximum Likelihood / Bayesian Inference (ML / BI), between genetic sequences of *Opisthonema spp.*, *Cetengraulis sp.* from the Costa Rican Pacific and partial sequences of the genes A) cytochrome b (Cytb), B) cytochrome oxidase subunit 1 (COI) and C) 16S ribosomal RNA (16S), obtained from the Genbank database. The number in the branches indicates the *bootstrap* support value (percentage derived from 5 000 permutations for ML and 1 000 000 MCMC generations for BI). *Sardinella aurita* is defined as an external group. The region and collection code of the samples in this study are shown in parentheses. For sequences obtained from the Genbank, the accession numbers are shown in square brackets. Bootstrap or posterior probability values less than 50% or not obtained are not shown in the topology or indicated with a -

DISCUSIÓN

Según [Berry y Barret \(1963\)](#), las diferenciaciones taxonómicas de estas especies se basan, principalmente, en dos aspectos: distribución geográfica y número o cantidad de branquiespinas de la región ceratobranquial (bc), asociadas a la longitud del individuo. Se reporta que *O. libertate* presenta 71-107 bc; *O. medirastre*, 50-68 bc, y *O. bulleri*, 28-35 bc. Posteriormente, en un estudio realizado por [Rodríguez-Sánchez \(1985\)](#), se considera que la densidad de branquiespinas disminuye en relación con el tamaño del espacio interbranquial, hecho que discrepa de la veracidad de los caracteres merísticos descritos por [Berry y Barret \(1963\)](#). Fue, entonces, menor la cantidad de branquiespinas en *O. bulleri*, seguido de *O. medirastre*, y mayor en *O. libertate*, por lo que se concluye que el conteo de las branquiespinas permite identificar únicamente *O. libertate* y *O. bulleri*.

En este estudio, el conteo de las branquiespinas de la región ceratobranquial concuerda con los rangos de las unidades bc para cada especie del complejo *Opisthonema spp.*, señaladas en la literatura. De la misma forma, los valores medidos de la longitud estándar se encuentran entre los límites descritos para las especies en estudio, lo que facilita la identificación en especímenes recién capturados (Cuadro 1).

Por otro lado, la presencia de las pecas humerales permitió distinguir, con mayor facilidad, entre los especímenes de *O. libertate* y los de *O. medirastre* y *O. bulleri*.

Una investigación realizada por [Lagúnez y Rodríguez \(1992\)](#), en poblaciones de estas mismas especies en el pacífico mexicano, a partir de análisis de proteinogramas, arrojó la existencia de seis patrones en *O. libertate* muy similares a *O. medirastre*; mientras, estos difieren de los de *O. bulleri*, por lo tanto, los autores consideran que las dos primeras especies son entidades taxonómicamente muy cercanas y que más que especies distintas podrían ser subpoblaciones de una misma especie. Por su parte, [Pérez-Quiñónez \(2014\)](#), a través de patrones morfométricos de las tres especies y un análisis de componentes principales mediante variables canónicas, obtuvo una mayor similitud entre las formas de *O. medirastre* y *O. libertate*, mientras que *O. bulleri* presentaba más diferenciación con respecto a la forma corporal. Nuestros hallazgos muestran una mayor cercanía filogenética entre *O. libertate* y *O. medirastre*, de acuerdo con las topologías taxonómicas obtenidas para los genes 16S y Cytb, lo cual concuerda con lo reportado por los autores citados anteriormente.

La adición de datos moleculares en estudios morfológicos mejora significativamente el soporte y la

resolución de los análisis filogenéticos (Wortley & Scotland, 2006); con ello, proporciona datos relevantes cuando se evalúan especies de interés comercial. En estas últimas, no es posible (o resulta complejo) determinar las capturas por especie mediante características morfológicas (Pérez-Enríquez *et al.* 2016), como es el caso de las sardinas de la familia Clupeidae, razón por la cual dichas capturas son registradas, generalmente, como sardina crinuda (*Opisthonema spp.*) tanto en Costa Rica como en otros países de la región -México entre ellos- (Pérez-Quiñonez *et al.* 2020). Lo anterior conduce a una posible subestimación o sobreestimación de la riqueza de especies e incluso a la sobreexplotación de las poblaciones de peces.

Li y Ortí (2007), a partir de análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesianos de datos con ADN mitocondrial (12S y 16S) y ADN nuclear (genes activadores de recombinación, RAG 1 y RAG 2), encontraron monofilia en subfamilias Engraulidae (Engraulis y Anchoa), pero no en la familia Clupeidae. Pérez-Quiñonez *et al.* (2017), completaron análisis moleculares del gen citocromo oxidasa I (COI) del ADNmt para especies reconocidas del complejo *Opisthonema spp.*, en la región sur del golfo de California, México, y con fundamento en sus resultados morfológicos y genéticos se

soporta la existencia de tres entidades evolutivas para la región: *O. bulleri*, *O. medirastre* y *O. libertate*. Estos datos coinciden con nuestros hallazgos, de acuerdo con la topología observada en el árbol de posicionamiento taxonómico para los tres genes (Cytb, COI y 16S ARNr), lo que apoya la identidad y existencia de las tres especies para la región y, específicamente, para el golfo de Nicoya, Costa Rica.

La correcta identificación de estas especies de interés pesquero, mediante características morfológicas y genéticas, facilita el uso y manejo de estos recursos marinos dentro de una zona de relevancia comercial en el país como lo es el golfo de Nicoya. Ello con el objetivo de minimizar la alteración del porcentaje de la biomasa virginal que debe contener el ecosistema y así mantener el resto de los eslabones de la cadena alimentaria.

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en este estudio sobre los caracteres morfométricos y merísticos diagnósticos, así como en herramientas moleculares, se confirma la identificación de tres entidades taxonómicas diferentes en el complejo *Opisthonema spp.* descrito en el golfo de Nicoya: *O. libertate*, *O. medirastre* y *O. bulleri*, confirmando su identidad y presencia en sitios de pesca en el exterior de dicho golfo. Por otro lado, se corrobora

el posicionamiento taxonómico de los individuos de *C. mysticetus* en el clado marino *Cetengraulis* sp., *C. edentulus* y *C. mysticetus*, lo cual comprueba su identidad y presencia en los sitios de pesca dentro del golfo de Nicoya. Con la información obtenida en este trabajo y la disponible en la base mundial de datos genéticos, es posible realizar, a futuro, investigaciones comparativas de diversidad y estructura genética (por ejemplo, redes de haplotipos y RAD-seq), en el golfo de Nicoya y otras zonas de captura de Clupeidos de importancia comercial.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 0079-14: Aportes a la gestión pesquera artesanal y semi-industrial del golfo de Nicoya, Costa Rica, financiado por la Ley de Pesca, Costa Rica. También, a Karolina Ramos Jiménez y Karen Oviedo Bolaños, por el soporte técnico en los ensayos moleculares. Por último, a los evaluadores, por sus recomendaciones y aportes para la publicación de este artículo.

REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ardura, A., Linde, A. R., Moreira, J. C. & García-Vázquez, E. (2010). DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biol. Conserv.*, 143(6), 1438-43. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.03.019>
- Baldwin, C. C., Mounts, J. H., Smith, D. G. & Weigt, L. A. (2009). Genetic identification and color descriptions of early life/history stages of Belizean *Phaeoptyx* and *Astrapogon* (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult *Phaeoptyx*. *Zootaxa*, 2008, 1-22.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., ... & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 41(D1), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Berry, F. H. & Barrett, I. (1963). Análisis de las branquiespinas y denominación del arenque de hebra *Opisthonema*. *Inter-A. Tuna Trop. Comm. Bull.*, 7(2), 110-190.
- Bingpeng, X., Heshan, L., Zhilan, Z., Chunguang, W., Yanguo, W. & Jianjun, W. (2018). DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PLoS ONE*, 13(6), e0198109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198109>
- Bloom, D. D. & Lovejoy, N. R. (2014). The evolutionary origins of diadromy inferred from a time/calibrated phylogeny for Clupeiformes (herring and allies). *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 281(1778), 2013-2081. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2081>
- Bussing, W. & López, M. (1994). Peces demersales y pelágicos costeros del Pacífico de Centroamérica Meridional. Guía Ilustrada. *Rev. Biol. Trop.*, 47 (Suplemento), 47-164.
- Carvalho, D. C., Oliveira, D. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22(1), 80-86.

- <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588214>
- Chakraborty, A. & Iwatsuki, Y. (2006). Genetic variation at the mitochondrial 16S rRNA gene among *Trichiurus lepturus* (Teleostei:Trichiuridae) from various localities: Preliminary evidence of a new species from West Coast of Africa. *Hydrobiologia*, 563, 501-513. <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0105-4>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics, and parallel computing. *Nat. Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Durand, J. D., Hubert, N., Shen, K. N. & Borsa, P. (2017). DNA barcoding grey mullets. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 27, 233-43. <https://doi.org/10.1007/s11160-016-9457-7>
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Italia: FAO.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. & Miem, V. H. (1995). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro Oriental*. Italia: FAO.
- Froese, R. & Pauly, D. (2019). FishBase. World Wide Web electronic publication. <https://www.fishbase.se/search.php>
- Goodbody-Gringley, G., Strand, E. & Pitt, J. M. (2019). Molecular characterization of nearshore baitfish populations in Bermuda to inform management. *PeerJ*, 7, e7244. <https://peerj.com/articles/7244/>
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 270 Suppl 1(Suppl 1), S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MR-BAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinf.*, 17(8), 754-755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Ivanova, N. V., deWaard, J. R. & Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive automatization friendly protocol for recovering high quality DNA. *Mol. Ecol. Notes*, 6(4), 998-1002. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
- Jahan, H., Akter, M., Begum, R. A. & R. Shahijahan. (2017). Identification and comparison of three carp fishes based on mitochondrial 16S rRNA gene. *J. Biol. Sci.*, 26 (2): 167-174.
- Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In D. Posada (Ed.), *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 39-64). EE. UU.: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., ... & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(16), 6196-6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>
- Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Kumar, S., Campo, D., Cariani, A., ... & Blohm, D. (2010). Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *Plos One*, 5(9), e12620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012620>
- Lagúnez, L. & Rodríguez, F. (1992). Contribución al conocimiento genético de *Opisthonema* spp. del noreste de México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 7(1),15-24.
- Li, C. & Ortí, G. (2007). Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii)

- inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44, 386-398. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.030>
- Meyer, A., Kocher, T. D., Basasibwaki, P. & Wilson, A. C. (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347(6293), 550-553. <https://doi.org/10.1038/347550a0>
- Murase, A., Angulo, A., Miyazaki, Y., Bussing, W. & López, M. (2014). Marine and estuarine fish diversity in the inner Gulf of Nicoya, Pacific coast of Costa Rica, Central America. *Check List*, 10(6), 1401-1413. <https://www.biotaxa.org/cl/article/view/10.6.1401>, <https://doi.org/10.15560/10.6.1401>
- Paine, M., McDowell, J. & Graves, J. (2007). Specific identification of Western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bull. Mar. Sci.*, 80(2), 353-367.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (pp. 205-247). EE. UU.: Sinauer & Associates, Inc.
- Peng, Z., He, S. & Zhang, Y. (2004). Phylogenetic relationships of glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae) inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31(3), 979-987. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.10.023>
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate mega-diverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet.*, 14, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Pérez-Enríquez, R., Díaz-Viloria, N., Cruz-Hernández, P., Aranceta-Garza, F., Gutiérrez-González, J. L., ... & Max-Aguilar, A. (2016). Estudios de genética en poblaciones de abujón y sus aplicaciones en ordenamiento pesquero. *Rec. Nat. Soc.*, 2(2), 24-39. <https://doi.org/10.18846/reynatsoc.2016.02.02.02.0002>
- Pérez-Quiñonez, C. I. (2014). Discriminación de las especies del género *Opisthonema* Gill, 1861 en el Sur del Golfo de California usando análisis morfométricos y genéticos. (Tesis de Maestría no publicada). Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), Instituto Politécnico Nacional, México.
- Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C. & García-Rodríguez, F. J. (2020). A simple method for the genetic identification of commercially important species in the *Opisthonema* genus Gill, 1861 in the southern Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 46(3), 145-154. <https://doi.org/10.7773/cm.v46i3.3059>
- Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C. & García-Rodríguez, F. J. (2018). Detecting *Opisthonema libertate* (Günther, 1867) phenotypic stocks in northwestern coast of Mexico using geometric morphometrics based on body and otolith shape. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 46(4), 779-790.
- Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C. & García-Rodríguez, F. J. (2019). Genetic homogeneity of the Pacific thread herring (*Opisthonema libertate*) (Günther, 1867) in the Eastern Pacific, inferred from mtDNA sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(3), 517-524. <https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1570173>
- Pérez-Quiñonez, C. I., Quiñonez-Velázquez, C., Ramírez-Pérez, J. S., Vergara-Solana, F. J. & García-Rodríguez, F. J. (2017). Combining geometric morphometrics and genetic analysis to identify species of *Opisthonema* Gill, 1861 in the eastern Mexican

- Pacific. *J. Appl. Ichthyol.*, 33(1), 84-92. <https://doi.org/10.1111/jai.13051>
- QGIS. Development Team. (2018). QGIS Geographic Information System. EE. UU: Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4 2012-2014: Tree Figure Drawing Tool. Edinburgh, Scotland: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Robertson, D. R. & Allen, G. R. (2002). Shore fishes of the Tropical Eastern Pacific: an Information System. Smithsonian Tropical Research Institute. <http://www.neotropicalfishes.org/sfstep>
- Rocha, A., Garber, N., Garber, A. & Stuck, K. (2005). Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of *Mugil cephalus*. *Hidrobiológica*, 15(2), 139-149.
- Rodríguez, J. A. & Gómez, K. R. (1998). Aspectos relevantes en la biología de *Cetengraulis mysticetus* (Günther) (Pisces: Engraulidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Uniciencia*, 15(1), 57-60.
- Rodríguez-Sánchez, R. (octubre, 1985). Aspectos de dinámica poblacional en apoyo de la separación de las especies del género *Opisthonema* por el método de índice de densidad de branquiespinas. CalCOFI abstracts, annual, conference. EE. UU.
- Soto, R. & Rodríguez, J. (1999). Dinámica poblacional de *Opisthonema medirastre* (Pisces: Clupeidae) en la costa Pacífica de Costa Rica. *Uniciencia*, 15(16), 61-64.
- Stamatakis, A., Ludwig, T. & Meier, H. (2005). RAxML/III: a fast program for maximum likelihood/ based inference of large phylogenetic trees. *Bioinf.*, 21(4), 456-463. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti191>
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 19(3), 265-293. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9107-4>
- Vega-Corrales, L. A. (2010). Evaluación poblacional del stock explotable del complejo *Opisthonema* (Pisces: Clupeidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Cien. Mar. Cos.*, 2, 83-94. <https://doi.org/10.15359/revmar.2.7>
- Vicente, F., Loeb, M. V., Paiva, A. C. G. D., Sampaio, C. L., Argolo, L. A. & Jacobina, U. P. (2020). Integrative systematics unveils the controversial identity of Engraulidae fishing stocks in a Neotropical estuary, northeast Brazil. *Neotrop. Ichthyol.*, 18(4), 1-17. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0037>
- Wang, P., Zhao, C., Fan, S., Yan, L. & Qiu, L. (2018). The complete mitochondrial genome of *Thryssa hamiltonii* and phylogenetic analysis of Engraulidae (Clupeiformes; Clupeoidei). *Mitochondrial DNA Part B.*, 3(2), 538-540. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1467232>
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc.*, 360(1462), 1847-1858. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Wortley, H. & Scotland, R. (2006). The effect of combining molecular and morphological data in Published Phylogenetic Analyses. *Syst. Biol.*, 55(4), 677-685. <https://doi.org/10.1080/10635150600899798>

Condición ambiental del sedimento del sector oriental del golfo de Cariaco

Environmental condition of sediment in the eastern sector of Cariaco Gulf

María Valentina Fuentes Hernández^{1*}

RESUMEN

En 2008, se evaluó la condición ambiental del sedimento de la región oriental del golfo de Cariaco (Venezuela) al relacionar las concentraciones químicas de metales traza e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) con las respuestas a pruebas toxicológicas estandarizadas. Para ello, en abril, los metales particionados en el sedimento y en el agua retenida fueron extraídos y medidos con ICP-OES. Los HAP fueron separados del sedimento con ultrasonido y medidos con HPLC-fluorescencia. Además, se ejecutaron pruebas de supervivencia de *Artemia* y actividad hemolítica. Las concentraciones de metales totales ($\mu\text{g g}^{-1}$) fueron: Cu (29-91), Cd (1.9-4.9), Cr (4-36), Ni (10-33), Pb (3-9) y Zn (32-112). En el agua fueron detectados, en $\mu\text{g L}^{-1}$: Pb (33-56) y Cr (154-237). Las concentraciones de HAP (3-5 anillos) fueron bajas, con predominio de fluoranteno (22-71 ng g^{-1}), en particular, pirolítico. Solamente, en algunas localidades, las concentraciones de Cu, Ni y Cd del sedimento superaron los criterios de calidad. No hubo mortandad de larvas durante las pruebas toxicológicas y la actividad hemolítica fue menor que 2%. Una vez realizado el contraste se demuestra que los sedimentos tienen alta calidad ecológica.

Palabras clave: Agua, riesgo ambiental, sedimento, tóxicos, Venezuela

ABSTRACT

In 2008, the environmental status of sediment in the eastern region of the Gulf of Cariaco (Venezuela) was evaluated by comparing chemical concentrations of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to responses to standardized toxicological tests. In April, the metals partitioned in the sediment and retained water were extracted and measured using ICP-OES analysis. The PAHs were separated from the sediment using ultrasound and measured with HPLC-fluorescence detectors. In addition, *Artemia* survival was evaluated and hemolytic activity tests were performed. The total metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) were: Cu (29-91), Cd (1.9-4.9), Cr (4-36), Ni (10-33), Pb (3-9) and Zn (32-112). Results of the analysis of water ($\mu\text{g L}^{-1}$) were Pb (33-56), Cr and (154-237). The concentrations of PAHs (3-5 rings) were low, with a

¹ Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cerro Colorado, Cumaná, Venezuela.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7705-3368>, mfuentes@udo.edu.ve; mvfuentesh@gmail.com*

predominance of fluoranthene (22-71 ng g⁻¹), mainly pyrolytic. Concentrations of Cu, Ni and Cd in the sediment exceeded quality criteria in only a few locations. There was no mortality of larvae during toxicological tests and hemolytic activity was less than 2%. These results show that the sediments analyzed have high ecological quality.

Keywords: Sediment, water, toxins, environmental risk, Venezuela

INTRODUCCIÓN

Muchos contaminantes ambientales orgánicos e inorgánicos pueden ser introducidos a las aguas superficiales costeras de manera natural o antrópica, donde pueden estar disueltos o ser adsorbidos en las partículas finas de limo, arcilla o materia orgánica transportadas al mar por el viento, corrientes de agua dulce y las mareas. Sin importar su procedencia, estas sustancias son acumuladas en los sedimentos marinos de áreas de baja energía cinética, como ensenadas, bahías, lagunas, golfos, etc., y distribuidas, de acuerdo con su afinidad, a un compartimento particular del sedimento, en donde las condiciones fisicoquímicas pueden favorecer su adsorción o desorción, y determinar su biodisponibilidad (Carballo *et al.* 2010). De hecho, siempre existe una especie química controladora del acopio, sin ser la causante de las altas concentraciones. Verbigracia, un sedimento rico en sulfuros retiene metales o de modo similar, la materia orgánica puede favorecer la acumulación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Araujo *et al.* 2006). Empero, las variaciones ambientales

pueden provocar la liberación de estas sustancias acumulativas y tóxicas adheridas a las partículas del sedimento hacia el agua, donde son más disponibles química y biológicamente (Fuentes, 2010). En específico, cuando estas especies químicas cautivas están presentes en cantidades superiores a una concentración umbral pueden causar efectos tóxicos adversos a los organismos vivos e impactar indirectamente la salud humana, por ello cualquier contaminante que ingrese al medio marino afecta, de forma potencial, la ecología (Khaled *et al.* 2017; Fuentes, 2010).

Como el sedimento es un componente importante de los ecosistemas marinos y provee hábitats que sostienen una gran variedad de organismos bentónicos, la presencia de metales e hidrocarburos policíclicos aromáticos representan riesgos potenciales para su bienestar (Simpson *et al.* 2005; Swarnalatha & Nair, 2017). En tal sentido, las evaluaciones ecotoxicológicas consideran muy importante conocer las consecuencias biológicas que estos puedan provocar a los organismos (Carballo *et al.* 2010).

Tomando en cuenta estas consideraciones, una buena aproximación para realizar una evaluación efectiva de la condición ambiental de un sedimento requiere contrastar las concentraciones de los compuestos químicos asociados a él, que miden la contaminación con los resultados de pruebas toxicológicas en el laboratorio y la ocurrencia de efectos biológicos adversos en condiciones estandarizadas. Los resultados permiten categorizar la condición ambiental desde no degradada (sin ningún parámetro alterado) hasta degradado (todos los parámetros alterados), tomando en consideración las guías de calidad para especies químicas y los resultados de las pruebas toxicológicas que cubren distintos estadios de vida (Chapman, 1996; Long *et al.* 2002).

El golfo de Cariaco es una de las áreas pesqueras más importantes de la región nororiental de Venezuela. En su región más oriental está ubicado el Saco, cuyos sedimentos acumulan especies químicas naturales y antropogénicas, debido a la contribución de múltiples factores como la meteorización natural de rocas sedimentarias de la Formación Frontada, la geomorfología que condiciona su baja energía hidrodinámica, el drenaje continental de material fino desde zonas bajas y pantanosas que caen por la costa sur y el extremo oriental arrastrado por el río Cariaco y quebradas, la presencia

de grandes formaciones de manglares, los cuales junto a la elevada producción planctónica y los procesos de afloramiento aportan y renuevan una gran cantidad de materia orgánica particulada (Caraballo, 1982; Fuentes *et al.* 2010). Además, recibe directamente aguas servidas y desechos sólidos de las poblaciones circundantes con carencia entre 81% y 96% de servicios cloacales (Quintero *et al.* 2002) y restos de pesticidas, herbicidas y abonos de la extensa actividad agrícola realizada en una región aledaña a Cariaco (Martínez, 2002). Una contribución adicional es la liberación a la atmósfera de residuos de combustibles del tráfico rodante y flotante que pueden depositarse en el ecosistema. Estas condiciones logran modificar la calidad natural de este ecosistema, con gran importancia ecológica, socioeconómica y científica, y disminuir, de forma notable, los recursos vivos (Fuentes, 2010). Aunque han transcurrido 13 años de la obtención y procesamiento de esta data, ella complementa la historia de la región, en concreto, porque congrega información simultánea sobre concentración de las especies químicas señaladas y pruebas toxicológicas en esta relevante área marina, especialmente cuando el Instituto Oceanográfico de Venezuela, custodio de esta información, ha sido desvalijado y quemado.

Por ello, el propósito de este trabajo es establecer, con certeza, la

condición ambiental respecto a la presencia de metales e hidrocarburos policíclicos aromáticos de los sedimentos de la región oriental del golfo de Cariaco y su potencial efecto sobre los organismos, lo cual proporcionará datos importantes para planificar el desarrollo sustentable de la zona, el cual obliga a su conservación y uso racional.

MATERIALES Y MÉTODOS

El saco del golfo de Cariaco está enclavado en la zona oriental de la península de Araya (Venezuela), aproximadamente entre 63° 38' y 63° 46' de longitud oeste y 10° 28' y 10° 32' de latitud norte (Fig.1). Su extensión es 29 km², profundidad máxima 35 m y salinidad media 35 UPS. Clima semi-desértico, precipitación anual menor a 250 mm, temperaturas entre 26°C y 27°C, moderadas por los vientos alisios NE (2-5 m s⁻¹). La evaporación es superior a 2 000 mm año⁻¹. Su hidrología está poco influenciada por ríos, quebradas y escorrentías (Caraballo, 1982; Quintero *et al.* 2005).

Como toda zona resguardada, la energía del agua es baja y las partículas se transportan preeminentemente suspendidas, lo cual justifica la presencia de sedimentos mal clasificados con detritos de rocas sedimentarias, esqueletos, conchas de moluscos, arrecifes

marginales, caparazones de foraminíferos planctónicos y bentónicos, fracción limosa y arcilla procedentes de suelos adyacentes y arrastradas por el río Cariaco (Caraballo, 1982; Quintero *et al.* 2006).

El saco del golfo colinda con los municipios Mejías y Ribero, cuya población aproximada es de 90 884 habitantes (INE, 2014) y sus actividades económicas principales son la agricultura y la pesquería (Quintero *et al.* 2002). Los residuos de estos núcleos poblados, suelos cultivados, tráfico automotor y quema de vegetación introducen al ecosistema sustancias químicas nocivas.

Para recoger las muestras de los sedimentos superficiales, en abril 2008, temporada seca, se establecieron doce estaciones a diferentes profundidades (Ests.), ubicadas con un sistema de posicionamiento global diferencial (Cuadro 1, Fig. 1). Previo al muestreo, todo el equipo fue lavado con HNO₃ 10%, enjuagado con agua Millipore y finalmente, con agua de mar de la estación en cuestión. Las muestras fueron recogidas con una draga Diez Laffont de 0.02 m² de área, a una profundidad aproximada de 5 cm, y conservadas a 4°C hasta su análisis, dos días después.

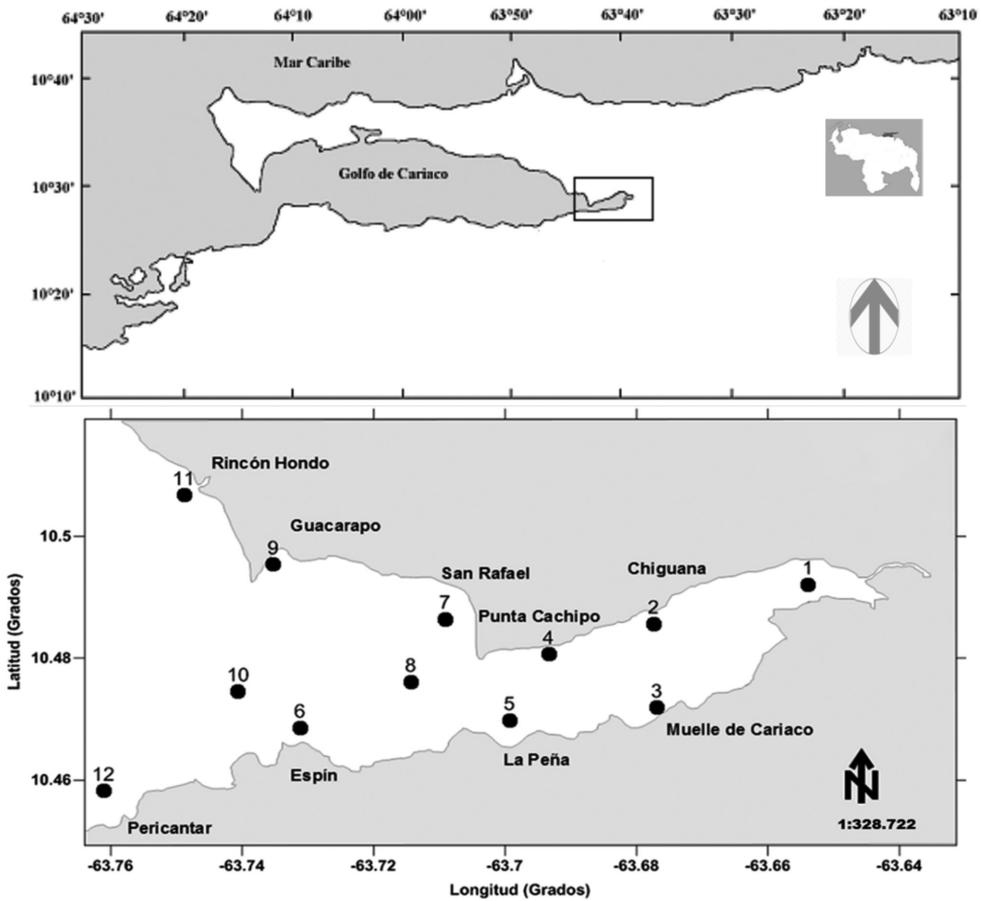


Fig. 1. Saco del golfo de Cariaco. Localización geográfica. Estaciones de muestreo (Fuentes-Hernández *et al.* 2019)

Fig. 1. Eastern region of the Gulf of Cariaco. Geographic location. Sampling stations (Fuentes-Hernández *et al.* 2019)

La fracción gruesa del sedimento seco (> 2 mm) fue separada por tamización en un equipo Ro-Tap con una columna Tyler; mientras que las fracciones menores, limo y arcilla, por sedimentación, con el método del hidrómetro densímetro (Bouyoucos, 1962). Para ello, la muestra se mezcló

con polifosfato de sodio y agua destilada, agitó, homogeneizó y procesó como está descrito en Primo & Carrasco (1973). Una vez obtenidos los porcentajes de arena, limo y arcilla se determinó la textura sedimentaria, mediante el triángulo de Shepard (1954).

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo en el saco del golfo de Cariaco

Table 1. Geographical coordinates of the sampling stations in the eastern region of the Gulf of Cariaco

Estación	Latitud norte	Longitud oeste	Profundidad (m)
1	10° 29,313'	63° 39,140'	3.5
2	10° 29,186'	63° 40,331'	3.0
3	10° 28,180'	63° 39,140'	6.0
4	10° 28,510'	63° 41,360'	11.0
5	10° 28,309'	63° 41,388'	11.2
6	10° 27,994'	63° 43,615'	19.0
7	10° 29,109'	63° 42,327'	1.3
8	10° 28,432'	63° 42,859'	18.0
9	10° 29,720'	63° 44,112'	20.5
10	10° 38,241'	63° 44,558'	30.0
11	10° 30,241'	63° 44,558'	9.5
12	10° 27,047'	63° 46,478'	34.0

El carbono orgánico (Corg.) se determinó mezclando 0.5 g del sedimento tamizado con diámetro menor que 2mm, con 10 mL de 0.5 mol L⁻¹ de K₂Cr₂O₇ y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. El calor de la reacción liberada es suficiente para provocar la combustión húmeda del Corg. El dicromato de potasio excedente es titulado con una solución estándar 0.2 mol. L⁻¹ de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, en presencia de sulfato de plata para corregir el error positivo debido al cloruro (Gaudette *et al.* 1974).

Los carbonatos (CaCO₃) se obtuvieron por termogravimetría a 800°C. 1 g de sedimento tamizado, menor que 2mm, fue colocado en una mufla por períodos de 2h a cada temperatura del gradiente 105, 300, 550 y 800°C. La cantidad de carbonato se calculó con la diferencia de masas obtenidas a 550 y 800°C.

Los metales totales fueron determinados, por triplicado, de la siguiente manera: 1 g de sedimento seco, procedente de la fracción granulométrica menor que 2 mm, después de tamizado, se digirió durante 12 h en 10 mL de ácido nítrico concentrado, luego se calentó durante 2 h a 80°C y por 2h más a 120°C (Rojas *et al.* 2005). Al enfriar, se filtró y enrasó, con agua ultrapura, hasta 25 mL. Todas las muestras se midieron por espectrometría de emisión óptica (OES) con un plasma inductivamente acoplado (ICP), ejecutada con un equipo Perkin Elmer Optima 5 300 DV. La adecuación del método para el requerimiento indicado fue validada con un material de referencia certificado de sedimentos marinos (HISS-1). La veracidad resultó mayor que 92%, la precisión entre 0% y 3%, la exactitud superior a 93%. Los límites de detección obtenidos en la validación, en µg g⁻¹, fueron Cd (0.30), Cu (1), Cr (0.05), Mn (1), Pb (0.3), Ni (0.2), Zn (1).

El agua retenida en el sedimento fue sustraída por centrifugación refrigerada (20°C), a 2 330 rpm, filtrada

por papel Whatman 42 μm . Los metales totales presentes en el agua fueron cuantificados, por triplicado, mediante espectrometría de emisión óptica con un plasma inductivamente acoplado (OES-ICP). Las soluciones estándares fueron preparadas en agua de mar artificial para minimizar el efecto matriz. Para validar el método, se determinaron los límites de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$): Cd (10), Cu (30), Pb (10), Ni (6), Zn (50), Cr (41). La precisión de los resultados fue menor de 2%.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) fueron extraídos mediante ultrasonido con la metodología descrita en [Banjoo & Nelson \(2005\)](#). El reactivo extractante fue diclorometano, seguido de purificación del extracto con hexano-diclorometano en una columna cromatográfica miniatura con virutas de cobre activado para remover el azufre elemental. A continuación, la separación de sus componentes se realizó con un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HP 1 100) con detector de fluorescencia y una columna LiChrospher®PAH (250-3-HPLC), bajo las condiciones descritas por [Fuentes et al. \(2012\)](#).

Para la identificación y cuantificación de HAP se utilizó una mezcla SRM 1647e del Instituto Nacional de Estándares y Tecnologías (NIST) y patrones individuales. La veracidad del método fue superior a 92%, exactitud más de 90%, la precisión menor que

3%. Los límites de detección, en ng g^{-1} , fueron: naftaleno (0.04), fenantreno (0.01), antraceno (0.011), fluoranteno (0.002), pireno (0.05).

El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson permitió medir la relación estadística lineal entre las variables aleatorias estudiadas.

La evaluación de la toxicidad aguda se realizó, en el agua extraída del sedimento con la prueba de supervivencia *Artemia* de la norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI ([SCFI, 1995](#)). Una vez eclosionados los nauplios de *Artemia sp.*, 10 de ellos, se colocaron en 2 mL de diluciones del agua con agua de mar artificial (25-100%), durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se cuentan los individuos muertos y vivos. El criterio de muerte fue la inmovilidad de los apéndices y del tracto digestivo durante un período de observación de 10 segundos con una lupa binocular.

Para averiguar la probabilidad tóxica de las sustancias presentes en los extractos orgánicos del sedimento se modificó la prueba supervivencia de *Artemia franciscana* ([SCFI 1995](#)). El proceso de extracción fue descrito por [Banjoo & Nelson \(2005\)](#) para HAP. Las soluciones de prueba fueron diluciones del extracto con agua de mar artificial (1:4, 1:8, 1:16). La exposición de los organismos siguió el protocolo descrito, previamente, para el agua extraída del sedimento. Simultáneamente, para

evaluar LC_{50} fueron realizados ensayos con diluciones acuosas de $ZnSO_4$ (LC_{50} 35 mg L^{-1}), naftaleno en DMS 5% v/v (LC_{50} 600 $\mu g L^{-1}$) y DMS 5% v/v (control negativo).

La prueba de eritrocateresis por acción del agua retenida en los sedimentos fue realizada con el protocolo propuesto por *Key et al. (2002)*, el cual consiste en incubar durante 90 minutos, en un baño de agua a 37°C, diluciones (25-100%) del agua extraída del sedimento con sangre humana (ORh⁺). La medición de la oxihemoglobina liberada se realizó con un espectrómetro de absorción molecular UV/VIS Jenway 6 300 a 540 nm., y debe ser directamente proporcional al daño provocado, al ser expuestos a sustancias nocivas.

Para valorar la capacidad potencial de estas sustancias químicas para provocar problemas de salubridad ambiental que puedan afectar a la flora, fauna o salud humana fue elaborado un arreglo bidimensional, emulando la matriz de decisión tabulada para una evaluación semicuantitativa de sedimentos reseñada en *Simpson et al. (2005)*, donde se compilaron las caracterizaciones química y toxicológica, al atender a la ponderación relativa indicada en el cuadro 2. Para pronosticar posibles efectos químicos se usaron dos conjuntos de concentraciones como valores críticos: los Intervalo de Efectos Bajos (ERL) y Efectos Medios (ERM) para sedimentos y los Criterios

de Concentración Continua (CCC) y Concentración Máxima (CCM) para proteger la vida acuática marina, ambos emitidos por la Administración Oceánica y Atmosférica (NOOA). Respecto a esto, *Long & Morgan (1990)* y *O'Connor & Paul (2004)* señalan que ERL y ERM identifican a los percentiles 10 y 50 de un conjunto de concentraciones que coocurren con la toxicidad: De hecho, ERL es aquella concentración de una especie química en el sedimento, por debajo de la cual, los efectos adversos son rara vez observados (<10%), concentraciones iguales o superiores a ERL pero inferiores a ERM representan un intervalo de posibles efectos (10-50%). Por otro lado, CCC es una estimación de la concentración más alta de una sustancia, en el medio acuático, a la que pueda ser expuesta, indefinidamente, la comunidad acuática, sin que se produzcan consecuencias desfavorables (crecimiento, reproducción, supervivencia) y por CCM a la concentración más alta de una especie química en la columna de agua que puede un organismo acuático ser expuesto de manera aguda sin causar un efecto adverso (LC_{50}) (*Buchman, 2008*). La valoración relativa conlleva a la total (Cuadro 2), de tal manera que un sedimento de “Alta calidad” coincidirá con la ponderación **1**, “Calidad media” con la clasificación **2** y, “Baja calidad” corresponderá **3**.

Cuadro 2. Explicación del sistema de asignación de valores usados para elaborar la matriz de decisión
 Table 2. Explanation of the value allocation system used to prepare the decision matrix

Parámetro	Valoración		
	3	2	1
Química del sedimento (Metales, HPA) Agua contenida en el sedimento (metales)	Uno o dos analitos de una categoría específica > ERM > 5 CCM	Uno o más analitos en una categoría dada ERL < concentración ≤ ERM CCM < concentración ≤ 5 CCM	Ningún analito mayor que ERL CCC < concentración ≤ CCM
Toxicidad (Punto final relacionado con el control negativo)	Reducción > 50%	10% < Reducción ≤ 50%	Reducción < 10%
Evaluación general	Efectos adversos significativos predichos por concentración química elevada, más de 50% de disminución en dos o más puntos finales toxicológicos	Efectos adversos potenciales predichos por concentración química elevada, disminución de más de 20% de dos o más puntos finales toxicológicos	Ningún efecto adverso predicho por: concentración química elevada, sin reducción en los puntos finales de las pruebas toxicológicas

RESULTADOS

En los estudios medioambientales, de forma común, el conjunto de magnitudes medidas muestran una dispersión o desviación grande respecto a la media. Ante esta heterogeneidad, el valor promedio no tiene méritos. No obstante, cuando los datos son homogéneos, la media aritmética es altamente significativa (Gutiérrez, 2012), por ello en este trabajo, solo los resultados homogéneos serán representados por la media y la desviación estándar.

La textura predominante en los sedimentos del ecosistema fue arenolimososa (Ests. 1, 3, 6, 7, 8, 10), con porcentajes comparables de arena y limo (Cuadro 3), situación similar presentó la textura limoarenosa (Ests. 4, 5), mientras que la textura arenosa se presentó en la zona más occidental (Ests. 9, 11, 12) y frente a Chiguana (Est. 2). Este conjunto caracteriza al ecosistema como predominantemente arenolimoso.

Cuadro 3. Composición textural, carbono orgánico y carbonatos (%) en los sedimentos del saco del golfo de Cariaco

Table 3. Textural composition, organic carbon and carbonates (%) in the sediments from the eastern region of the Gulf of Cariaco

Est.	Arena	Limo	Arcilla	Textura	Corg	Carbonatos
1	68.2	23.3	8.5	Arena limosa	1.3	3.0
2	85.5	8.7	5.8	Arena	1.2	2.7
3	50.2	46.0	3.8	Arena limosa	4.2	2.8
4	44.2	50.0	5.8	Limo arenoso	4.1	3.5
5	46.2	48.0	5.8	Limo arenoso	2.8	2.6
6	74.2	20.0	5.8	Arena limosa	1.3	0.7
7	49.0	44.0	7.0	Arena limosa	4.1	4.4
8	49.0	44.0	7.0	Arena limosa	4.7	3.9
9	90.2	6.0	3.8	Arena	0.5	0.7
10	56.2	39.3	4.5	Arena limosa	1.0	0.8
11	88.2	7.3	4.5	Arena	0.1	0.7
12	90.2	6.0	3.8	Arena	0.4	1.0

Directamente relacionado con limo ($r=0.86$, $P<0.05$), pero inverso a la arena ($r= -0.86$, $P<0.05$) se mostró el Corg., cuyas concentraciones variaron entre 0.1 y 4.7%. Las zonas más ricas fueron: centro del ecosistema (Est. 8), muelle de Cariaco (Est. 3), punta Cachipo (Est. 4) y San Rafael (Est. 7). En las restantes localidades, los contenidos fueron menores que 2.8%.

De manera similar a Corg., se acumuló CaCO_3 ($r=0.86$, $P<0.05$) en el oriente (Ests. 1-5), norte (Est. 7) y centro (Est. 8), con valores comprendidos entre 2.6% (Est. 5) y 4.4%, (Est.

7). En el resto del ecosistema varió entre 0.7% (Est. 11) y 0.9% (Est. 12). Además, dicho parámetro correlacionó con arena ($r= -0.70$, $P<0.05$), limo y arcilla ($r=0.66$, $P<0.05$).

Las concentraciones totales de Cd ($1.9\text{-}4.9 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($4\text{-}36 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($29\text{-}91 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn ($12\text{-}63 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($3\text{-}9 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni ($10\text{-}43 \mu\text{g g}^{-1}$) y Zn ($72\text{-}113 \mu\text{g g}^{-1}$) (Cuadro 4) en el sedimento mostraron mayor acumulación hacia el oriente (Ests. 1-3), costa norte (Ests. 4, 7) y centro (Est. 8) y sus menores contenido en la costa sur (Ests. 5, 6, 12), correlacionadas con Corg.

($r=0.51$, $P<0.05$), CaCO_3 ($0.57 < r < 0.89$, $P<0.05$), limo ($r < 0.63$, $P < 0.05$) y arcilla ($r < 0.64$, $P < 0.05$). También se encontró una significativa afinidad Mn-metal ($r > 0.50$, $P < 0.05$), Zn-metal ($r > 0.64$) y entre Cd, Cu, Ni y Pb ($r > 0.60$, $P < 0.05$).

En el agua extraída del sedimento, los únicos metales presentes fueron Pb y Cr. Pb con concentraciones comprendidas entre $32 \mu\text{g L}^{-1}$ (Est. 8) y $55 \mu\text{g L}^{-1}$ (Est. 9), $47 \pm 6 \mu\text{g L}^{-1}$. Cr entre $154 \mu\text{g L}^{-1}$ (Est. 11) y $237 \mu\text{g L}^{-1}$ (Est. 12), $191 \pm 27 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta distribución fue casi homogénea en el área. Cd no fue detectado, mientras que Cu, Ni y Zn mostraron valores por debajo del límite de detección.

En los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos de alta masa molar (HAPA) fueron los más abundantes, representados por fluoranteno, pireno y benzo[b] fluoranteno (Cuadro 4). Su sumatoria varió entre 23.4 ng g^{-1} (Est. 11, Rincón Hondo) y 72.8 ng g^{-1} (Est. 4, punta Cachipo), fuertemente influenciada por la concentración del fluoranteno ($22\text{-}71 \text{ ng g}^{-1}$); mientras que, la totalidad de las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de baja masa molar (HPAB), cuyos únicos representantes fueron naftaleno, antraceno y fenantreno, variaron entre 3.7 ng g^{-1} (Est. 12, Pericantar) y 17.3 ng g^{-1} (Est. 8, centro). La mayoría de los HAP se acumularon en muelle de

Cariaco (Est. 3), punta Cachipo (Est. 4), San Rafael (Est.7), Guacarapo (Est. 9) y centro-occidente (Est. 10), sin afinidad significativa con otros parámetros investigados (0.40 , $P < 0.05$).

No hubo mortalidad de los nauplios de *Artemia sp.*, después de su exposición a las diluciones del agua sustraída y del extracto orgánico del sedimento. Por otra parte, la lisis de los glóbulos rojos al estar en contacto con el agua extraída fue insignificante, menor que 2%.

DISCUSIÓN

En los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, la distribución del tamaño de grano es variable pero controlada, en particular, por la suspensión (Quintero *et al.* 2006). En las áreas más tranquilas, las arenas medias, finas y muy finas están presentes en proporciones comparables con los limos, provenientes de la materia orgánica descompuesta. Por ello, predominan los sedimentos arenolimosos, excepto en punta Cachipo y La Peña (limoarenosos) y en la costa norte (arenas medias bioclásticas).

Los porcentajes de carbono orgánico comprendido entre 0.3% y 4.7% indican una importante deposición orgánica natural, incrementada por descargas domésticas (Salazar, 1991). Desde otro punto de vista, Ferráz-Reyes (1987) explicó que el saco del golfo de Cariaco tiene una alta

productividad primaria. Al acumularse grandes cantidades de fitoplancton, la dinámica de las corrientes y la morfología de la zona proveen condiciones que favorecen la deposición de una cantidad considerable en el fondo marino, y provocan una importante acumulación de carbono orgánico.

Las concentraciones de los metales estuvieron por debajo de los patrones geoquímicos de la fracción limo-arcilla. Ello, aunado a su localización indican que la distribución de los metales está influenciada por la dinámica sedimentaria y el efecto de la contaminación es poco (Krupadam *et al.* 2006; Ahmad *et al.* 2009); es decir, los sedimentos son, *a priori*, materiales detríticos de las rocas sedimentarias de la Formación Frontado y de los aportes arrastrados, por los cursos de agua, desde la costa sur y oriente. De hecho, los sedimentos del área estudiada son residuos de la erosión de los suelos de la península de Araya y de los suelos húmicos aledaños al río Carinicuaó (Quintero *et al.* 2006). Particularmente, los metales presentan mayor concentración en la zona más oriental, por la influencia de la materia orgánica terrestre acarreada por el río. Esta materia es distribuida entre las partículas minerales amorfas del sedimento, las cuales actúan como sitios de enlace para contaminantes (Simpson *et al.* 2005).

En las áreas costeras es muy común encontrar abundantes cantidades

de Fe, Mn y Zn, procedentes de la corteza terrestre, que interactúan con otros metales, sin mostrar toxicidad (Rubio *et al.* 1995). Cuando ellos correlacionan significativamente con los demás metales es una fuerte evidencia que provienen de la misma fuente (García-Rico *et al.* 2004; Belzunce-Segarra *et al.* 2008). Por otro lado, MacDonald *et al.* (1991) resaltan que una certeza de la existencia de residuos antrópicos es la poca afinidad entre Zn y Mn con otros metales como Cu, Cd y Pb.

En toda el área de estudio, las concentraciones de Cd superaron al intervalo de efectos bajos (ERL), concentración por debajo de la cual, rara vez, ocurren efectos adversos (10%, Cuadro 4). Cu mostró este mismo comportamiento en tres cuartas partes del ecosistema y Ni solamente en la mitad. Empero, todas fueron inferiores al intervalo de efectos medios (ERM), valor representativo de concentraciones por encima de la cual puedan ocurrir efectos adversos (50%), ambos valores referenciales de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, 2019). No obstante, fueron similares a los contenidos informados en otras investigaciones (Martínez, 2002; 2016; Márquez *et al.* 2005; Velásquez, 2005). Esto indica que son sedimentos de calidad estándar, es decir, no provocan efectos biológicos adversos a los organismos, ni daños a la salud. Por ello, las fuentes adicionales de Cd, Ni, Cu, Pb pueden estar

relacionadas con la descomposición de fitoplancton depositado en el fondo, el lavado de suelos agrícolas, las descargas urbanas y la quema de vegetación y basura (García-Rico *et al.* 2004).

En cuanto a las concentraciones de los metales en el agua de mar, Pb superó $20 \mu\text{g L}^{-1}$, determinado por Nayar *et al.* (2004) en el estuario de Punggol (Singapur), pero fue menor que $106 \mu\text{g L}^{-1}$, informado por Man *et al.* (2004) en un humedal en Hong Kong, ambos ecosistemas catalogados como no contaminados. Por otro lado, fueron significativamente menores que $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$, concentración letal de Pb (LC50-96 h) para *Chasmagmathus granulata* en el estuario Bahía Blanca de Argentina (Ferrer *et al.* 2006) y menores que $140 \mu\text{g L}^{-1}$, que es el criterio de concentración máxima (CCM), no obstante, fueron mayores que el criterio de concentración continua (CCC, $8.1 \mu\text{g L}^{-1}$) referidos por la NOAA (Buchman, 2008). Este plomo parece ser dual, autóctono y antropogénico, inferido por su correlación con arena y Cr ($r=0.40$, $P < 0.05$), dado que sus mayores concentraciones están registradas cerca de centros poblados.

Las concentraciones de Cr en agua de mar fueron superiores a las informadas por Botté *et al.* (2007) para el estuario de Bahía Blanca en Argentina ($9.4 \mu\text{g L}^{-1}$) y por Man *et al.* (2004) en Mai Po ($121 \mu\text{g L}^{-1}$), ambientes impolutos; no obstante, estos resultados estuvieron entre 50 y $1\ 000$

$\mu\text{g L}^{-1}$, intervalo letal de Cr (LC50-96 h) para *Palaemonetes pugio* (Doughtie y Ranga, 1984). Además, fueron mucho menores que CCM ($1\ 100 \mu\text{g L}^{-1}$) y mayores que CCC ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) de las referencias de la NOAA (Buchman, 2008). Es probable que sus concentraciones estén relacionadas con las características mineralógicas de la zona, de hecho, el cromo total covarió significativamente con arena ($r=0.63$). Arauzo *et al.* (2003) señalan que, en aguas marinas, la movilización del Cr a la fase líquida está favorecida por la oxidación natural del mismo.

En el saco del golfo de Cariaco, los hidrocarburos aromáticos policíclicos de alta masa molar (HAPA) son dominantes, en especial el fluoranteno. Debido a su alta masa molar, son moléculas hidrofóbicas y lipofílicas, por lo tanto, son poco solubles en agua y es probable que se asienten en el fondo, donde se unen fuertemente a la materia orgánica (Sakari, 2012; Mahugija *et al.* 2017). Esta primacía junto a los índices fluoranteno/pireno mayor que 1 y fenantreno/antraceno menor que 10 certifican el origen pirogénico de los HAP, tal vez, derivados de la combustión de biomasa, emisiones vehiculares y lavados de las superficies de las carreteras (Men *et al.* 2009). Estos residuos asociados con partículas entran al aire y luego se redistribuyen en los diferentes compartimientos ambientales (aire, agua, suelo, sedimento), regidos por las propiedades de los

destinos y las condiciones meteorológicas (Kim *et al.* 2009; Mahugija *et al.* 2017). Otros factores pueden ser aguas residuales urbanas, emisiones de motores fuera de borda y descargas directas irresponsables de aceite de motor y gasolina (Terrado *et al.* 2010). Cabe resaltar que HAPA son considerados trazadores de vehículos a gasolina (Amador-Muñoz *et al.* 2010).

La concentración de los HAP, en el área de estudio, no superó ERL (Cuadro 4), es decir, no deben provocar efectos adversos en los recursos biológicos, ni en la salud humana. Su adsorción no estuvo influenciada por el contenido de carbono orgánico, ni por el carácter fino del sedimento (arenas medias, arenas finas y limo). Respecto a esto, algunos investigadores aseguran que su acumulación depende de la cantidad de aportes antrópicos y solamente ocurre en sitios muy contaminados, con más de 2 000 ng g⁻¹ (Men *et al.* 2009).

Como las pruebas de toxicidad con *Artemia sp.* no presentaron mortalidad de individuos y tampoco hubo evidencia de actividad hemolítica puede decirse que los sedimentos no son peligrosos para los recursos vivos (Chapman, 1996; Long *et al.* 2002).

Una vez compilados, evaluados y discutidos los resultados de la caracterización química sedimentaria

(metales, HAP) y los puntos finales de las pruebas toxicológicas, respecto al control negativo, fueron asignados los valores correspondientes, de acuerdo con los criterios seleccionados (Cuadro 2) y se completó la matriz tabular de decisión para la evaluación semicuantitativa (Cuadro 5), donde se observa que ninguna especie química estudiada excedió el criterio de calidad ERL y las pruebas toxicológicas estuvieron libres de daños o pérdidas; por tanto, califican con puntuación “1”; sin embargo, Cd, Cu y Ni, en los sedimentos, fueron categorizados con la puntuación “2”, porque presentaron contenidos entre ERL y ERM en 100%, 70% y 42% del área, respectivamente (Long *et al.* 2002; Simpson *et al.* 2005).

Como no ocurrieron efectos toxicológicos adversos, incluyendo agudos y crónicos, ni reducción en los criterios de valoración toxicológicos presagiados por concentraciones químicas elevadas de Cd, Ni y Cu, se puede conceder a los sedimentos valoración global “1” y catalogarse como de Alta Calidad Ambiental, es decir, son inofensivos para los recursos biológicos y la salud humana (Simpson *et al.* 2005).

Cuadro 4. Concentración total de los metales ($\mu\text{g g}^{-1}$) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP, ng g^{-1}) en el sedimento superficial del saco del golfo de Cariaco (Exactitud >90%, repetibilidad 2%)
 Table 4. Total concentration of metals ($\mu\text{g g}^{-1}$) and Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH, ng g^{-1}) in the surface sediment from the eastern region of the Gulf of Cariaco (Accuracy > 90%, repeatability 2%)

Estación	Metales											HAP				
	Cd	Cr	Cu	Mn	Pb	Ni	Zn	Naftaleno	Fenan- treno	Antra- ceno	HAPB	Fluoran- teno	Pireno	Benzol[fluoran- teno	HAPA	Σ HAP
1	3.8	23	90	47	8	24	87	1.4	5.7	0.2	7.3	31	1.6	0.2	32.8	40.1
2	4.5	34	72	44	5	24	85	1.7	1.1	1.6	4.4	43	1.3	0.6	44.9	49.3
3	3.4	24	60	61	7	19	87	2.2	5.9	0.8	8.9	57	2.1	0.4	59.6	68.5
4	4.8	35	91	56	9	23	104	2.4	7.3	2.0	11.7	67	2.1	1.1	70.2	81.9
5	3.7	25	57	54	4	18	76	2.5	2.9	0.2	5.6	26	1.7	0.3	28.0	33.6
6	2.8	13	33	32	4	12	42	1.1	6.3	0.3	7.7	50	2.9	0.3	53.2	60.9
7	4.9	29	47	49	9	20	113	0.4	12.0	0.6	13.0	49	3.1	1.0	53.1	66.1
8	4.4	36	84	63	9	43	104	3.5	11.8	2.0	17.3	33	1.3	0.6	34.9	52.2
9	3.3	10	36	19	4	28	59	1.6	4.4	1.3	7.3	71	1.6	0.2	72.8	80.1
10	3.2	10	62	28	4	14	50	1.6	11.8	0.6	14.0	56	1.6	0.5	58.1	72.1
11	3.1	13	33	12	3	10	32	3.5	6.2	0.5	10.2	22	1.2	0.2	23.4	33.4
12	1.9	4	29	19	4	15	54	0.8	2.7	0.2	3.7	43	1.5	0.2	44.7	48.4
Mínimo	1.9	4	29	12	3	10	32	0.4	1.1	0.2	3.7	22	1.2	0.2	23.4	33.6
Máximo	4.9	36	91	63	9	43	113	3.5	12.0	2.0	17.3	71	3.1	1.1	72.8	81.9
LD	0.30	0.05	1	1	0.3	0.2	11	0.04	0.01	0.001		0.002	0.05	0.001		
ERL	1.2	81	34		46.7	20.9	150	160	240	85.3	435.3	600	665	NA	NA	NA
ERM	9.6	218	270		218	51.6	410	2100	1500	1100	4700	5100	2600	NA	NA	NA

LD: límite de detección, NA: no accesible, ERL: Intervalo de efectos bajos, ERM: Intervalo de efectos medios (Long & Morgan, 1990; O'Connor & Paul 2004)

Cuadro 5. Matriz tabular de decisión para la evaluación semicuantitativa de los sedimentos del saco del golfo de Cariaco

Table 5. Tabular decision matrix for the semi-quantitative evaluation of the sediments from the eastern region of the Gulf of Cariaco

Estación	Química sedimentaria (metal-HAP)	Química agua	Supervivencia de <i>Artemia</i> (Agua - sedimento)	Actividad hemolítica	Calidad
1	2-1	1-1	1-1	1	Alta
2	2-1	1-1	1-1	1	Alta
3	2-1	1-1	1-1	1	Alta
4	2-1	1-1	1-1	1	Alta
5	2-1	1-1	1-1	1	Alta
6	2-1	1-1	1-1	1	Alta
7	2-1	1-1	1-1	1	Alta
8	2-1	1-1	1-1	1	Alta
9	2-1	1-1	1-1	1	Alta
10	2-1	1-1	1-1	1	Alta
11	2-1	1-1	1-1	1	Alta
12	2-1	1-1	1-1	1	Alta

CONCLUSIONES

Las concentraciones de los metales y las afinidades entre sí demuestran su procedencia litogénica regional, con muy poca influencia antrópica. De manera similar, la fuente más probable de los hidrocarburos aromáticos policíclicos es la combustión de biomasa y emisiones de vehículos a gasolina. Su presencia no superó criterios de peligrosidad predicha por concentración química elevada. Por lo tanto, los sedimentos del sector oriental del saco del golfo de Cariaco poseen calidad ecológica alta o buena, donde no hubo evidencias de ocurrencia de efectos

adversos, por lo tanto, no representan riesgos para los recursos biológicos, ni riesgos a la salud humana. Esto fue demostrado con los puntos finales negativos de las pruebas toxicológicas.

Este conocimiento de la condición ambiental del saco del golfo de Cariaco permitirá identificar posibles eventos derivadas del acumulo de sustancias químicas naturales y antrópicas que puedan arriesgar la salud del ecosistema y poder administrar el desarrollo económico sostenible de las comunidades costeras aledañas.

AGRADECIMIENTO

La autora agradece al Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO), al Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV-UDO), a los Departamentos de Química de la Universidad de Oriente (UDO) y Universidad Central de Venezuela (UCV) por el apoyo brindado para la realización de este estudio, y a los evaluadores de esta prestigiosa revista por la acuciosa revisión del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, A., Mushrifah, I. & Shuhaimi-Otham, M. (2009). Water quality and heavy metal concentrations in sediment of Sungai Kelatan, Kelatan, Malaysia: A baseline study. *Sains Malays*, 38(4), 435-442.
- Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Agapito-Nadales, M., Munive-Colín, Z., Hernández-Mena, L., ... & Guzmán-Rincón, J. (2010). Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of México City: seasonal behaviour and human exposure. *Atmos. Environ.*, 44(1), 122-130.
- Araujo, P. A., Shimizu, G., Borher, M. B. & Jardim, W. (2006). Avaliação da qualidade de sedimentos. En P. A. Zagatto & E. Bertorelli (Eds.), *Ecotoxicologia aquática* (pp. 293-326). Brasil.: RiMa Editora.
- Arauzo, M., Rivera, M., Valladolid, M., Noreña, C. & Cedenilla, O. (2003). Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del río Jarama. *Limnetica*, 22(3-4), 87-100.
- Banjoo, D. & Nelson, K. (2005). Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J. Chromatogr. A.*, 1066 (1-2), 9-18.
- Belzunce-Segarra, M., Prego, R., Wilson, M., Bacon, J. & Santos-Echeandía, J. (2008). Metal speciation in surface sediments of the Vigo Ria (NW Iberian Peninsula). *Sci. Mar.*, 72(1), 119-126.
- Bouyoucos, G. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses in soils. *Agronomy J.*, 54, 464-465.
- Botté, S., Freije, H. & Marcovecchio, J. (2007). Dissolved heavy metal (Cd, Pb, Cr, Ni) concentrations in surface water and porewater from Bahía Blanca estuary tidal flats. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 79(4), 415-421.
- Buchman, M. F. (2008). NOAA Screening Quick Reference Tables. <https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/SQUIRTs.pdf>
- Caraballo, L. (1982). El golfo de Cariaco. Parte II. Los sedimentos superficiales y su distribución por el fondo. Fuente de sedimentos. Análisis mineralógico. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 21(1-2), 37-65.
- Carballo, H. O., Arencibia, C. G., Concepción, J. & Isla, M. M. (2010). Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *RETEL*, 32, 33-69.
- Chapman, P. M. (1996). Presentation and interpretation of Sediment Quality Triad data. *Ecotoxicology*, 5, 327-394.
- Doughtie, D. & Ranga, K. (1984). Histopathological and ultrastructural changes in the antennal gland, midgut, hepatopancreas and gill of grass shrimp

- following exposure to hexavalent chromium. *Invertebr. Path.*, 43(1), 89-108.
- Ferráz-Reyes, E. (1987). Productividad primaria del Golfo de Cariaco. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente*, 26(1-2), 97-110.
- Ferrer, L., Andrade, S., Asteasuain, R. & Marcovecchio, J. (2006). Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ecotox. Environ. Saf.*, 65(2), 209-217.
- Fuentes, M. V. (2010). *Evaluación de la calidad de los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela*. (Tesis de doctorado no publicada). Universidad de Oriente, Venezuela.
- Fuentes, M. V., Rojas, L., Díaz A. & Martínez, G. (2010). Distribución de metales pesados en los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco, Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 58(Suppl. 3), 129-140.
- Fuentes, M. V., Daoukdouk S., Rojas, L., Escalona A. & Ramírez, A. (2012). Presencia y fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en los sedimentos superficiales del saco del Golfo de Cariaco. *Interciencia*, 37(2), 99-106.
- Fuentes-Hernández, M. V., Sanguinetti-Gamboa, O. A. & Rojas-Astudillo. L. L. (2019). Evaluación del riesgo ambiental de metales pesados en los sedimentos superficiales del saco del golfo de Cariaco. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 31(1), 101-114.
- García-Rico, L., Soto, M., Jara, M. & Gómez, A. (2004). Fracciones geoquímicas de Cd, Cu y Pb en sedimentos costeros superficiales de zonas ostrícolas del Estado de Sonora, México. *Rev. Intern. Contam. Ambient.*, 20(4), 159-167.
- Gaudette, H., Flight, W., Toner, L & Folger, D. (1974). An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J. Sed. Petrol.*, 44(1), 249-253.
- Gutiérrez, J. (2012). La variación y su significado. *Rev. Universidad Eafit*, 32(101), 87-96.
- INE. Instituto Nacional de Estadísticas. (2014). *XIV Censo de Población y Vivienda. Resultados por entidad federal y municipio*. Caracas, Venezuela.: Instituto Nacional de Estadísticas de la República Bolivariana de Venezuela. [http:// www.ine.gov.ve/documentos/ Demografia/Censo de Población y Vivienda/pdf/sucre.pdf](http://www.ine.gov.ve/documentos/Demografia/Censo de Población y Vivienda/pdf/sucre.pdf).
- Key, L., Boyle, P. & Jaspars, M. (2002). Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca, Cephalopoda). *Toxicon*, 40(6), 677-683.
- Khaled, A., Abdel-Halim, A., El-Sherif, Z. & Mohamed, L. (2017). Health risk assessment of some heavy metals in water and sedimental at Marsa-Matrouh, Mediterranean Sea, Egypt. *J. Environ. Prot.*, 8, 74-97.
- Kim, S., Lee, D, Shim, W., Yim, U. & Shing, Y. (2009). Interrelationship of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination in different environmental media. *Sensors*, 9(12), 9582-9602.
- Krupadam, R., Smith, P. & Wate, R. (2006). Geochemical fractionation of heavy metals in sediments of Tapi estuary. *Geoch. J.*, 40(5), 513-522.
- Long, E. R. & Morgan, L. G. (1990). *The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the National and Trends Program*. EE. UU.: National Oceanic and Atmospheric Administration (NOOA).
- Long, E. R., Dutch, M., Aasen, S., Welch, K., Hameedi, J., Magoon, S.... &

- Anderson, J. (2002). *Sediment quality in Pudget Sound Year 3-Southern Puget Sound*. EE. UU.: National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).
- MacDonald, D., MacDonald, M., O'Brien, M. & Gobeil, C. (1991). Accumulation of heavy metals (Pb, Zn, Cu, Pb), carbon and nitrogen in sediments from strait of Georgia, B. C. Canada. *Mar. Chem.*, 34(1-2), 109-135.
- Mahugija, J., Ahmed, K. & Makame, Y. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in coastal mangrove ecosystems of the Zanzibar archipelago. *WIO J. Mar. Sci.*, 16(1), 25-34.
- Man, K., Zheng, J., Leung, A., Lam, P., Hon-Wah, M. & Yen, F. (2004). Distribution and behavior of trace metals in the sediment and porewater of a tropical coastal wetland. *Sci. Tot. Environ.*, 32(7), 295-314.
- Márquez, A., Bonilla, J., Martínez, G., Aguilera, D. & González, A. (2005). Estudio geoquímico de los sedimentos superficiales del litoral nororiental del golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente*, 44(2), 89-103.
- Martínez, G. (2002). Metales pesados en los sedimentos superficiales del golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 41(1-2), 83-96.
- Martínez, G. (2016). *Calidad Ambiental de los sedimentos recientes del golfo de Cariaco*. Trabajo de ascenso no publicado, Universidad de Oriente, Venezuela.
- Men, B., He, M., Tan, L., Lin, C. & Quan, X. (2009). Distributions of polycyclic hydrocarbons in the Daliao river estuary of Liaodong, Bohai Sea (China). *Mar. Poll. Bull.*, 58(6), 818-826.
- Nayar, S., Goh, B. & Chou, L. (2004). Environmental impact of heavy metals from dredged and resuspended sediments on phytoplankton and bacteria assessed *in situ* mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 59(3), 349-369.
- NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration. (2019). *Screening Quick Reference Tables*. EE. UU.: Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration.
- O'Connor, T. P. & Paul, J. F. (2004). The Sediment Quality Guideline, ERL, is not a chemical concentration at the threshold of sediment toxicity. *Mar. Poll. Bull.*, 49(5-6), 383-385.
- Primo, E. & Carrasco, J. (1973). *Química Agrícola I. Suelos y fertilizantes*. España.: Editorial Alhambra, S. A.
- Quintero, A., Terejova, G., Vincent G., Padrón A. & Bonilla, J. (2002). Las corrientes marinas en el golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 48(2), 109-119.
- Quintero, A., Terejova, G. & Bonilla, J. (2005). Morfología costera del golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 44(2), 133-143.
- Quintero, A., Caraballo, L., Bonilla, J., Terejova, G. & Rivadula, R. (2006). Sedimentos marino-costeros del golfo de Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 45(2), 127-139.
- Rojas, L., Chang-Yen, I. & Bekele, I. (2005). Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 53(1), 33-40.
- Rubio, B., Nombelas, M., Vilas, F., Alejo, J., García-Gil, S., García-Gil, E. & Pazos, O. (1995). Distribución de metales pesados en sedimentos actuales de la parte interna de la ría de Pontevedra. *Thalassas*, 11, 35-45.
- Sakari, M. (2012). Depositional history of polycyclic aromatic hydrocarbons:

- reconstruction of petroleum pollution records in Peninsular Malaysia. In T. Puzym & A. Mostrag (Eds.), *Organic pollutants ten years after Stockholm Convention-environmental and analytical update* (pp. 135-165), UK.: Intech Open Access Publisher.
- Salazar, S. (1991). *Contaminación marina*. México.: Fondo de Publicaciones y Ediciones del Centro de Investigaciones de Quintana Roo.
- SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1995). (NMX-AA-110-SC-FI-1995). *Análisis de agua. Evaluación de toxicidad aguda con Artemia franciscana Kellogg (Crustacea - Anostraca)-Método de prueba*. México.: Dirección General de Normas.
- Shepard, F. (1954). Nomenclature based on sand-silt-clay ratio. *J. Sed. Petrol.* 24, 151-158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.1966.tb01598.x>
- Simpson, S., Batley, G., Chariton, A., Stauber, J., King, C., Chapman, J., ... & Maher, W. (2005). *Handbook for sediment quality assessment*. Australia: CSIRO.
- Swarnalatha, K. & Nair, A. (2017). Assessment of sediment quality of a tropical lake using sediment quality standards. *Lakes & Reservoirs*, 22(1), 65-73.
- Terrado, M., Barceló, D. & Tauler, R. (2010). Multivariate curve resolution of organic pollution patterns in Ebro River surface water-groundwater-sediment-soils system. *Anal. Chim. Acta*, 657(1), 19-27.
- Velásquez, A. (2005). *Distribución y comportamiento de los metales pesados Cd, Cu, Ni, Zn, Fe, Mn, Co, Cr y Pb en los sedimentos superficiales del sector oriental del golfo de Cariaco. Estado Sucre*. (Tesis Pregrado no publicada). Universidad de Oriente, Venezuela.

Anfípodos pelágicos (Amphilochea, Hyperiidea y Senticaudata) del Pacífico de Costa Rica: nuevos registros y una lista de especies actualizada

Pelagic amphipods (Amphilochea, Hyperiidea and Senticaudata) from the Pacific of Costa Rica: new records and an updated list of species

Marco Violante-Huerta^{1*}, Álvaro Morales-Ramírez² & Laura Sanvicente-Añorve³

RESUMEN

En Costa Rica, los estudios sobre zooplancton que aborden los anfípodos pelágicos son escasos, la lista de especies previa a este trabajo incluye solo 41 especies del suborden Hyperiidea. El objetivo de este estudio fue actualizar la lista de especies de anfípodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica y registrar especies previamente desconocidas en el país. En julio de 2012, se realizó el muestreo del zooplancton de aguas cercanas a la isla del Coco, Costa Rica, en 26 estaciones oceanográficas. Un total de 13 especies de anfípodos pelágicos de los subórdenes Amphilochea (1), Hyperiidea (11) y Senticaudata (1) fue identificado para aguas del Pacífico costarricense. Los nuevos registros incrementan el conocimiento de la riqueza de anfípodos pelágicos para el Pacífico de Costa Rica a 54 especies, lo que sugiere la necesidad de explorar más la diversidad de estos organismos en la región.

Palabras clave: isla del Coco, Domo de Costa Rica, Pacífico este tropical, *Stenopleura*, *Synopia*

ABSTRACT

Few studies of zooplankton have been carried out in Costa Rica that address pelagic amphipods; the species list prior to this work includes only 41 species from the suborder Hyperiidea. The aim of this paper was to update the species list of pelagic amphipods from the Pacific of Costa Rica, and record previously unknown species from the country. In July 2012, zooplankton sampling was carried out in the waters near Cocos Island, Costa Rica, at 26 oceanographic stations. A

- 1 Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C. P. 04510, Ciudad de México, México; marco_violante@hotmail.com, marco.violante@comunidad.unam.mx*
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2199-6711>
- 2 Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Ciudad de la Investigación, San Pedro, 11501-2060 San José, Costa Rica; alvaro.morales@ucr.ac.cr
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0883-5366>
- 3 Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, C. P. 04510, Ciudad de México, México; lesa@unam.mx
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-4564>

total of 13 pelagic amphipod species from the suborders Amphilochidea (1), Hyperiidia (11) and Senticaudata (1) were identified in the Pacific waters of Costa Rica. These new records increase the known total of pelagic amphipod species from the Pacific of Costa Rica to 54 species, which suggests a need to further explore the diversity of these organisms in the region.

Keywords: Cocos Island, Costa Rica Dome, eastern tropical Pacific, *Stenopleura*, *Synopia*

INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, son pocos los estudios que abordan la composición, distribución y abundancia de los anfípodos pelágicos presentes en sus aguas. Salmán-Palacios (1985) y Shih y Hendrycks (2003) fueron los primeros en analizar los anfípodos pelágicos de aguas del Pacífico costarricense, contribuyendo al conocimiento de este grupo del zooplancton en la nación. Posteriormente, en un esfuerzo por describir la biodiversidad marina del país, Gasca (2009a) realizó una compilación de los registros históricos de anfípodos hiperídeos del territorio, en la cual enlistó un total de 33 especies del infraorden Physocephalata.

Recientemente, Gasca y Morales-Ramírez (2012) analizaron la composición de los anfípodos hiperídeos alrededor de la isla del Coco, en aguas superficiales de 0-50 m de profundidad, y registraron 8 especies antes desconocidas para Costa Rica, para sumar un total de 41 especies de hiperídeos en la región costarricense. En su estudio, Gasca y Morales-Ramírez (2012) comentan sobre la necesidad de realizar más exploraciones que traten

la diversidad de anfípodos pelágicos de la región, ya que, en zonas cercanas, el número de especies presentes es alrededor de 150 taxones (Gasca, 2009b). Por lo tanto, el objetivo del estudio fue actualizar la lista de especies de anfípodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica, incluyendo nuevos registros de distribución de especies de estos organismos, de modo que se contribuya al conocimiento de la riqueza y diversidad de especies del Pacífico este tropical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de zooplancton fueron recolectadas durante la campaña oceanográfica UCR-UNA-COCO-VI, a bordo del B/I *Undersea Hunter*, del 7 al 14 de julio de 2012, como parte del proyecto “Interacción océano-atmósfera y la biodiversidad marina del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica”. El muestreo se realizó en 26 estaciones oceanográficas ordenadas en 3 transectos (160 mn de longitud), en dirección norte-sur, alrededor de la isla del Coco, Costa Rica (Fig. 1; Cuadro 1), por medio de arrastres verticales, con una red de mesozooplancton (49

cm de boca y 200 µm de apertura de malla), entre los 0 y 200 m de profundidad. El material recolectado se fijó en una solución formalina al 4%.

El material se revisó en laboratorio para la búsqueda de anfípodos; estos fueron separados, preservados en etanol al 70% y posteriormente

se identificaron, utilizando literatura especializada (Stebbing, 1888; Barnard, 1972; Barnard y Thomas, 1989; Vinogradov *et al.* 1996; Vinogradov, 1999; Hughes, 2009; Zeidler, 1990, 2003, 2004, 2016; Violante-Huerta *et al.* 2020). El material biológico se encuentra en el Centro de Investigación

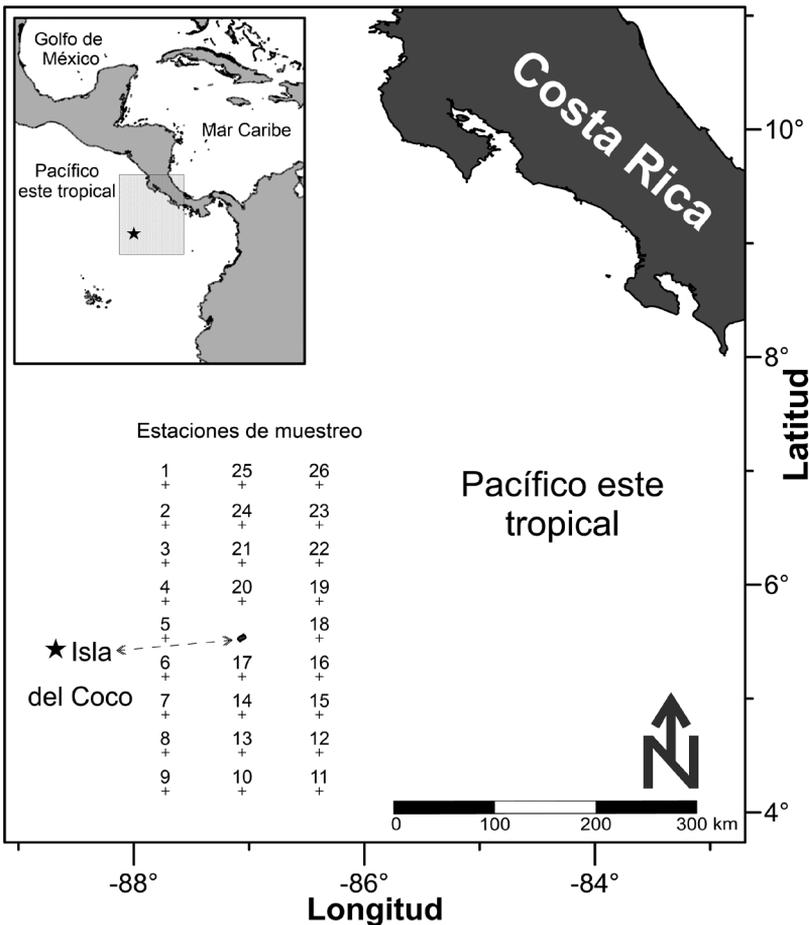


Fig. 1. Localización geográfica de las estaciones de muestreo alrededor del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica

Fig. 1. Geographical location of the sampling stations around National Park Cocos Island, Costa Rica

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo en el Pacífico de Costa Rica
Table 1. Geographical coordinates of sampling stations in the Pacific of Costa Rica

Estación	Longitud	Latitud	Estación	Longitud	Latitud
1	-87.725566	6.877316	14	-87.058874	4.858456
2	-87.725566	6.525199	15	-86.389879	4.858456
3	-87.725566	6.191748	16	-86.389879	5.192080
4	-87.725566	5.857094	17	-87.058874	5.192080
5	-87.725566	5.530950	18	-86.389879	5.530950
6	-87.725566	5.192080	19	-86.389879	5.857094
7	-87.725566	4.858456	20	-87.058874	5.857094
8	-87.725566	4.525731	21	-87.058874	6.191748
9	-87.725566	4.188336	22	-86.389879	6.191748
10	-87.058874	4.188336	23	-86.389879	6.525199
11	-86.389879	4.188336	24	-87.058874	6.525199
12	-86.389879	4.525731	25	-87.058874	6.877316
13	-87.058874	4.525731	26	-86.389879	6.877316

en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) de la Universidad de Costa Rica y será catalogado por el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 100 anfípodos pelágicos pertenecientes a 8 géneros y 13 especies fueron observados por primera vez en las aguas oceánicas del Pacífico costarricense. Con estos nuevos registros, la lista actualizada de especies de anfípodos pelágicos del territorio mencionado asciende a 54: 1 del suborden Amphilochidea, 52 de Hypeiriidea y 1 de Senticaudata (Cuadro 2).

Cuadro 2. Lista actualizada de los anfípodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica, incluye profundidad y registros previos
 Table 2. Updated list of the pelagic amphipods from the Pacific of Costa Rica, includes depth and previous records

Taxón (referencia ^{a)})	Profundidad (m)	Taxón (referencia ^{a)})	Profundidad (m)
Suborden Amphilochidea		Familia Lycaeopsidae	
Familia Synopiidae		<i>Lycaeopsis themistoides</i> ⁴	0-50
<i>Synopia</i> sp. ⁶	0-200	<i>Lycaeopsis zamboangae</i> ⁴	0-50
Suborden Hyperiidea		Familia Oxycephalidae	
Familia Lestrigonidae		<i>Cranocephalus scleroticus</i> ³	superficie
<i>Bougisia ornata</i> ¹	0-450	<i>Glossocephalus milneedwardsi</i> ³	superficie
<i>Hyperietta vosseleri</i> ^{3,4}	0-50	<i>Leptocotis tenuirostris</i> ^{1,3}	0-450
<i>Hyperioides sibaginis</i> ^{3,4}	0-50	<i>Oxycephalus clausi</i> ^{3,4}	0-50
<i>Hyperoche mediterranea</i> ⁵	superficie	<i>Oxycephalus piscator</i> ³	superficie
<i>Hyperoche medusarum</i> ⁵	superficie	<i>Rhabdosoma armatum</i> ³	superficie
<i>Lestrigonus bengalensis</i> ^{3,4}	0-50	<i>Rhabdosoma brevicaudatum</i> ⁶	0-200
<i>Lestrigonus latissimus</i> ³	superficie	<i>Rhabdosoma minor</i> ⁶	0-200
<i>Lestrigonus macrophthalmus</i> ⁴	0-50	<i>Rhabdosoma whitei</i> ⁶	0-200
<i>Lestrigonus schizogeneios</i> ^{3,4}	0-50	Familia Parascelidae	
<i>Lestrigonus shoemakeri</i> ^{3,4}	0-50	<i>Parascelus edwardsi</i> ^{3,4}	0-50
<i>Phronimopsis spinifera</i> ^{3,4}	0-50	Familia Platyscelidae	
<i>Themistella fusca</i> ¹	0-450	<i>Platyscelus armatus</i> ⁶	0-200
Familia Phronimidae	0-50	<i>Tetrathyrus forcipatus</i> ^{4,5}	0-50
<i>Phronima bowmani</i> ⁴	0-450	Familia Paraphronimidae	
<i>Phronima sedentaria</i> ¹	0-450	<i>Paraphronima crassipes</i> ⁶	0-200
<i>Phronimella elongata</i> ¹		<i>Paraphronima gracilis</i> ^{1,4}	0-450
Familia Phrosinidae	0-450	Familia Vibiliidae	
<i>Anchylomera blossevillei</i> ¹	0-450	<i>Vibilia armata</i> ²	0-1 756
<i>Phrosina semilunata</i> ^{1,4}	0-450	<i>Vibilia australis</i> ²	0-1 300
<i>Primno brevidens</i> ^{1,4}	0-200	<i>Vibilia borealis</i> ⁶	0-200
<i>Primno latreillei</i> ⁶		<i>Vibilia chuni</i> ⁴	0-50
Familia Amphithyridae	0-50	<i>Vibilia cultripes</i> ⁶	0-200
<i>Amphithyrus sculpturatus</i> ^{3,4}		<i>Vibilia gibbosa</i> ⁶	0-200
Familia Brachyscelidae	0-50	<i>Vibilia pyripes</i> ²	0-250
<i>Brachyscelus crusculum</i> ⁴	superficie	Familia Scinidae	
<i>Brachyscelus rapacoides</i> ³		<i>Scina borealis</i> ⁶	0-200
		<i>Scina excisa</i> ⁶	0-200

Taxón (referencia ^a)	Profundidad (m)	Taxón (referencia ^a)	Profundidad (m)
Familia Eupronoidea <i>Eupronoe armata</i> ⁴ <i>Parapronoe parva</i> ^{1,3}	0-50 0-450	Suborden Senticaudata Familia Calliopiidae <i>Stenopleura atlantica</i> ⁶	0-200
Familia Lycaeidae <i>Lycaea pachypoda</i> ⁵ <i>Lycaea vincentii</i> ³ <i>Simorhynchotus antennarius</i> ^{3,4}	superficie superficie 0-50		

^a Referencias: ¹ Salmán-Palacios (1985); ² Shih y Hendrycks (2003); ³ Gasca (2009a); ⁴ Gasca y Morales-Ramírez (2012); ⁵ Gasca (com. pers. junio, 2019); ⁶ este estudio.

Orden AMPHIPODA Latreille, 1816
 Suborden AMPHILOCHIDEA Boeck, 1871

Familia SYNOPIIDAE Dana, 1853
 Género *Synopia* Dana, 1852
Synopia sp.
 (Fig. 2A)

Diagnóstico. Cabeza con rostro protuberante y redondeado, ojos y ojos accesorios presentes. Segmentos 1-2 de la antena 1 simples. Gnátópodos 1-2 ligeramente subquelados, simples y pequeños. Pleonitos 1-3 con márgenes lisos. Urópodo 3 más largo que los urópodos 1-2. Telson pequeño con una hendidura. Fuentes: [Barnard \(1972\)](#), [Barnard y Thomas \(1989\)](#), [Hughes \(2009\)](#).

Material examinado. 4 individuos: 1 ind, est 6; 1 ind, est 7; 1 ind, est 11; 1 ind, est 17.

Distribución global. Atlántico norte: isla Guadalupe, Venezuela, Belice, Caribe mexicano, golfo de México, Bermudas, EE. UU. Atlántico sur: Brasil, golfo de Guinea. Pacífico norte: Japón, Alaska, Kiribati. Pacífico

sur: Australia, Papúa Nueva Guinea, Nueva Caledonia, Polinesia Francesa, Ecuador. Océano Índico: Madagascar, mar Rojo, Indonesia, Australia ([Shoemaker, 1945](#); [Ledoyer, 1986](#); [Hughes, 2009](#); [GBIF.org, 2020](#); [OBIS, 2020](#); [Senna et al. 2020](#)).

Discusión taxonómica. El material observado coincide con las características diagnósticas del género *Synopia*, sin embargo, la determinación en el nivel de especie no fue realizada en el presente trabajo, por lo que se considera solo el registro del género, por primera vez, para el Pacífico costarricense. Este género es reconocido por mostrar gran variabilidad morfológica, principalmente en la especie tipo *S. ultramarina* ([Shoemaker, 1945](#); [Ledoyer, 1986](#); [Barnard y Thomas, 1989](#); [Hughes, 2009](#)).

Comentarios generales. El género *Synopia* ha sido registrado mayormente en aguas de la zona epipelágica de los océanos (0-200 m de profundidad) o en asociación con suelos blandos y su distribución es circumtropical ([Shoemaker, 1945](#);

Barnard, 1972; Vinogradov, 1999; Sena *et al.* 2020). En el Pacífico este tropical, se han registrado 3 especies del género: *S. angustiformes*, *S. scheeleana* y, aparentemente, *S. ultramarina* (Barnard, 1972; Barnard y Karaman, 1991; GBIF.org, 2020).

Suborden HYPERIIDEA H. Milne Edwards, 1830
Familia PHROSINIDAE Dana, 1852
Género *Primno* Guérin-Méneville, 1836
Primno latreillei Stebbing, 1888 (Fig. 2B)

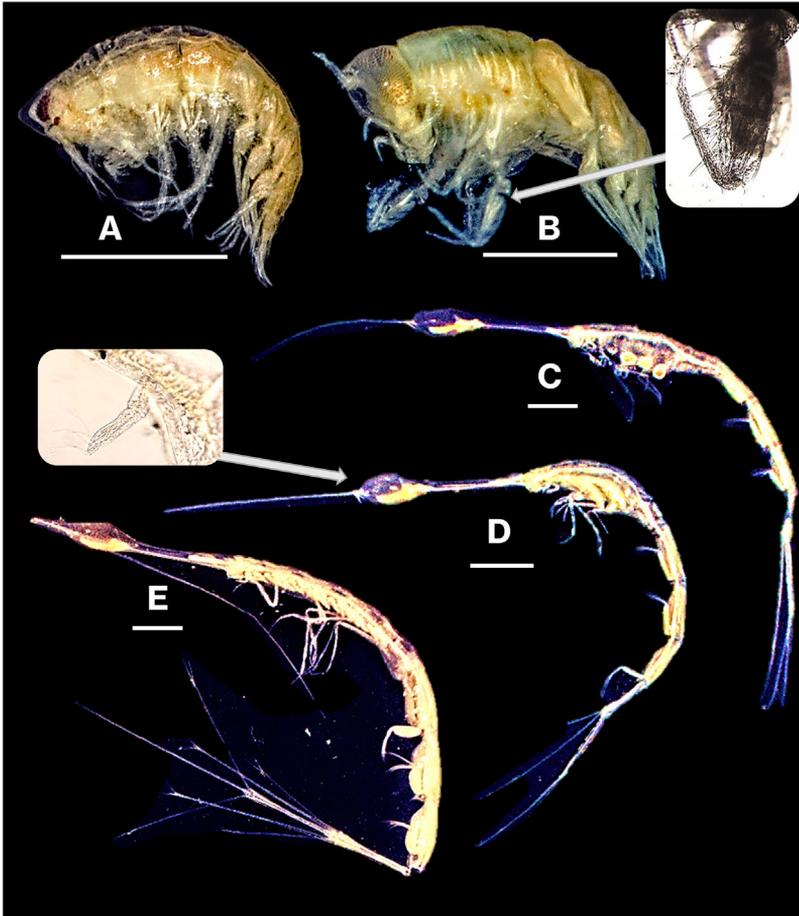


Fig. 2. Nuevos registros de anfipodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica. A, *Synopia* sp.; B, *Primno latreillei*, que muestra el pereiópodo 5; C, *Rhabdosoma brevicaudatum*; D, *R. minor*, que presenta la antena 1 dividida en 2 segmentos; E, *R. whitei*. Barras de escala: 0.5 mm

Fig. 2. New records of pelagic amphipods from the Pacific of Costa Rica. A, *Synopia* sp.; B, *Primno latreillei*, showing the pereopod 5; C, *Rhabdosoma brevicaudatum*; D, *R. minor*, presenting the antenna 1 divided in 2 segments; E, *R. whitei*. Scale bars: 0.5 mm

Diagnóstico. Cuerpo robusto, especialmente el pereión. Pereiópodo 5 con dientes largos en el margen anterior del carpo, la longitud de estos similar al ancho del carpo. Adicionalmente, el margen proximal anterior del carpo del pereiópodo 5 con un diente largo. Pereiópodo 7 con el basis 1.5x más largo que la longitud de los demás segmentos combinados. Fuentes: Vinogradov *et al.* (1996), Vinogradov (1999), Zeidler (2004).

Material examinado. 33 individuos: 1 ind, est 4; 12 ind, est 6; 3 ind, est 7; 3 ind, est 10; 1 ind, est 11; 2 ind, est 12; 1 ind, est 15; 1 ind, est 16; 1 ind, est 17; 3 ind, est 18; 1 ind, est 19; 2 ind, est 20; 2 ind, est 21.

Distribución global. Atlántico norte: Guyana, Caribe mexicano, golfo de México, mar de Sargazo, EE. UU., mar Mediterráneo. Atlántico sur: golfo de Guinea. Pacífico norte: China, giro central de Pacífico norte, México, Colombia. Pacífico sur: Australia, mar de Tasmania, Perú. Océano Índico: mar Rojo (Shulenberg, 1978; Vinogradov, 1991, 1999; Vinogradov *et al.* 1996; Zeidler, 2004; Gasca, 2009b, 2009c; Valencia *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie se distingue del resto de las del género *Primno* por presentar dientes largos (tan largos como el ancho del campo) en el margen anterior del carpo del pereiópodo 5; además, tiene un diente largo proximal. Algunos

expertos sugieren que *P. latreillei* es una especie sinónima de *P. johnsoni*, debido a que la diferencia de la longitud del basis del pereiópodo 7 podría deberse al desarrollo ontogénico de la especie (Zeidler, 2004).

Comentarios generales. Esta especie fue la más abundante y frecuente en el área de estudio, similar a lo registrado por Valencia *et al.* (2013) para aguas de Colombia. Este nuevo registro representa una ampliación del rango de distribución geográfica para *P. latreillei* de aprox. 800 km, considerando el registro más cercano por Valencia *et al.* (2013) en Colombia. El intervalo de distribución vertical registrada para *P. latreillei* es muy amplio, entre 0 y 1 000 m de profundidad (Vinogradov, 1999).

Familia **OXYCEPHALIDAE** Bate,
1862

Género *Rhabdosoma* White, 1847
Rhabdosoma brevicaudatum Stebbing, 1888
(Fig. 2C)

Diagnóstico. Cuerpo extremadamente delgado y largo, con el rostro muy largo, puntiagudo y frágil. Antena 1 consiste en un segmento basal, el callinóforo y un segmento adicional pequeño. Pleón más largo que el pereión. Telson con la punta redondeada, su longitud no alcanza el límite del urópodo 2. Fuentes: Vinogradov *et al.* (1996), Vinogradov (1999), Zeidler (2016).

Material examinado. 1 individuo, est 6.

Distribución global. Atlántico norte: Venezuela, mar de Sargazo, Bermudas, mar Mediterráneo, islas Canarias, Guinea-Bissau. Atlántico sur: Sudáfrica. Pacífico norte: Japón, México, Colombia. Pacífico sur: Australia, Perú. Océano Índico: este de Australia (Thurston, 1976a; Vinogradov, 1991, 1999; Vinogradov *et al.* 1996; Valencia *et al.* 2013; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie se distingue de *R. armatum* y *R. whitei* porque presenta la punta del telson redondeada y su longitud no alcanza la del urópodo 2 (Zeidler, 2016). La longitud del telson en *R. brevicaudatum* tiene variaciones que podrían confundirse con *R. minor*; esto ha hecho sospechar sobre la posible sinonimia entre ambas especies (Vinogradov *et al.* 1996).

Comentarios generales. *Rhabdosoma brevicaudatum* prefiere habitar aguas superficiales entre 0 y 50 de profundidad (Thurston, 1976a; Vinogradov, 1999). La distribución geográfica de *R. brevicaudatum* se amplía aprox. 800 km en el Pacífico este, considerando el registro más cercano en Colombia (Valencia *et al.* 2013).

Rhabdosoma minor Fage, 1954
(Fig. 2D)

Diagnóstico. Cuerpo extremadamente delgado y largo, con el rostro muy largo y puntiagudo. Antena 1 dividida en 2 segmentos: la base y el callinóforo. Pleón más largo que

el pereión. Telson con el margen distal redondo, que alcanza la punta del urópodo 2. Fuentes: Vinogradov *et al.* (1996), Zeidler (2016).

Material examinado. 8 individuos: 1 ind, est 3; 6 ind, est 6; 1 ind, est 12.

Distribución global. Atlántico norte: Caribe mexicano, mar de Labrador, giro tropical del Atlántico norte entre 12-17° N y 32-36° W, cerca de islas Canarias, golfo de Guinea. Atlántico sur: giro del Atlántico sur entre 11-30° S y 25-27° W, Angola, Sudáfrica. Pacífico norte: China, 0.15° N y 106.66° W, México, Colombia. Pacífico sur: islas Salomón, Perú. Océano Índico: Madagascar, Mozambique (Dick, 1967; Vinogradov, 1991; Gasca, 2009c; Valencia *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; BurrIDGE *et al.* 2017; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie es muy similar a *R. brevicaudatum* por la forma redondeada de la punta del telson, pero se distinguen principalmente porque en *R. minor* la longitud del telson sí alcanza la del urópodo 2 (Zeidler, 2016), a diferencia de *R. brevicaudatum*, en el cual la longitud del telson es claramente menor a la del urópodo 2. Además, la antena 1 de *R. minor* únicamente está dividida en 2 segmentos (base y callinóforo), mientras que *R. brevicaudatum* tiene 3.

Comentarios generales. La distribución vertical de esta especie alcanza los 300 m de profundidad y la

geográfica es circumtropical (Vinogradov, 1999). *Rhabdosoma minor* presentó una amplitud en su distribución de aprox. 800 km en el Pacífico este, ya que el registro más cercano fue en Colombia (Valencia *et al.* 2013).

Rhabdosoma whitei Bate, 1862

(Fig. 2E)

Diagnóstico. Cuerpo extremadamente delgado y largo, con el rostro muy largo y puntiagudo. Antena 1 dividida en 2 segmentos: la base y el callinóforo. Pereiópodo 1 con el proceso carpal simple, sin dientes. Pleón ligeramente más largo que el pereión. Urópodos 2-3 con los exópodos bien desarrollados. Telson con el margen distal puntiagudo, más largo que el urópodo 2. Fuentes: Vinogradov *et al.* (1996), Zeidler (2016).

Material examinado. 1 individuo, est 15.

Distribución global. Atlántico norte: Venezuela, Caribe mexicano, golfo de México, EE. UU., islas Canarias, golfo de Guinea (Senegal-Gabón). Atlántico sur: Uruguay, Brasil, Sudáfrica, aguas entre Sudamérica y África en 8.2° S y 18° W. Pacífico norte: China, México, Colombia. Pacífico sur: Australia, Perú. Océano Índico: Sudáfrica, Mozambique, Madagascar, Indonesia (Dick, 1967; Vinogradov, 1991; Gasca, 2009b, 2009c; Valencia *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica.

Esta especie es la más cercana

morfológicamente a *R. armatum*, previamente registrada en aguas costarricenses; ambas presentan la punta del telson aguda y su longitud es mayor a la del urópodo 2, sin embargo, en *R. whitei* los exópodos de los urópodos 2-3 están bien desarrollados, mientras que en *R. armatum* son muy pequeños (Zeidler, 2016).

Comentarios generales. La especie prefiere habitar en aguas epipelágicas (Vinogradov, 1999). Por otro lado, Vinogradov *et al.* (1996) sugieren que *R. whitei* también podría habitar aguas profundas por debajo de los 200 m de profundidad. El registro geográfico más cercano a la isla del Coco se localizó a aprox. 800 km al este, en Colombia, donde *R. whitei* mostró baja abundancia y frecuencia (Valencia *et al.* 2013), similar a lo observado en este estudio.

Familia **PLATYSCCELIDAE** Bate,
1862

Género *Platyscelus* Spence Bate, 1861

Platyscelus armatus (Claus, 1879)

(Fig. 3A)

Diagnóstico. Cuerpo ancho y redondeado, con todos los somitas del pereión y pleón convexos. El propodio del gnatópodo 1 con el margen anterior liso. Coxa del pereiópodo 5 con un proceso espiniforme largo proyectado lateralmente. Coxas 5-6 más largas que el resto. Segmento basal del pereiópodo 6 con una fisura pequeña, tan larga como la mitad de la longitud del mero. Fuentes: Vinogradov *et al.*

(1996), Vinogradov (1999), Zeidler (2016).

Material examinado. 23 individuos: 7 ind, est 6; 2 ind, est 8; 3 ind, est 10; 7 ind, est 11; 3 ind, est 12; 1 ind, est 13.

Distribución global. Atlántico norte: Venezuela, golfo de México, al norte de las islas Azores, golfo de Guinea-Liberia. Atlántico sur: Brasil, Angola, Namibia, Sudáfrica. Pacífico norte: Hawái, golfo de California, México. Pacífico sur: Australia, Nueva Caledonia, Nueva Zelanda, Indonesia-Estrecho de Macasar, Perú. Océano Índico: Tanzania (Vinogradov, 1991; Vinogradov *et al.* 1996; Violante-Huerta, 2019; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. *Platyscelus armatus* es fácilmente identificada por la presencia de un proceso espiniforme en la coxa del pereiópodo 5 (Zeidler, 2016). En vista dorsal, la especie muestra un par de espinas laterales que no se encuentran en el resto de las especies del género *Platyscelus*.

Comentarios generales. *Platyscelus armatus* ha sido registrada mayormente en aguas superficiales de los océanos, pero también se encuentra en las de la zona mesopelágica hasta los 800 m de profundidad (Vinogradov *et al.* 1996; Vinogradov, 1999). En el Pacífico este, la distribución geográfica de *P. armatus* se extiende al norte de México y al sur de Perú (Vinogradov, 1991; GBIF.org, 2020), lo que

representa una amplitud en su rango de distribución de más de 2 600 km hacia el sur y al norte.

Familia **PARAPHRONIMIDAE**

Bovallius, 1887

Género *Paraphronima* Claus, 1879

Paraphronima crassipes Claus, 1879

(Fig. 3B)

Diagnóstico. Cabeza grande con forma de cubo, con los ojos cubriendo gran cantidad de su superficie. Pereiópodo 7 ligeramente más corto que el anterior. Margen ventral de la placa epimeral del pleonito 1 claramente redondo y perpendicular al eje del cuerpo. Fuentes: Vinogradov *et al.* (1996), Zeidler (2003).

Material examinado. 6 individuos: 1 ind, est 4; 2 ind, est 6; 3 ind, est 7.

Distribución global. Atlántico norte: Venezuela, Caribe mexicano, golfo de México, EE. UU., Islas Turcas y Calcos, Bermudas, aguas entre 23.5-36.1° N y 26-39.46° W, mar Mediterráneo, Guinea. Atlántico sur: 2.33° S y 12.75° W, Angola, Namibia, Sudáfrica. Pacífico norte: Japón, mar de Bering, EE. UU., México, Colombia. Pacífico sur: Nueva Zelanda, Australia, Perú. Océano Índico: Sudáfrica, Mozambique, Madagascar, 12.07° S y 70.03° E, zona sur entre 41.8-45.88° S y 84.55-110° E (Vinogradov, 1991; Vinogradov *et al.* 1996; Gasca, 2009b, 2009c; Valencia *et al.* 2013; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

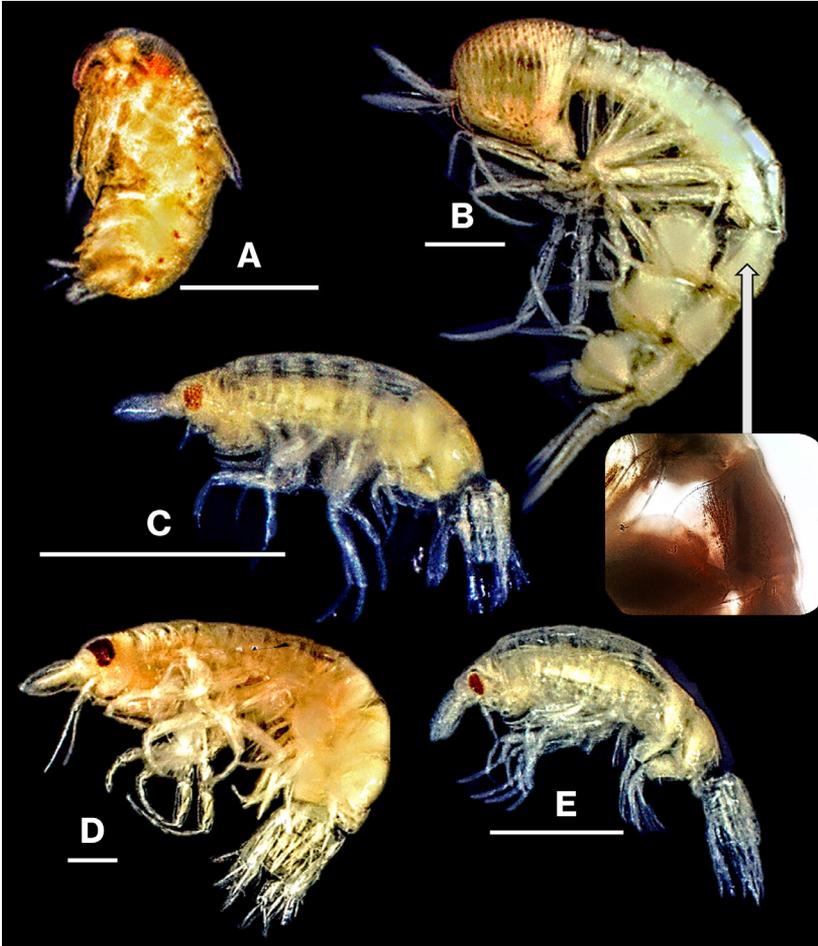


Fig. 3. Nuevos registros de anfípodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica. A, *Platyscelus armatus*; B, *Paraphronima crassipes*, que muestra la placa epimeral 1 redonda y perpendicular al eje del cuerpo; C, *Vibilia borealis*; D, *V. cultripes*; E, *V. gibbosa*. Barras de escala: 0.5 mm

Fig. 3. New records of pelagic amphipods from the Pacific of Costa Rica. A, *Platyscelus armatus*; B, *Paraphronima crassipes*, showing the epimeral plate 1, rounded and perpendicular to body axis; C, *Vibilia borealis*; D, *V. cultripes*; E, *V. gibbosa*. Scale bars: 0.5 mm

Discusión taxonómica. Esta especie se distingue de *P. gracilis* por la forma del margen inferior de la placa epimeral del primer pleonito, principalmente. En *P. crassipes*, el

somita tiene forma redondeada y está direccionada perpendicular al eje del cuerpo, mientras que para *P. gracilis*, la placa epimeral forma un ángulo agudo con respecto al eje del cuerpo

(Zeidler, 2003). Además, el preiópodo 6 es mucho más largo que el 7 en *P. gracilis*, a diferencia de *P. crassipes*, en el cual ambos pereiópodos son más cercanos en longitud (Zeidler, 2003), como se observó en los ejemplares de este estudio.

Comentarios generales. La especie se ha reportado en aguas epi- y mesopelágicas hasta los 720 m de profundidad (Vinogradov, 1999), con mayor frecuencia y abundancia durante el día en aguas superficiales (Thurston, 1976a). El registro geográfico más cercano en el Pacífico este para *P. crassipes* fue en Colombia (Valencia et al. 2013), lo que representa una amplitud del rango de distribución de aprox. 800 km en el Pacífico este.

Familia **VIBILIIDAE** Dana, 1852
Género *Vibilia* H. Milne Edwards,
1830

Vibilia borealis Bate & Westwood,
1868

(Fig. 3C)

Diagnóstico. Cuerpo robusto. Ojos ovalados. Antena 1 con el flagelo ligeramente más ancho que el pedúnculo, el margen distal redondo. Dáctilo del pereiópodo 3-4 delgado, más de 0.2x del largo del propodio. Pereiópodo 7 con la base más corta que la longitud del resto de los segmentos combinados. Márgenes postero-laterales del último urosomita más o menos iguales que el margen distal

(sin proyecciones). Urópodo 2 más corto que el urópodo 3. Telson redondo. Fuentes: Vinogradov et al. (1996), Zeidler (2003).

Material examinado. 2 individuos: 1 ind, est 12; 1 ind, est 14.

Distribución global. Atlántico norte: México, Irlanda, Noruega, España, Portugal, Marruecos. Atlántico sur: 4.0° S y 8.25° E. Pacífico norte: México, entre 33.13-33.37° N y 118.17-118.52° W. Pacífico sur: Nueva Zelanda, islas Molucas, mar de Sulú, Perú (Vinogradov, 1991; Vinogradov et al. 1996; Shih & Hendrycks, 2003; Zeidler, 2003; Gasca, 2009b; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie se asemeja más a *V. jeangerardi* por el dáctilo corto de los pereiópodos 5-6 (0.2x la longitud del propodio), sin embargo, *V. borealis* tiene la primera antena más grande, el dáctilo de los pereiópodos 3-4 más largo y delgado, y el telson más triangular que *V. jeangerardi* (Zeidler, 2003).

Comentarios generales. Esta especie prefiere habitar en aguas frías, pero también se ha recolectado en zonas tropicales de los océanos Atlántico y Pacífico. Particularmente, en el Pacífico este, *V. borealis* fue registrada al norte de México (Gasca, 2009b) y al sur de Perú (Vinogradov, 1991), lo que representa una amplitud en su distribución geográfica de aprox. 2 600 km al sur y al norte del Pacífico americano.

Vibilia cultripes Vosseler, 1901
(Fig. 3D)

Diagnóstico. Cuerpo ancho. Ojos ovalados. El flagelo de la antena 1 es ovalado y con el margen distal redondo. Pereiópodo 7 con procesos bulbosos en el margen anterodistal del carpo y propodio, dáctilo lanceolado. Márgenes postero-laterales del último urosomita proyectados junto al pedúnculo del urópodo 3, ligeramente más largos que el margen distal. Urópodo 3 con el pedúnculo tan largo como el endópodo. Telson redondo. Fuentes: [Vinogradov et al. \(1996\)](#), [Zeidler \(2003\)](#).

Material examinado. 1 individuo, est 25.

Distribución global. Atlántico norte: Bermudas, EE. UU., islas Azores, España, Portugal, islas Canarias, mar Mediterráneo, Cabo Verde, Sierra Leona. Atlántico sur: Guinea Ecuatorial, Namibia, 13.0° S y 21.6° W, 35.23° S y 6.81° E. Pacífico norte: mar de Japón, EE. UU., golfo de California, México, entre 11-34° N y 107-119° W. Pacífico sur: Australia, Perú. Océano Índico ecuatorial ([Vinogradov, 1991, 1999](#); [Vinogradov et al. 1996](#); [Shih & Hendrycks, 2003](#); [Zeidler, 2003](#); [Gasca, 2009b](#); [GBIF.org, 2020](#); [OBIS, 2020](#)).

Discusión taxonómica. Esta especie se asemeja morfológicamente a *V. longicarpus*, no obstante, en *V. cultripes*, el endópodo del urópodo 3 tiene 2 dientes terminales, ausentes en *V. longicarpus* ([Zeidler, 2003](#)). Además,

en *V. cultripes* se distinguen claramente los procesos bulbosos grandes del margen anterodistal del carpo y propodio del pereiópodo 7, mientras que en *V. longicarpus* los procesos son muy pequeños ([Zeidler, 2003](#)).

Comentarios generales. *Vibilia cultripes* prefiere habitar aguas entre 0 y 300 m de profundidad, presente en baja abundancia ([Vinogradov, 1999](#), [Zeidler, 2003](#)). La distribución de *V. cultripes* en el Pacífico este se amplía aprox. 2 600 km desde el sur de Perú ([Vinogradov, 1991](#)) y desde el norte de México ([Gasca, 2009b](#)).

Vibilia gibbosa Bovallius, 1887
(Fig. 3E)

Diagnóstico. Cuerpo robusto. Ojos ovalados. Antena 1 tan larga como el primer somita del pereión, con el flagelo más ancho que el pedúnculo y el margen distal redondeado. Pereiópodos 5-6 con el dáctilo más largo que 0.3x de la longitud del propodio. Pereiópodo 7 con la base más corta que la longitud del resto de los segmentos combinados. Márgenes postero-laterales del último urosomita más o menos iguales que el margen distal (sin proyecciones). Urópodo 2 más corto que el urópodo 3. Telson redondo. Fuentes: [Vinogradov et al. \(1996\)](#), [Zeidler \(2003\)](#).

Material examinado. 2 individuos: 1 ind, est 12; 1 ind, est 20.

Distribución global. Atlántico norte: Caribe mexicano, golfo de México, islas Turcas y Caicos, mar Mediterráneo. Atlántico sur: 0-20° S. Pacífico

norte: China, Japón, EE. UU., México. Pacífico sur: Perú (Vinogradov, 1991, 1999; Vinogradov *et al.* 1996; Zeidler, 2003; Gasca, 2009b; Zhang *et al.* 2014; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie es fácilmente diferenciada del resto de las del género *Vibilia* por el flagelo bulboso de la antena 1 (Zeidler, 2003). Entre las especies más similares del género, *V. propinqua* es la más cercana, ya que comparte muchas de las características, sin embargo, se distinguen fácilmente por la forma del telson, punteado en *V. propinqua* y redondeado en *V. gibbosa* (Zeidler, 2003).

Comentarios generales. Esta especie habita la zona epipelágica y mesopelágica, registrada por encima de 500 m de profundidad (Vinogradov, 1999). El registro geográfico más cercano en el Pacífico este tropical, para *V. gibbosa*, fue al norte de México (Gasca, 2009b) y al sur de Perú (Vinogradov, 1991), lo que representa una amplitud en su distribución geográfica de aprox. 2 600 km al sur y al norte del Pacífico americano.

Familia **SCINIDAE** Stebbing, 1888
Género *Scina* Prestandrea, 1833
Scina borealis (G. O. Sars, 1882)
(Fig. 4A)

Diagnóstico. Cuerpo delgado con su superficie lisa y sin quillas. Antena 1 delgada ligeramente más larga que el pereión. Pereiópodo 5, base con los márgenes anterior y posterior

aserrados y con el margen distal proyectado sobre el isquio, mero tan largo como el carpo, propodio más corto que el mero. Urópodos 1-2 con los exopoditos reducidos a pequeñas espinas. Urópodo 1 armado de espinas largas en el margen interno. Urópodo 2 con el margen anterior liso y el margen posterior denticulado. Telson triangular y pequeño. Fuentes: Zeidler (1990), Vinogradov *et al.* (1996).

Material examinado. 2 individuos: 1 ind, est 20; 1 ind, est 22.

Distribución global. Presente en todos los océanos del mundo en aguas tropicales, templadas y frías, desde el Ártico (80° N) hasta el Antártico (72° S). En el Pacífico este, se ha registrado en EE. UU., México, Colombia, Ecuador, Perú y Chile (Vinogradov, 1991; Vinogradov *et al.* 1996; Gasca, 2009b; Valencia *et al.* 2013; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020).

Discusión taxonómica. Esta especie se asemeja más morfológicamente a *S. wagneri*, por presentar el margen interno del urópodo 1 aserrado (con espinas largas), pero se diferencia porque en *S. borealis* los urópodos son más anchos y los exopoditos de los urópodos 1-2 están reducidos a espinas pequeñas (Vinogradov *et al.* 1996).

Comentarios generales. En el plano vertical, *S. borealis* tiene una distribución muy amplia que va de los 50 a los 3 000 m de profundidad, presente en aguas frías, templadas y tropicales (Vinogradov *et al.* 1996;

Vinogradov, 1999). Además, *S. borealis* es reconocida como la especie más abundante del género *Scina* en todos los océanos (Zeidler, 1990; Vinogradov *et al.* 1996). Su registro geográfico más cercano al área de estudio en el Pacífico este fue a aprox. 800 km de distancia en aguas de Colombia, donde se observó en baja abundancia (Valencia *et al.* 2013), similar a lo observado cerca de la isla del Coco.

***Scina excisa* Wagler, 1926**
 (Fig. 4B)

Diagnóstico. Cuerpo delgado con su superficie lisa y sin quillas. Antena 1 ligeramente más corta que el pereión. Pereiópodo 5, base con el margen anterior aserrado y con el margen distal proyectado sobre el isquío, mero igual o ligeramente más corto que el carpo. Urópodos 1-2 con los exopoditos reducidos a pequeñas

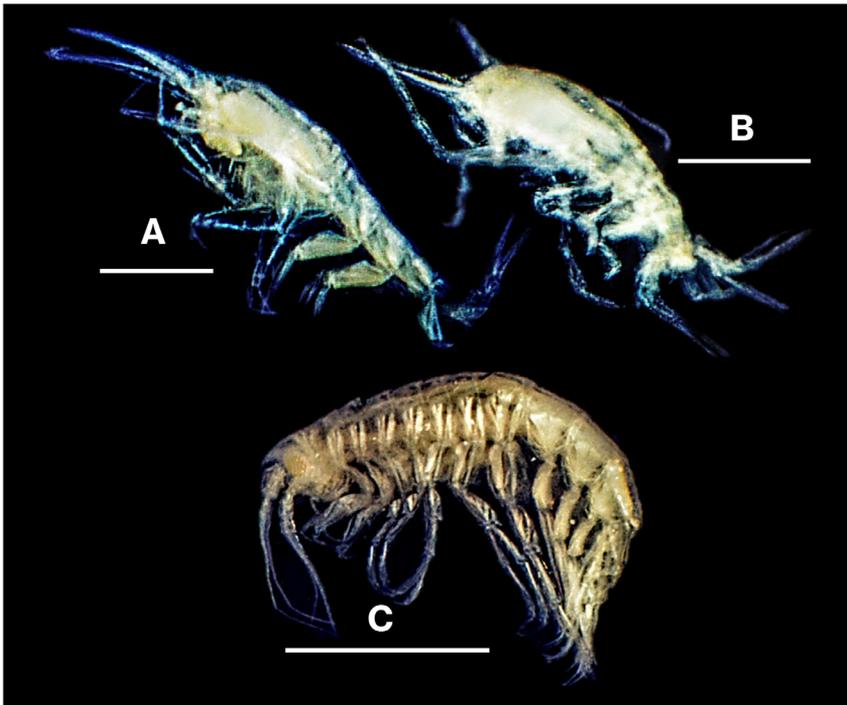


Fig. 4. Nuevos registros de anfipodos pelágicos del Pacífico de Costa Rica. A, *Scina borealis*; B, *S. excisa*; C, *Stenopleura atlantica*. Barras de escala: 0.5 mm

Fig. 4. New records of pelagic amphipods from the Pacific of Costa Rica. A, *Scina borealis*; B, *S. excisa*; C, *Stenopleura atlantica*. Scale bars: 0.5 mm

espinas. Urópodo 1 con todo el margen interno liso. Urópodo 2 con el margen anterior ensanchado, curvado bruscamente por encima del nivel de la base del exópodo. Telson triangular con la punta aguda. Fuentes: [Zeidler \(1990\)](#), [Vinogradov et al. \(1996\)](#).

Material examinado. 1 individuo, est 17.

Distribución global. Atlántico norte: Caribe mexicano, golfo de México, Bahamas, mar del Sargazo, islas Canarias. Atlántico sur: Sudáfrica. Pacífico norte: México. Pacífico sur: 4.95° S y 119° W, Perú. Antártica ([Vinogradov, 1991](#); [Gasca, 2009b, 2009c](#); [Valencia et al. 2013](#); [Violante-Huerta, 2019](#); [GBIF.org, 2020](#); [OBIS, 2020](#)).

Discusión taxonómica. Esta especie es muy similar a *S. damasi* por la forma de los pereiópodos, pero difiere porque en *S. excisa* el margen interno del urópodo 2 se encorva bruscamente a la altura de la base del exópodo ([Vinogradov et al. 1996](#)). Además, la proyección del margen distal de la base del pereiópodo 5 se extiende hasta la mitad del mero en *S. damasi*, mientras que en *S. excisa* la proyección no rebasa la base del mero ([Zeidler, 1990](#)).

Comentarios generales. Esta especie prefiere habitar aguas tropicales de la zona mesopelágica entre 200 y 500 m de profundidad ([Thurston, 1976a](#); [Vinogradov et al. 1996](#); [Vinogradov, 1999](#)). En el Pacífico este, *S. excisa* se registró al norte de México ([Gasca, 2009b](#)) y al sur de Perú

([Vinogradov, 1991](#)), lo que representa a una amplitud en su distribución de aprox. 2 600 km al sur y al norte del Pacífico americano.

Suborden SENTICAUDATA Lowry & Myers, 2013

Familia CALLIOPHIDAE G. O. Sars, 1893

Género *Stenopleura* Stebbing, 1888

Stenopleura atlantica Stebbing, 1888 (Fig. 4C)

Diagnóstico. Cuerpo delgado. Ojos rojos reniformes. Gnatópodos 1-2 subquelados, con un lóbulo grande en el margen posterior del mero. Pereiópodos 3-7 largos y simples. Urópodos con sus márgenes laterales armados con espinas. Telson tan ancho como largo, el margen distal del telson con incisiones. Fuentes: [Stebbing \(1888\)](#), [Vinogradov \(1999\)](#), [Violante-Huerta et al. \(2020\)](#).

Material examinado. 16 individuos: 1 ind, est 3; 1 ind, est 4; 2 ind, est 6; 2 ind, est 8; 2 ind, est 10; 1 ind, est 11; 1 ind, est 12; 1 ind, est 13; 3 ind, est 14; 1 ind, est 15; 1 ind est 21.

Distribución global. Atlántico norte: Cuba, golfo de México, Irlanda, islas Canarias. Atlántico sur: Brasil, aguas oceánicas entre América y África, golfo de Guinea, Sudáfrica. Pacífico norte: Panamá. Pacífico sur: Nueva Zelanda. Océano Índico: mar Árabe. Antártica: mar de Davis ([Thurston, 1976b](#); [Vinogradov, 1999](#); [Bellan-Santini & Costello, 2001](#);

Lalana *et al.* 2005; De Broyer *et al.* 2007; Miloslavich *et al.* 2010; GBIF.org, 2020; OBIS, 2020; Violante-Huerta *et al.* 2020).

Discusión taxonómica. Especie tipo del género monotípico *Stenopleura* (Horton *et al.* 2020). *Stenopleura atlantica* se caracteriza por poseer el margen distal del telson con incisiones, formando un margen tridentado, lo que la diferencia del género *Calliopus*, cuyo margen distal del telson es redondo (Barnard, 1964).

Comentarios generales. *Stenopleura atlantica* es común en aguas de la zona epipelágica de los océanos, especialmente del Atlántico (OBIS, 2020), sin embargo, la especie se ha observado en aguas de la zona mesopelágica hasta los 1 000 m de profundidad en el Atlántico norte (Thurston, 1976b; Violante-Huerta *et al.* 2020). *Stenopleura atlantica* prefiere habitar aguas por encima de los 200 m de profundidad, debido a que, aparentemente, es la zona con las condiciones hidrológicas óptimas para su reproducción (Thurston, 1976b; Violante-Huerta *et al.* 2020).

CONCLUSIÓN

El registro de 13 especies de anfipodos pelágicos en las aguas oceánicas del Pacífico de Costa Rica contribuye al conocimiento de la diversidad de

este importante grupo, para el país y el Pacífico este tropical. La lista actualizada de anfipodos pelágicos del Pacífico costarricense ahora es de 54 especies, lo que sugiere la necesidad de realizar más estudios al respecto, con miras a mejorar el conocimiento de la fauna marina de la región.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Costa Rica, la Universidad Nacional y al Parque Nacional Isla del Coco por su respaldo en la realización de la campaña oceanográfica UCR-UNA-COCO-VI y a Fabiola Jiménez por su apoyo durante el muestreo. El primer autor agradece el soporte financiero otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México / Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CONACYT-862851) en México para llevar a cabo la estancia de investigación en el CIMAR de la Universidad de Costa Rica. Finalmente, los autores agradecen también a los revisores anónimos, por los valiosos comentarios que contribuyeron a mejorar este trabajo.

REFERENCIAS

- Barnard, J. L. (1964). Revision of some families, genera and species of Gammaridean Amphipoda. *Crustaceana*, 7(1), 49-74. <https://doi.org/10.1163/156854064X00263>
- Barnard, J. L. (1972). A review of the family Synopiidae (= Tironidae), mainly distributed in the deep sea (Crustacea: Amphipoda). *Smiths. Contr. Zool.*, 124, 1-94. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.124>
- Barnard, J. L. & Karaman, G. (1991). The Families and Genera of Marine Gammaridean Amphipoda (Except Marine Gammaroids). *Rec. Austral. Mus.*, 13(2), 1-866. <https://doi.org/10.3853/j.0812-7387.13.1991.367>
- Barnard, J. L. & Thomas, J. D. (1989). Four species of Synopiidae from the Caribbean region (Crustacea: Amphipoda). *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 102(2), 362-374.
- Bellan-Santini, D. & Costello, M. J. (2001). Amphipoda. En M. Costello (Ed.), *European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification* (pp. 295-308). France: Collection Patrimoines Naturels.
- Burridge, A. K., Tump, M., Vonk, R., Goetze, E. & Peijnenburg, K. T. (2017). Diversity and distribution of hyperiid amphipods along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Prog. Oceanogr.*, 158, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2016.10.001>
- De Broyer, C., Lowry, J. K., Jazdzewski, K. & Robert, H. (2007). Catalogue of the Gammaridean and Corophiidean Amphipoda (Crustacea) of the Southern Ocean, with distribution and ecological data. En C. De Broyer (Ed.), *Census of Antarctic Marine Life: Synopsis of the Amphipoda of the Southern Ocean* (pp. 1-325). Belgium: Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique.
- Dick, R. I. (1967). *A study of the Hyperiid Amphipoda in the waters off the east and south coasts of the Republic of South Africa in relation to prevailing hydrological conditions* (unpublished doctoral thesis). University of Cape Town, South Africa.
- Gasca, R. (2009a). Hyperiid Amphipods. In S. Wehrmann & J. Cortés (Eds.), *Marine Biodiversity of Costa Rica. Central America* (pp. 275-282). Germany: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8278-8_25
- Gasca, R. (2009b). Hyperiid Amphipods (Crustacea: Peracarida) in Mexican Waters of the Pacific Ocean. *Pac. Sci.*, 63(1), 83-96. [https://doi.org/10.2984/1534-6188\(2009\)63\[83:HACPIM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2984/1534-6188(2009)63[83:HACPIM]2.0.CO;2)
- Gasca, R. (2009c). Diversity of hyperiid amphipods (Crustacea: Peracarida) in the Western Caribbean Sea: news from the deep. *Zool. Stud.*, 48(1), 63-70.
- Gasca, R. & Morales-Ramírez, A. (2012). Anfipodos hiperideos (Crustacea: Peracarida) del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, Pacífico Tropical Oriental. *Rev. Biol. Trop.*, 60(3), 223-233.
- GBIF.org. (2020). GBIF Occurrence Download (<https://doi.org/10.15468/39o-me>). <https://www.gbif.org>
- Horton, T., Lowry, J., De Broyer, C., Bellan-Santini, D., Coleman, C. O., Corbari, L., ... & Zeidler, W. (2020). World Amphipoda Database. Amphipoda. World Register of Marine Species (WoRMS). <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1135>
- Hughes, L. E. (2009). Synopiidae. In J. K. Lowry & A. A. Myers (Eds.), *Benthic Amphipoda (Crustacea: Peracarida)*

- of the Great Barrier Reef, Australia (pp. 880-891). New Zealand: Zootaxa, 2260. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2260.1.50>
- Lalana, R., Ortiz, M. & Varela, C. (2005). Primera adición a la lista de los crustáceos no decápodos de Cuba. *Rev. Biol.*, 19, 50-56.
- Ledoyer, M. (1986). Crustacés amphipodes gammariens: familles des Haustoriidae à Vitjazianidae. *Faune Madagascar*, 59, 599-1112.
- Miloslavich, P., Díaz, J. M., Klein, E., Alvarado, J. J., Díaz, C., Gobin, J., ... & Ortiz, M. (2010). Marine biodiversity in the Caribbean: regional estimates and distribution patterns. *PLoS ONE*, 5, e11916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011916>
- OBIS. (2020). Ocean Biogeographic Information System (OBIS). <https://obis.org/>
- Salmán-Palacios, C. (1985). *Sistemática y distribución de los hipéridos pelágicos (Crustacea: Amphipoda) del domo de Costa Rica* (tesis de licenciatura no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Senna, A. R., Andrade, E. F., Guedes, U. N. & Pereira-Filho, G. H. (2020). Redescription and new records of *Synopia ultramarina* Dana (Amphipoda: Synopiidae) from off the northeastern Brazil, with comments on its morphological variations. *Iheringia, Sér. Zool.*, 110, 1-11. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2020017>
- Shih, C. T. & Hendrycks, E. A. (2003). A new species and new records of the genus *Vibilia* Milne Edwards, 1830 (Amphipoda: Hyperiidea: Vibiliidae) occurring in the eastern Pacific Ocean. *J. Nat. Hist.*, 37, 253-296. <https://doi.org/10.1080/713834685>
- Shoemaker, C. R. (1945). The Amphipoda of the Bermuda Oceanographic Expeditions, 1929-1931. *Zoologica*, 30(4), 185-266.
- Shulenberg, E. (1978). Vertical distribution, diurnal migration, and sampling problems of hyperiid amphipods in the North Pacific central gyre. *Deep-Sea Res.*, 25, 605-623. [https://doi.org/10.1016/0146-6291\(78\)90616-1](https://doi.org/10.1016/0146-6291(78)90616-1)
- Stebbing, T. R. R. (1888). Report on the Amphipoda collected by H. M. S. Challenger during the years 1873-1876. Report on the scientific results of the Voyage of H. M. S. Challenger during the years 1873-76. *Zool.*, 29, 1-1737.
- Thurston, M. H. (1976a). The vertical distribution and diurnal migration of the Crustacea Amphipoda collected during the SOND Cruise, 1965 II. The Hyperiidea and general discussion. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 56(2), 383-470. <https://doi.org/10.1017/S0025315400018981>
- Thurston, M. H. (1976b). The vertical distribution and diurnal migration of the Crustacea Amphipoda collected during the Sond Cruise, 1965: I. The Gammariidea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 56(2), 359-382. <https://doi.org/10.1017/S002531540001897X>
- Valencia, B., Lavaniegos, B., Giraldo, A. & Rodríguez-Rubio, E. (2013). Temporal and spatial variation of hyperiid amphipod assemblages in response to hydrographic processes in the Panama Bight, eastern tropical Pacific. *Deep-Sea Res. Part I*, 73, 46-61. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2012.11.009>
- Vinogradov, G. M. (1991). Hyperiid amphipods in the eastern part of the South Pacific gyre. *Mar. Biol.*, 109(2), 259-265. <https://doi.org/10.1007/BF01319394>
- Vinogradov, G. (1999). Amphipoda. In D. Boltovskoy (Ed.), *South Atlantic Zooplankton* (pp. 1141-1240). Netherlands: Backhuys Publishers.

- Vinogradov, M. E., Volkov, A. F. & Semenova, T. N. (1996). *Hyperiid Amphipods (Amphipoda, Hyperiiidea) of the World Oceans*. EE. UU.: Science Publ. Inc., Lebanon.
- Violante-Huerta, M. (2019). *Estructura de la comunidad de anfipodos (Crustacea: Peracarida) planctónicos del sur del Golfo de México* (tesis de maestría no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Violante-Huerta, M., Sanvicente-Añorve, L., Marrón-Becerra, A., Lemus-Santana E. & Flores-Coto, C. (2020). First records of non-hyperiid planktonic amphipods (Amphilochidea and Senticaudata) from deep waters of the southern Gulf of Mexico, with an identification key. *Rev. Mex. Biodivers.*, 91, e912975.
- Zeidler, W. (1990). Pelagic amphipods, Infraorder Physosomata (Crustacea: Amphipoda: Hyperiiidea) from the CSK International Zooplankton Collection (Western North Pacific), with the description of four new species of Scina. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 34(4/6), 167-200. <https://doi.org/10.5134/176167>
- Zeidler, W. (2003). A review of the hyperiid amphipod superfamily Vibilioidea Bowman and Gruner, 1973 (Crustacea: Amphipoda: Hyperiiidea). *Zootaxa*, 280, 1-104. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.280.1.1>
- Zeidler, W. (2004). A review of the families and genera of the hyperiid amphipod superfamily Pronimoidea Bowman & Gruner, 1973 (Crustacea: Amphipoda: Hyperiiidae). *Zootaxa*, 567, 1-66. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.567.1.1>
- Zeidler, W. (2016). A review of the families and genera of the superfamily Platysceloidea Bowman & Gruner, 1973 (Crustacea: Amphipoda: Hyperiiidea), together with keys to the families, genera and species. *Zootaxa*, 4192, 1-136. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4192.1.1>
- Zhang, W., Lin, Y., He, C., Cao, W., Huang, J., Zheng, L., Yang, W. & Wang, Y. (2014). Hyperiid amphipod communities and the seasonal distribution of water masses in eastern Beibu Gulf, South China Sea. *Aquat. Biol.*, 20(3), 209-217. <https://doi.org/10.3354/ab00556>

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La *Revista Ciencias Marinas y Costeras* es una revista anual del Programa de Maestría en Ciencias Marinas y Costeras (Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional), de divulgación científica y que publica:

- Artículos científicos (originales e inéditos)
- Notas científicas (comunicaciones cortas) y
- Reseñas bibliográficas

El Comité Editorial solicita a los autores cumplir las siguientes instrucciones:

a) **Formato general**

- Idioma: Español o inglés, resumen en ambos idiomas,
- Letras: Títulos de sección: Times New Roman 14
Textos: Times New Roman 12
Títulos de figuras y cuadros, autores y palabras claves: Times New Roman 11
Resumen y abstract: Times New Roman 10
- Texto: A doble espacio; cada párrafo con sangría inicial de 5 caracteres. No incluye el resumen y abstract.
- Extensión máxima: *Artículos científicos*: Un máximo de 25 páginas incluyendo figuras y cuadros. Solo en casos justificados ante el Comité Editorial se aceptarán artículos con extensiones mayores.
Nota científica: Máximo de 6 páginas.
Reseña: Máximo de 3 páginas.
- Márgenes: Superior: 3 cm
Inferior: 2.5 cm
Izquierdo: 3 cm
Derecho: 2.5 cm

Las abreviaturas utilizadas deben ajustarse al Sistema Internacional de Unidades (m, km, g, mg, %, PSU, °C). Todas las cifras decimales deberán separarse con punto y no con coma.

No se incluirán notas al pie de página o anexos, únicamente se incluirá el material complementario cuando sea indispensable.

b) **Estructura general del Artículo Científico**

- *Título del artículo:* Centrado, en negrita, en español e inglés, mayúscula y letra tamaño 14. Se debe dejar un espacio sencillo entre el título y los autores.
- *Autor (es):* Letra Times New Roman 11. Nombre y apellidos en cursiva, justificado e indicando la filiación institucional (utilizar superíndices con números), lugar de trabajo o dirección física, y correo electrónico. Se debe indicar la filiación de todos los autores, anotando quién es el autor encargado de la correspondencia, y marcándolo con un asterisco. Se debe dejar un espacio sencillo entre el (los) autor (es) y el Resumen.
- Los títulos de las secciones deben colocarse en el margen izquierdo (**INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, AGRADECIMIENTOS Y BIBLIOGRAFÍA**). Los títulos de las secciones deben escribirse utilizando mayúsculas y negrita, y dejando un espacio para comenzar el texto. No debe haber espacio entre párrafos de una misma sección.
- *Resumen:* Cada artículo deberá estar precedido por un resumen en español y en inglés. Cada resumen no debe exceder las 250 palabras.
- *Palabras claves:* A cada uno de los resúmenes le seguirán las palabras claves (máximo cinco) representativas del contenido del artículo.
- *Introducción:* Debe explicar la finalidad del artículo, y plantear y justificar el problema de investigación. Además, debe incluir información específica sobre antecedentes del tema en estudio, así como el estado del tema a abordar.
- *Materiales y Métodos:* Se presenta la metodología empleada y toda la información necesaria para que el trabajo sea repetible. Se puede también sustentar la selección de los métodos empleados.
- *Resultados:* Se presentan en forma de texto. Se pueden incluir los datos utilizando cuadros y figuras (cuando se requiera). Los cuadros y las figuras deberán ser numerados consecutivamente, y contar con títulos apropiados al contenido (en español e inglés); no se deberán usar negritas, y se acentuarán

tanto las minúsculas como las mayúsculas. Se deberá citar el origen de los datos que contienen, y deberán estar mencionados en el texto. No deben incluirse datos o ilustraciones que no tengan relación con el texto.

Título de Cuadros: Deben ser escritos a doble espacio; se deben evitar las líneas verticales, y utilizar líneas horizontales únicamente cuando separen campos de información (encabezados, subencabezados, campos inferiores o intermedios independientes tales como subtotales). El título debe colocarse en la parte superior del cuadro, en minúscula y sin negrita.

Título de Figuras: Deben ser escritos a doble espacio. El título debe colocarse en la parte inferior de la figura, en minúscula y sin negrita.

Los cuadros y figuras deberán enviarse con una reducción apropiada (hasta 60%), y sus elementos deberán tener el tamaño necesario para permitir su fácil lectura; el tamaño de las letras y el grosor de las líneas deben serlos apropiados para que sean visibles y claras cuando se efectúe una reducción. La tipografía ya reducida no deberá ser menor de 8 puntos. Es posible incluir en el manuscrito dibujos y/o fotografías; en el caso de las fotografías, la revista asumirá el costo de publicar las en blanco y negro; en caso contrario, el autor deberá asumir los costos.

Formato de las imágenes: El autor debe preparar sus figuras y cuadros muy cuidadosamente, ya que suelen ser la causa de atrasos en la revisión de los manuscritos y en el proceso de diagramación. Independientemente de la aplicación utilizada, cuando se incluyan imágenes o cuadros de forma electrónica, se deben guardar o convertir las imágenes a uno de los siguientes formatos:

EPS: Dibujos vectoriales. Se debe incrustar la fuente o guardar el texto como gráficos.

TIFF: Fotografías en color o en escala de grises (semi-tonos); siempre usar un mínimo de 300 dpi.

TIFF: Dibujos de mapas de bits; se debe usar un mínimo de 1000 dpi.

TIFF: Combinaciones de línea de mapa de bits / medio tono (color o escala de grises); es necesario el uso de un mínimo de 500 dpi.

DOC, XLS o PPT: Si las imágenes o los cuadros fueron creados en cualesquiera de estas aplicaciones de Microsoft Office®, debe de indicarlo.

Los cuadros y figuras deben entregarse por separado.

- *Discusión:* El autor deberá discutir los resultados más relevantes haciendo uso de las referencias pertinentes y actualizadas. Es permitida una sola sección de Resultados y Discusión
- *Conclusiones:* Toda conclusión debe estar sustentada con los datos presentados y discutidos, y en estricta consonancia con el propósito del artículo. Cuando se trata de una síntesis de los descubrimientos, en esta sección se pueden incluir propuestas, a criterio del autor.
- *Agradecimientos:* Deben reflejar una apreciación auténtica hacia quienes han colaborado en la investigación.
- *Bibliografía:* Las referencias bibliográficas deben ajustarse a lo establecido en las normas de la “American Psychological Association (APA), disponibles en el vínculo de la página de la revista (www.una.ac.cr/revmar).

Publicaciones periódicas. Las publicaciones periódicas son aquellas que aparecen con cierta regularidad: diarios, revistas, boletines ilustrados y otros semejantes. El formato requerido es el siguiente:

Autor, A. A., Autor, E. E. & Autor, C. C. (Año de publicación). Título del artículo. *Título de la revista científica en cursiva y correctamente abreviado según las normas de la ISI*, Volumen (número entre paréntesis), página inicial y final separadas por un guion.

Tomasko, D. A. & Lapointe, B. E. (1991). Productivity and biomass of *Thalassia testudinum* as related to water column nutrient availability and epiphyte levels: field observations and experimental studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 75(3), 9-17.

Publicaciones no periódicas. Las publicaciones no periódicas son las que se publican por separado: libros, informes, folletos, ciertas monografías, manuales y medios audiovisuales. Los formatos requeridos son los siguientes:

Autor, A. A. (Año de publicación). *Título del trabajo*. Localidad: Editorial.

Libro:

Robinson, D. N. (1992). *Social discourse and moral judgment*. San Diego, CA, EE.UU.: Academic Press.

Capítulo de libro:

O'Neil, J. M. & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys; Metaphor for healing, transition, and transformation. En E. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107-123). New York, EE.UU.: Springer.

Memoria de congreso:

González, R., Calvo, A., Benavides, G. & Casullo, M. (1998, noviembre). *Evaluación de la conducta social de Aratus pisonii*. Ponencia presentada en el Congreso Latinoamericano de Carcinología, Salamanca, España.

Página Web:

Dewey, R. A. (2002). La torsión en los gastrópodos: una revisión. Recuperado en enero 25, 2003, disponible en <http://www.gpa.orljournalsljacobson.html>

Artículo de revista electrónica:

Jacobson, J. W., Mulick, J. A. & Schwartz, A. A. (1995). A history of facilitated communication: Science, pseudoscience, and antiscience: Science working group on facilitated communication. *American Psychologist*, 50, 750-765. Recuperado en enero 25, 1996, disponible en <http://www.gpa.orljournalsljacobson.html>

Procedente de una base de datos en CD-ROM:

Schneiderman, R. A. (1997). Librarians can make sense of the Net. *San Antonio Business Journal*, 11(3). Recuperado en enero 27, 1999. De la base de datos EBSCO (Masterfile), disponible en <http://www.ebsco.com>

Tesis:

Wilfley, D. E. (1989). *Interpersonal analysis of bulimia: Normal-weight and obese*. Tesis de doctorado no publicada, University of Missouri, Columbia.

Comunicaciones no publicadas: No deben ser incluidas en las referencias, solo se nombran en el texto del trabajo. Es necesario incluir al lado de la cita la persona que suministra la información, el medio y la fecha. Ej.: "La coloración de *A. similis* varía con los periodos de lluvia" (C. Fonseca, comunicación personal, Junio 29, 2000).

c) Estructura general de la Nota Científica:

Se utilizan los mismos criterios que para el Artículo Científico en lo que respecta al Título del artículo, Autor (es), Resumen, Abstract y Palabras claves. Sin embargo, para las notas científicas cada resumen no deberá exceder las 70 palabras.

- Los títulos de las secciones deben colocarse en el margen izquierdo (**INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, AGRADECIMIENTOS Y BIBLIOGRAFÍA**). Los títulos de las secciones deben escribirse utilizando mayúsculas y negrita, y dejando un espacio para comenzar el texto. No debe haber espacio entre párrafos de una misma sección.
- *Introducción*: Enmarcar sucintamente el problema a resolver y el objetivo con un sustento teórico. El texto deberá escribirse de manera continua y sin espacio entre párrafos.
- *Cuadros y Figuras*: Deberán seguir el mismo formato que en los artículos científicos.
- *Agradecimientos*: Se pondrán como último párrafo, sin encabezado. Los nombres “oficiales” no se deben traducir.
- *Bibliografía*: Deberá seguir el mismo formato que en los artículos científicos.

d) Estructura general de una Reseña Bibliográfica:

Plantea una revisión bibliográfica de un determinado ámbito de estudio relacionado con la temática que la revista. Puede repasar los expositores más relevantes, sus ideas principales y sus aportes. Puede hacer análisis y comentarios basados en afirmaciones objetivas y sustentadas.

- *Partes del artículo de revisión bibliográfica*
 - Título (en español e inglés).
 - Filiación.
 - Palabras claves (en español e inglés).
 - Resumen (en español e inglés). En este apartado debe incluir:
 - Plantea el objetivo del estudio.
 - Expone la temática que aborda y su trascendencia.
 - Especifica los periodos o etapas de la información bibliográfica objeto del análisis.

- Presenta los principales criterios para analizar la información bibliográfica tratada.
- Presenta los principales hallazgos, conclusiones.
- Presenta las principales aplicaciones, implicaciones o recomendaciones.
- Incorpora la información necesaria que oriente al lector/a a identificar del contenido básico del escrito de forma rápida y a determinar su relevancia. Es autosuficiente semánticamente.
- Introducción (plantea el objetivo o problemática que motivó la revisión y los criterios de organización del discurso).
- Desarrollo: especifica el análisis bibliográfico · Conclusiones o discusiones y pendientes.

e) **Etapas que siguen los manuscritos:**

1. Frecuencia de publicación

La publicación de la **REVMAR** es semestral, en un volumen con la publicación del primer número del 01 enero - 30 junio y el segundo número del 01 julio - 31 diciembre

2. Fecha de recepción de artículos

La recepción de artículos permanecerá abierta todo el año.

3. Forma de entrega

La primera versión del manuscrito puede ser enviada en forma digital vía Internet, junto con la [carta de originalidad y cesión de derechos de autor](#) adjunto debidamente llenado y firmado por todas las personas autoras, utilizando los correos: revmar@una.cr o revciemmarycos@gmail.com. Alternativamente puede ser enviada vía correo postal a las siguientes direcciones:

Licda. Nidya Cecilia Nova Bustos Editora Revista Ciencias Marinas y Costeras Maestría en Ciencias Marinas y Costeras Universidad Nacional Apartado Postal 86-3000 Costa Rica	M. Sc. Luis Villalobos Chacón Director Revista Ciencias Marinas y Costeras Maestría en Ciencias Marinas y Costeras Universidad Nacional Apartado Postal 86-3000 Costa Rica
--	--

El contenido de la *Carta de originalidad y cesión de derechos de autor*

1. El artículo es original e inédito: esto es, constituye una producción intelectual propia de la(s) persona(s) arriba indicada(s) y no ha sido divulgado a terceros(as) de forma pública, por ningún medio de difusión impreso o digital.
2. El artículo no ha sido postulado simultáneamente para su publicación ante otra revista impresa, electrónica ni en ningún otro medio escrito u órgano editorial. En caso de que antes hubiere sido sometido a evaluación de otra revista, se debe explicar la causa por la que no se aceptó, e indicar el correo electrónico de la revista a que fue sometido originalmente.
3. El autor (es) no ha(n) suscrito con anterioridad ante terceros contratos de cesión de derechos patrimoniales o licencias de uso en relación con los derechos de propiedad intelectual que ostentan sobre el artículo postulado que les impida cederlos por medio de este acto.
4. En caso de artículos elaborados como obras en colaboración –bien se trate de obras en las que los autores(as) tienen el mismo grado de participación o aquellas en las que existe una persona autora principal y una o varias personas autoras secundarias–, todos(as) ellos(as) han contribuido intelectualmente en la elaboración del documento.
5. En caso de artículos elaborados como obras en colaboración (según se especificó en el punto 4), en relación con el reconocimiento que se realiza respecto de los niveles de participación asignados por los(as) autores(as) del artículo, estos(as) liberan de responsabilidad a la Revista Ciencias Marinas y Costeras.
6. En caso de artículos elaborados como obras en colaboración, todos(as) los(as) autores(as) han leído y aprobado el manuscrito postulado. En este entendido, los(as) autores(as) abajo firmantes designamos a _____ como encargado(a) de recibir correspondencia y con autoridad suficiente para representar, en condición de agente autorizado(a) a los demás autores(as). Denominado autor correspondencia.
7. Reconoce(n) que la Revista no comparte necesariamente las afirmaciones que en el artículo se plantean.
8. Manifiesta(n) que todos los datos de **citas** dentro de texto y sus respectivas **referencias** tienen la fuente y el crédito debidamente identificados.
9. Aporta(n) los permisos o autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales para el uso de tablas y figuras (ilustraciones, fotografías, dibujos, mapas, esquemas u otros) en el escrito.
10. En caso de que el artículo postulado sea aceptado para su publicación, permite(n) la cesión GRATUITA, EXCLUSIVA, DE ÁMBITO MUNDIAL Y POR PLAZO INDEFINIDO de su(s) derecho(s) patrimonial(es) de autoría a la Universidad Nacional (Costa Rica), lo que implica lo siguiente:
 - a. La edición gráfica y de estilo de la obra o parte de esta.
 - b. La publicación y reproducción íntegra de la obra o parte de esta, tanto por medios impresos como electrónicos, incluyendo Internet y cualquier otra tecnología conocida o por conocer.
 - c. La traducción a cualquier idioma o dialecto de la obra o parte de esta.

- d. La adaptación de la obra a formatos de lectura, sonido, voz y cualquier otra representación o mecanismo técnico disponible, que posibilite su acceso para personas no videntes parcial o totalmente, o con alguna otra forma de capacidades especiales que les impida su acceso a la lectura convencional del artículo.
 - e. La distribución y puesta a disposición de la obra al público, de tal forma que el público pueda tener acceso a ellas desde el momento y lugar que cada quien elija, a través de los mecanismos físicos o electrónicos de que disponga.
 - f. Que la obra sea distribuida a través de la licencia Creative Commons BY- NC-SA versión 4.0, lo que implica la posibilidad de que los lectores puedan de forma gratuita descargar, almacenar, copiar, generen obras derivadas y distribuir la versión final aprobada y publicada (post print) del artículo, siempre y cuando se realice sin fines comerciales, y se mencione la fuente y autoría de la obra.
 - g. Cualquier otra forma de utilización, proceso o sistema conocido o por conocerse que se relacione con las actividades y fines editoriales a los cuales se vincula la Revista.
11. Derechos de reutilización: A su vez, la UNA les concede a los AUTORES el derecho de reutilizar para cualquier propósito y poder publicar en internet o cualquier sitio electrónico, la versión final aprobada y publicada (post print) del artículo, siempre y cuando se realice sin fines de lucro.
 12. Acepta(n) que, con su colaboración, el artículo presentado sea ajustado por el equipo de edición de la Revista, a las “[Instrucciones para autores/as](#)” previamente establecidas y publicadas en el sitio web oficial de la Revista (<http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/revmar>); en cuanto a procedimientos, formato, corrección, edición, publicación, duración del proceso editorial y otros requerimientos solicitados en dichas normas.
 13. Aceptan, que la revista se reservará el derecho de retirar, o bloquear en forma expedita el acceso a las publicaciones almacenadas en sus plataformas virtuales al momento de obtener conocimiento efectivo de una denuncia interpuesta por un tercero por presunta infracción de sus derechos de autor.
 14. De conformidad con la Ley N° 8968, ley de protección de la persona frente al tratamiento de sus datos personales, el AUTOR consiente en facilitarle a la Revista un correo electrónico de contacto, así como los datos personales necesarios para la identificación de la autoría del artículo: _____. A su vez, autorizan a la Revista a publicar junto con el artículo, los datos personales necesarios (nombre y apellidos, institución, ciudad/país, correo y el número ORCID). Cualquier otro dato personal distinto al indicado anteriormente, será resguardado por la Revista con absoluta confidencialidad y no podrá ser divulgado ni transferido a terceros sin consentimiento del AUTOR.
 15. Admiten(n) que la postulación y posible publicación del artículo en la *Revista Ciencias Marinas y Costeras* se regirá por las políticas editoriales de esta, la normativa institucional de la Universidad Nacional y la legislación de la República de Costa Rica. Adicionalmente, que en caso de cualquier eventual diferencia de criterio o disputa futura, esta se dirimirá de acuerdo con los mecanismos de Resolución Alternativa de Conflictos y la Jurisdicción Costarricense.

Los artículos aceptados por la *Revista Ciencias Marinas y Costeras* pasan a ser propiedad de esta, respetándose los derechos de autor y producción correspondientes. No se devolverán los originales.

4. Sistema de arbitraje

Los manuscritos que cumplan con los objetivos temáticos de la revista y se ajusten al formato indicado serán enviados a al menos dos evaluadores externos, quienes revisarán el documento siguiendo la metodología de “doble ciego” y harán las recomendaciones para mejorarlos o los calificarán como inaceptables. El comité editorial devolverá al autor las observaciones recibidas por parte de los evaluadores. Si el artículo es aceptado, pero sujeto a modificaciones, se le dará un plazo definido al autor para realizarlas y volver a someter a consideración el manuscrito.

5. Pruebas y reimpresos

Luego del proceso de corrección, edición y aceptación final del manuscrito, el autor recibirá la prueba final de digital, por vía electrónica y en formato PDF antes de la publicación del artículo. Por lo anterior, los autores serán los responsables de la revisión final, efectuando los cambios mínimos necesarios, y corrigiendo los errores de digitalización que puedan existir. Los autores deberán devolver la prueba de galera en un plazo máximo de una semana a partir de su fecha de recepción. El retraso en la devolución de las pruebas podría implicar la publicación del trabajo sin las correcciones del autor.

Título del artículo: en español e inglés. Centrado, en negrita, mayúscula, letra Times New Roman 14, doble espacio.

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE
ESCHERICHIA COLI EN *CRASSOSTREA GIGAS*...
EVALUATION OF *ESCHERICHIA COLI*
CONCENTRATIONS IN *CRASSOSTREA GIGAS* ...**

Se debe dejar un espacio sencillo entre el título y los autores

Autor (es): Nombre y apellidos en cursiva, letra Times New Roman 11, doble espacio, justificado.

Luis A. Vega Corrales^{1} y Carolina Marín Vindas¹.*

¹Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards, Universidad Nacional, Costa Rica. luis.vega.corrales@una.cr*

Indicar el correo electrónico del autor encargado de la correspondencia. Marcar con un asterisco.

Dejar un espacio sencillo entre el (los) autor (es) y el Resumen

Títulos de sección (Resumen, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía): margen izquierdo, en negrita, mayúscula, letra Times New Roman 14.

RESUMEN

Costa Rica no cuenta con referencias sobre la calidad sanitaria de las zonas de cultivo de *Crassostrea gigas* y esto puede representar un riesgo para la salud pública...

Resumen: en español e inglés. Letra Times New Roman 10, justificado, espacio sencillo. Extensión máxima: 250 palabras

Subtítulo de palabras claves: en negrita, letra Times New Roman 11. Mínimo y máximo 5 palabras claves, así lo están exigiendo las bases de datos

Palabras claves: Contaminación marina, maricultura, *Escherichia coli*, *Crassostrea gigas*, Costa Rica.

ABSTRACT

Costa Rica does not have references on health quality of harvesting zones of *Crassostrea gigas*, which can pose a potential public health risk...

Keywords: Marine pollution, mariculture, *Escherichia coli*, *Crassostrea gigas*, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos son vulnerables a la contaminación antropogénica. Según Halpern *et al.* (2008), no existen zonas marino costeras que no estén impactadas por la influencia humana...

Texto: letra Times New Roman 12, doble espacio, justificado. Se acentuarán tanto las minúsculas como las mayúsculas. Cada párrafo con sangría inicial de 5 caracteres. No deben haber espacios entre párrafos de una misma sección.

...Estudios recientes han demostrado que las condiciones ambientales que afectan a las zonas de cultivo de moluscos bivalvos dependen, entre muchos otros factores, de las condiciones climatológicas y estacionales del área (Peterson, 1960; CITES, 2011; Campos *et al.* 2013b; Derolez *et al.* 2013; Lee & Silk, 2013; Mignani *et al.* 2013).

Cita para publicaciones de 1 autor.

Cita para publicaciones de más de 2 autores.

Cita para diferentes publicaciones del mismo autor y año.

Cita para publicaciones de 2 autores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la contaminación por *E. coli* en las zonas de cultivo de ostras de Punta Cuchillo (9°49' 48" N y 84°52' 48" O) y de Punta Morales (10°4' 84" N y 84°58' 37" O), ubicadas en el Golfo de Nicoya, Costa Rica (Fig. 1).

Los cuadros y figuras deben entregarse por separado.

Las cifras decimales deben indicarse con punto y no con coma.

Para la fase presuntiva se inoculó cada serie de cinco tubos de Lauryl Tryptose Broth (BD®) con 10, 1 y 0.1 mL de la muestra de agua... Para las muestras de ostras se homogeneizaron 25 g de carne y líquido intravalvar en 225 mL de Buffered Peptone Water (BD®). A partir de esta mezcla se prepararon las diluciones 1:100 y 1:1 000. De cada dilución se inocularon 5 tubos de Lauryl Tryptose Broth.

Los miles deben indicarse con un espacio.

Las abreviaturas utilizadas deben ajustarse al Sistema Internacional de Unidades (m, km, g, mg, %, PSU, °C).

BIBLIOGRAFÍA

Utilizar &

Se utilizan letras para diferenciar publicaciones del mismo autor y año.

- Campos, C. J. A., Acornley, R., Morgan, O. C. & Kershaw, S. (2013a). Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999-2008. *Mar. Pollut. Bull.*, 67(1-2), 223-227.
- Campos, C. J. A., Kershaw, S. R. & Lee, R. J. (2013b). Environmental influences on faecal indicator organism in bivalve shellfish. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*

Publicaciones periódicas: Volumen de la Revista en cursiva. El número de la Revista entre paréntesis. No debe haber espacio entre el volumen y el número. Páginas iniciales y finales separadas por un guión.

- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. & Trussell, R. R. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (17th ed.). Washington, EE:UU.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.

Publicaciones no periódicas: Título del libro en cursiva.

Publicaciones no periódicas: Localidad: Editorial.

Cuando son más de 7 autores, se enuncian los primeros 6 autores seguido de "...” y luego se escribe el último autor

- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V, Micheli, F., D'Agrosa, C., ... Watson, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319, 948-952.

Organización

- IMN. Instituto Meteorológico Nacional. (2014). Clima en Costa Rica. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica. Recovered its in 22 January 2014, retrieved from <http://www.imn.ac.cr/educacion/CLIMA DE COSTA RICA.html>
- CITES. (2011). *The CITES species. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. Ginebra, Suiza. Recuperado el 21 de septiembre, 2011, disponible en www.cites.org/eng/disc/species.php
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org/>

Página web: Recuperado en:
Página web: Disponible en:

CUADROS Y FIGURAS

Cuadros deben ser numerados consecutivamente.

Los cuadros y figuras deberán enviarse con una reducción apropiada (hasta 60%), y sus elementos deberán tener el tamaño necesario para permitir su fácil lectura; el tamaño de las letras y el grosor de las líneas deben ser los apropiados para que sean visibles y claras cuando se efectúe una reducción. La tipografía ya reducida no deberá ser menor de 8 puntos. Es posible incluir en el manuscrito dibujos y/o fotografías; en el caso de las fotografías, la revista asumirá el costo de publicar las en blanco y negro; en caso contrario, el autor deberá asumir los costos.

Cuadro 1. Criterios de clasificación de zonas de producción de moluscos bivalvos con base en muestras de agua de mar

Table 1. Shellfish harvesting zones classification criteria based in seawater samples

Título de cuadro: En español e inglés. Debe colocarse en la parte superior del cuadro, en minúscula y sin negrita. Letra Times New Roman 11, doble espacio, justificado.

Evitar líneas verticales. Utilizar líneas horizontales únicamente cuando separen campos de información (encabezados, subencabezados, campos inferiores)

Category of classification	Faecal coliforms (MPN 100 mL ⁻¹)		Treatment required
	Geometric mean	90% compliance	
Approved areas	< 14	< 43	None.
Prohibited areas	No sanitary survey or conditions for approved/restricted areas not met.		Harvesting not permitted.

Reference: Lee *et al.* (2008)

Se debe indicar el origen de los datos.

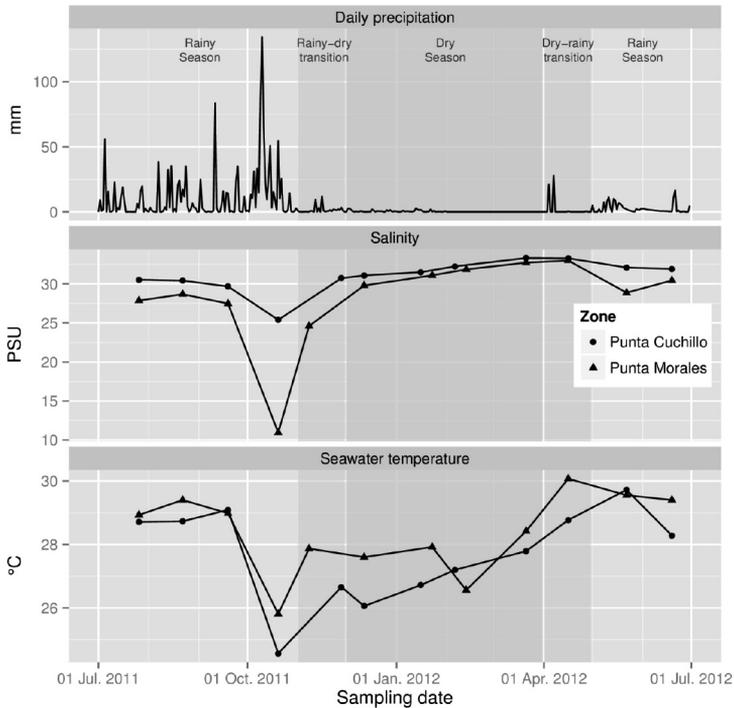


Fig. 3. Precipitación diaria (mm) y salinidad (UPS) y temperatura (°C) mensual registradas de julio de 2011 a junio de 2012 en las zonas de cultivo de *Crassostrea gigas* de Punta Cuchillo y de Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica. Se representan la estación seca, la estación lluviosa y los meses de transición establecidos para la zona de estudio por el Instituto Meteorológico de Costa Rica. Fuente precipitación: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica

Fig. 3. Daily precipitation (mm) and salinity (PSU) and temperature (°C) registered monthly from July 2011 to June 2012 in the *Crassostrea gigas* harvesting zones of Punta Cuchillo and Punta Morales, Gulf of Nicoya, Costa Rica. It represented dry season, rainy season and the transition months established for the study zone by the Meteorological Institute of Costa Rica. Precipitation source: Meteorological Institute of Costa Rica

Título de figura: En español e inglés. Debe colocarse en la parte inferior de la figura, en minúscula y sin negrita. Letra Times New Roman 11, doble espacio, justificado.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The *Journal of Marine and Coastal Sciences* is an annual scientific journal published by the Master's Program in Marine and Coastal Sciences (School of Biological Sciences, Universidad Nacional, Costa Rica), including:

- Scientific articles (original and unpublished)
- Scientific notes (short communications) and
- Literature reviews

The Editorial Committee requires authors to follow these instructions:

a) **General format**

Language:	English or Spanish, abstract in both languages.
Fonts:	Headings of sections: Times New Roman 14 pts. Text: Times New Roman 12 pts. Titles of figures and tables, name of authors and keywords: Times New Roman 11 pts. Abstract and <i>resumen</i> : Times New Roman 10 pts.
Text:	Double-spaced; indent paragraphs 5 spaces, except for <i>resumen</i> and abstract.
Maximum length:	<i>Scientific articles</i> : 25 pages maximum including figures and tables. Longer articles will only be accepted upon justification submitted to the Editorial Committee. <i>Scientific notes</i> : 6 pages maximum. <i>Reviews</i> : 25 pages maximum.
Margins:	Top: 3 cm Bottom: 2.5 cm Left: 3 cm Right: 2.5 cm

Abbreviations shall be used according to the International Unit System (m, km, g, mg, %, PSU, °C). Use period for decimals instead of comma.

Do not include footnotes or appendices. Additional material may be included only if indispensable.

b) **General structure for a scientific paper**

- *Title of the article:* Centered, bold, both in English and in Spanish, capital letters, 14 pts. Leave a single space between the title and the authors.
- *Author(s):* Times New Roman 11pts. Write first and last names in italics, justify text and indicate institutional affiliation (use superscript numbers), place of work or physical address and e-mail. Include affiliation of all authors; mark corresponding author with an asterisk. Leave a single space between the author(s) and the abstract.
- Titles of sections must be aligned to the left, in capital letters and in bold (**INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSION, ACKNOWLEDGEMENTS AND BIBLIOGRAPHY**). Use a single space before the text. Do not leave spaces between paragraphs of the same section.
- *Abstract:* Each article will be preceded by the abstracts in English and Spanish, each one not exceeding 250 words.
- *Keywords:* Each abstract will be followed by keywords (five words max.) representing the article content.
- *Introduction:* The purpose of the article and the research problem reasoning shall be explained here. Specific information on the background of the study and the state of the art shall be included as well.
- *Materials and methods:* The methodology used and all the necessary information to repeat the work shall be included here. The reasons regarding selected methods may also be explained in this section.
- *Results:* Results will be presented in a text format. Data may be included in tables and figures (when required). Tables and figures shall be consecutively numbered and identified with titles according to the content (in English and Spanish); do not use bold; use accent marks over small as well as capital letters in Spanish. All data sources shall be cited and included in the text. Do not include information or illustrations unrelated to the text.

Titles of tables: Double-spaced; avoid vertical lines and use horizontal lines only to separate information fields (headings, sub-headings, independent spaces in the middle or at the bottom such as subtotals). Titles must be in the upper section of the table, in small letters and in bold.

Titles of figures: Double-spaced; Title must be at the bottom of the figure, in small letters and in bold.

Tables and figures should be reduced as appropriate (no more than 60%); the elements in the tables and figures should have the appropriate size for easy reading. Choose the appropriate font size and line-width to keep the letters clear and visible even after a reduction. Reduced fonts shall not be less than 8 pts. Drawings and/or photographs may be included in the manuscript: photographs will be published by the journal in black and white at no cost; in any other case, the author will cover the costs.

Image formatting: Figures and tables must be prepared carefully to avoid any delays in the manuscript editing and the diagramming process. Regardless of the application used, when images or tables are included electronically, save or convert them using the following formats:

EPS: Vector drawings. Insert the source reference or save the text as graphics.

TIFF: Color or grayscale photographs, always use 300 dpi minimum.

TIFF: For bitmap images, use 1000 dpi minimum.

TIFF: For combinations of bitmap/half tone (color or grayscale) use 500 dpi minimum.

DOC, XLS or PPT: Indicate if images or tables were created in Microsoft Office®.

Tables and figures shall be submitted separately.

- *Discussion:* The author will discuss the most relevant results, using pertinent and updated references. Only one Results and Discussion section is allowed.
- *Conclusions:* All conclusions shall be based on the data presented and discussed. Conclusions shall strictly agree with the purpose of

the article. If the article is a synthesis of findings, proposals may be included in this section, at the author's discretion.

- *Acknowledgements*: This section must reflect an authentic appreciation to the research collaborators.
- *Bibliography*: Bibliographic references shall follow the guidelines of the American Psychological Association (APA), available at the Journal's Website (www.una.ac.cr/revmar).

Periodicals: Periodicals are regular publications: journals, newspapers, illustrated bulletins, etc. The format required is as follows:

Author, A. A., Author, E. E. & Author, C. C. (Year of publication). Title of the article. *Title of the scientific journal in italics and correctly abbreviated according to the ISI standards*, Volume (number in parenthesis), initial and final pages separated by a hyphen.

Tomasko, D. A. & Lapointe, B. E. (1991). Productivity and biomass of *Thalassia testudinum* as related to water column nutrient availability and epiphyte levels: field observations and experimental studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 75(3), 9-17.

Non-periodical publications: Non-periodical publications are those published separately: books, reports, booklets, some monographies, manuals and audiovisual media. Follow this format:

Author, A. A. (Year of publication). *Title of the work*. Place: Publishing house.

Book

Robinson, D. N. (1992). *Social discourse and moral judgment*. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Chapter of a book

O'Neil, J. M. & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys; Metaphor for healing, transition, and transformation. In E. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107-123). New York, USA: Springer.

Conference proceedings

González, R., Calvo, A., Benavides, G. & Casullo, M. (1998, November). *Evaluación de la conducta social de Aratus pisonii*. Paper presented in the Congreso Latinoamericano de Carcinología, Salamanca, Spain.

Web page

Dewey, R. A. (2002). La torsión en los gastrópodos: una revisión. Retrieved on January 25, 2003 available at <http://www.gpa.orljournalsljacobson.html>

Article in an electronic journal

Jacobson, J. W., Mulick, J. A. & Schwartz, A. A. (1995). A history of facilitated communication: Science, pseudoscience, and antiscience: Science working group on facilitated communication. *American Psychologist*, 50, 750-765. Retrieved on January 25, 1996, available at <http://www.gpa.orljournalsljacobson.html>

From a database on CD-ROM

Schneiderman, R. A. (1997). Librarians can make sense of the Net. *San Antonio Business Journal*, 11(3). Retrieved on January 27, 1999. From the EBSCO database (Masterfile), available at <http://www.ebsco.com>

Thesis

Wilfley, D. E. (1989). *Interpersonal analysis of bulimia: Normal-weight and obese*. Unpublished doctoral thesis, University of Missouri, Columbia.

Unpublished communications: Unpublished communications will not be included in the references; they will only be mentioned in the text. Include the name of the person who provides the information, media and date. Ej.: “La coloración de *A. similis* varía con los periodos de lluvia” (C. Fonseca, personal communication, June 29, 2000).

c) General structure for a scientific note

Apply the same criteria used for the scientific article regarding Title of the article, author(s), abstract and *resumen* and keywords, except for the number of words in the abstract (70 words max).

- Titles of sections must be on the left margin (**INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS AND BIBLIOGRAPHY**). The titles of sections shall be in capital letters and in bold. Leave a space to start the text. Do not leave spaces between paragraphs of the same section.
- *Introduction*: Explain, clearly and concisely, the problem to be resolved and the objective with a theoretical base. The text should be continuous, not leaving spaces between paragraphs.
- *Tables and figures*: Same format as the scientific articles.
- *Acknowledgements*: This section will be included as the last paragraph, with no heading. “Official” names should not be translated.
- *Bibliography*: Same format as the scientific articles.

d) **General structure for a literature review**

This type of article includes literature reviews of a specific field of study related to the theme of the Journal. Authors may review the most relevant exponents, their main ideas and contributions, as well as conduct analyses and make comments based on sustained objective statements.

- Elements of a literature review article
 - Title (in English and Spanish).
 - Affiliation.
 - Keywords (in English and Spanish).
 - Abstract (in English and Spanish). Include the following in this section:
 - Objective of the study.
 - Topic addressed and its significance.
 - Periods or stages of the bibliographic information consulted in the analysis.
 - Main criteria for analyzing the bibliographic information consulted.
 - Main findings and conclusions.
 - Main applications, implications and recommendations.
 - Necessary information that would help the reader quickly identify the basic content of the paper and its relevance. The paper is semantically self-sufficient.

- Introduction: Establishes the objective or problem that motivated the review and includes the paper's organization criteria.
- Development: Specifies the bibliographic analysis
- Conclusions or discussions and pending matters.

e) **Manuscript stages**

1. Receiving date

Articles will be received throughout the year; however, the due date will be March 30th of each year to guarantee that the publication will appear on the volume of the corresponding year.

2. Delivery

The first version of the manuscript can be sent in digital form, together with the attached [statement of originality and copyright transfer agreement](#) duly completed and signed by all the authors, to the following emails: revmar@una.cr or revcienmarycos@gmail.com. It can alternatively be sent by postal mail to the following addresses:

Licda. Nidya Cecilia Nova Bustos Editor Revista Ciencias Marinas y Costeras Maestría en Ciencias Marinas y Costeras Universidad Nacional Apartado Postal 86-3000 Costa Rica	M. Sc. Luis Villalobos Chacón Director Revista Ciencias Marinas y Costeras Maestría en Ciencias Marinas y Costeras Universidad Nacional Apartado Postal 86-3000 Costa Rica
---	--

Content of the ***Statement of Originality and Copyright Transfer Agreement***

1. The article is original and has not been published: in other words, it is the intellectual production of the person(s) indicated above and has not been publicly shared with third parties by any printed or digital means.
2. The article has not been simultaneously submitted for publication in another printed or electronic journal or any other written media or editorial body. In case the article has already been submitted in another journal, please explain why it was not accepted and indicate the email of the journal where it was originally submitted.
3. The authors have not subscribed, with third parties, any transfer of intellectual proprietary rights agreements or use licenses regarding intellectual property rights for the submitted article that prevents them from licensing the Journal.

4. In case of collective authorship— whether works in which the authors have the same degree of involvement or those in which there is a lead author and one or more secondary authors— all authors have contributed intellectually to the paper.
5. In case of collective authorship (as specified in item 4), in relation to the recognition of participation levels assigned by the authors, they released *Revista Ciencias Marinas y Costeras* from any liability.
6. In case of collective authorship, all authors have read and approved the submitted manuscript. Therefore, we, the undersigned authors, appoint _____ as the corresponding author having sufficient authority to represent the other authors, on his/her capacity as the authorized agent.
7. The author(s) recognize(s) that the Journal does not necessarily endorse the statements expressed in the article.
8. The author(s) state(s) that all text **citations** in the paper and their corresponding bibliographic **references** have been properly sourced and credited.
9. The author(s) include(s) in the paper the permits or authorization from those who own the rights for use of tables and figures (illustrations, photographs, drawings, maps, diagrams, or other).
10. In case the submitted paper is accepted for publication, the author(s) **FREELY, EXCLUSIVELY, AND FOR AN INDEFINITE TERM** transfer(s) copyright(s) to Universidad Nacional (Costa Rica), for the following:
 - a. Graphics editing and proofreading of the entire paper or part of it.
 - b. The publication and reproduction of the entire paper or part of it, both in printed and electronic formats, including Internet and any other technology now known or to be known.
 - c. The translation of the paper or part thereof into any language or dialect.
 - d. The adaptation of the article to reading, sound, and voice recognition formats and any other representation or technical device available, enabling partial or complete access for the blind or persons with any other form of disability that prevents them to access the conventional reading of the article.
 - e. The distribution and availability of the article to the public, so that the public may access it from the time and place chosen by the reader, through the physical or electronic devices at the person's disposal.
 - f. The distribution of the paper through the Creative Commons BY-NC-SA license, version 4.0, which implies the possibility that readers download, store, copy, generate derived papers, and distribute the final approved and published version (*post print*) of the article, provided it is done for non commercial purposes, and the article is properly sourced and credited.
 - g. Any other use, process, or system known or to be known related to the editorial purposes and activities linked to the Journal.
11. Reuse Rights: at the same time, UNA grants **AUTHORS** the right to reuse, for any purpose, and to publish on the Internet or any website, the final approved and published version (*post print*) of the article, provided it is done for non-profit purposes.

12. The author(s) agree(s) that the submitted paper be adjusted, with their collaboration, by the Journal editing team to the “[Instructions to Authors](http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/revmar)” previously established and published in the Journal’s official website (<http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/revmar>); in terms of procedures, formatting, proofreading, editing, publication, duration of the editorial process and other requirements called for in those instructions.
13. The author(s) accept(s) that the Journal reserves the right to expeditiously remove or block access to the publications saved in its virtual platforms after obtaining actual knowledge of a complaint filed by a third party for an alleged infringement of copyright.
14. According to Law No. 8968, Personal Data Protection Law, the AUTHOR agrees to provide the Journal with an electronic mail address, as well as the personal data necessary for the identification of the authorship of the article: _____.
In addition, the author authorizes the Journal to publish, along with the article, the personal data necessary (name and last name, institution, city/country, email and ORCID number). Any personal data other than the one indicated above will be treated as absolutely confidential by the Journal and shall not be published or given to third parties without the AUTHOR’s consent.
15. The author(s) accept(s) that the application and possible publication of the article in *Revista Ciencias Marinas y Costeras* is governed by the editorial policies of the Journal, the institutional rules of Universidad Nacional de Costa Rica and the laws of the Republic of Costa Rica. In addition, in case of any possible difference of opinion or future dispute, it shall be settled in accordance with the mechanisms of Alternative Dispute Resolution and the Costa Rican jurisdiction.

The articles accepted by the *Journal of Marine and Coastal Sciences* become property of the Journal; the author and production rights are respected. The original manuscripts will not be returned.

3. Arbitration

The manuscripts that fulfill the thematic objectives of the Journal and adjust to the indicated format will be sent to at least two external evaluators who will review the document according to the “double blind” methodology and will make the necessary recommendations to improve them or declare them unacceptable. The Editorial Committee will send such observations to the author. If the article is accepted, but subject to modifications, the author will have a specific term to make such modifications and submit the manuscript again. Final approval of articles is granted by the Editorial Committee.

4. Galley proof and reprints

After the manuscript has been proofread, edited and accepted, the author will receive a final galley proof in PDF by email before the publication of the article. The authors will be responsible for the final review, making the minimum necessary changes and correcting any existing printing mistakes. The authors

should return the galley proof within a maximum period of one week from the date it was received. The delay in returning the galley proof may result in the publication of the article without the author's corrections.

Title of article: in Spanish and English. Centered, in bold, in capital letters, Times New Roman 14, double space.

**EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE
ESCHERICHIA COLI EN *CRASSOSTREA GIGAS*...
EVALUATION OF *ESCHERICHIA COLI*
CONCENTRATIONS IN *CRASSOSTREA GIGAS* ...**

Leave a space between section titles and the text.

Author(s): full name in italics, Times New Roman 11, double space, justified.

Luis A. Vega Corrales^{1} y Carolina Marín Vindas¹.*

¹Estación de Biología Marina Juan Bertoglia Richards, Universidad Nacional, Costa Rica. luis.vega.corrales@una.cr*

Include e-mail address of corresponding author. Marked with an asterisk.

Indicate all of the authors' institutional affiliation, place of work or physical address. Use numbered superscripts.

Leave a single space between the author(s) and the abstract.

Titles of section (Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Bibliography): left margin, in bold, in capital letters, Times New Roman 14.

RESUMEN

Costa Rica no cuenta con referencias sobre la calidad sanitaria de las zonas de cultivo de *Crassostrea gigas* y esto puede representar un riesgo para la salud pública...

Palabras claves: Contaminación marina, maricultura, *Escherichia coli*, *Crassostrea gigas*, Costa Rica.

Abstract: in Spanish and English. Times New Roman 10, justified, single space. Maximum length: 250 words.

ABSTRACT

Costa Rica does not have references on health quality of harvesting zones of *Crassostrea gigas*, which can pose a potential public health risk...

Keywords: Marine pollution, mariculture, *Escherichia coli*, *Crassostrea gigas*, Costa Rica.

Keywords subtitle: in bold, Times New Roman 11. Minimum and maximum 5 keywords, as required by databases.

Leave a space between section titles and the text.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos son vulnerables a la contaminación antropogénica. Según Halpern *et al.* (2008), no existen zonas marino costeras que no estén impactadas por la influencia humana...

Text: Times New Roman 12, double space, justified. Both lowercase and capital letters must have accents if in Spanish. Each paragraph must have a 5 character indentation. There should be no spaces between paragraphs within the same section.

...Estudios recientes han demostrado que las concen las zonas de cultivo de moluscos bivalvos dependen, entre muchos otros factores, de las condiciones climatológicas y estacionales del área (Peterson, 1960; CITES, 2011; Campos *et al.* 2013b; Derolez *et al.* 2013; Lee & Silk, 2013; Mignani *et al.* 2013).

Citation for one author.

Citation for more than 2 author publications.

Citation for different publications of the same author and year.

Citation for two author publications.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la contaminación por *E. coli* en las zonas de cultivo de ostras de Punta Cuchillo (9°49' 48" N y 84°52' 48" O) y de Punta Morales (10°4' 84" N y 84°58' 37" O), ubicadas en el Golfo de Nicoya, Costa Rica (Fig. 1).

Tables and figures must be delivered separately.

Use a decimal point rather than a comma.

Para la fase presuntiva se inoculó cada serie de cinco tubos de Lauryl Tryptose Broth (BD®) con 10, 1 y 0.1 mL de la muestra de agua... Para las muestras de ostras se homogeneizaron 25 g de carne y líquido intravalvar en 225 mL de Buffered Peptone Water (BD®). A partir de esta mezcla se prepararon las diluciones 1:100 y 1:1,000. De cada dilución se inocularon 5 tubos de Lauryl Tryptose Broth.

Thousands should be indicated with a comma.

The abbreviations used should conform to the international system of units (m, km, g, mg, %, PSU, °C).

BIBLIOGRAFÍA

Use "&".

Use letters to differentiate publications by the same author and year.

Campos, C. J. A., Acornley, R., Morgan, O. C. & Kershaw, S. (2013a). Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999-2008. *Mar. Pollut. Bull.*, 67(1-2), 223-227.

Periodicals: journal volume in italics and issue in parentheses. There should be no space between the volume and the issue. Initial and final pages separated with a hyphen.

Campos, C. J. A., Kershaw, S. R. & Lee, R. J. (2013b). Environmental influences on faecal indicator organisms in coastal waters and their accumulation in bivalve shellfish. *Estuaries Coasts*, 36(4), 834-853.

Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. & Trussell, R. R. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (17th ed.). Washington, EE:UU.: American Public Health Association, American Water Works Association.

Non-periodical publications: title of book in italics.

Non-periodical publications: Place: Publisher.

Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V, Micheli, F., D'Agrosa, C., ... Watson, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319 948-952.

When there are more than 7 authors, list the first 6 followed by "... " and write the last author.

Organization

IMN. Instituto Meteorológico Nacional. (2014). Clima en Costa Rica. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica. Recovered its in 22 January 2014, retrieved from <http://www.imn.ac.cr/educacion/CLIMA DE COSTA RICA.html>

CITES. (2011). *The CITES species. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. Ginebra, Suiza. Recuperado el 21 de septiembre, 2011, disponible en www.cites.org/eng/disc/species.php

R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org/>

Website: Retrieved from:
Website: Available at:

CUADROS Y FIGURAS

Tables and figures must be properly reduced (up to 60%) and their components must be properly sized to allow easy reading; the size of the font and the thickness of the lines should be properly visible and clear when reduced. The font already reduced should not be smaller than 8. The manuscript may include drawings and/or photographs; in the case of photographs, the journal will cover the cost of publishing them in black and white; otherwise, the author will cover the cost.

Tables should be numbered consecutively.

Cuadro 1. Criterios de clasificación de zonas de producción de moluscos bivalvos con base en muestras de agua de mar

Table 1. Shellfish harvesting zones classification criteria based in seawater samples

Title of table: in Spanish and English. It should be placed at the top of the table, in lower case and not in bold. Times New Roman 11, double space, justified.

Avoid vertical lines. Use horizontal lines only when they separate fields of information (headlines, subheadings, lower fields).

Category of classification	Faecal coliforms (MPN 100 mL ⁻¹)		Treatment required
	Geometric mean	90% compliance	
Approved areas	< 14	< 43	None.
Prohibited areas	No sanitary survey or conditions for approved/restricted areas not met.		Harvesting not permitted.

Reference: Lee *et al.* (2008)

You must indicate the source of the data.

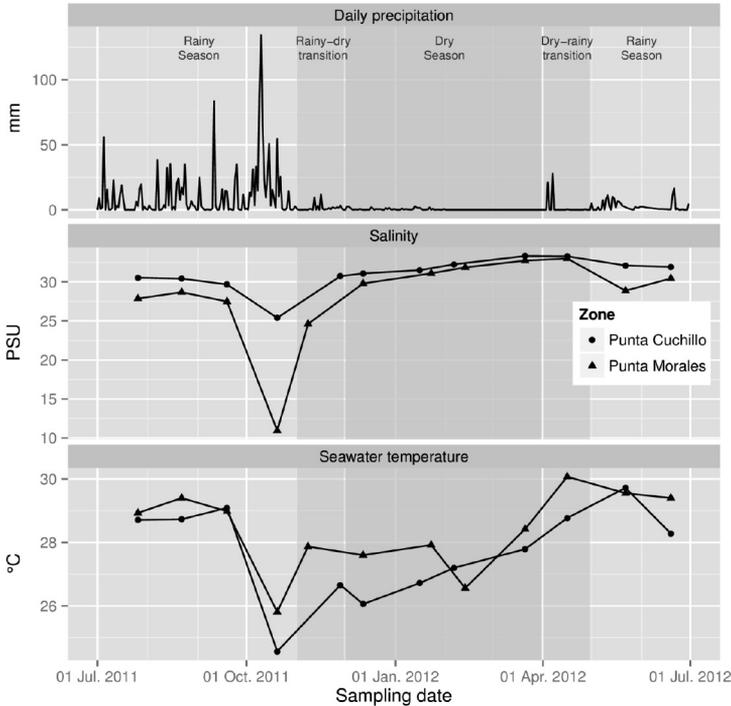


Fig. 3. Precipitación diaria (mm) y salinidad (UPS) y temperatura (°C) mensual registradas de julio de 2011 a junio de 2012 en las zonas de cultivo de *Crassostrea gigas* de Punta Cuchillo y de Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica. Se representan la estación seca, la estación lluviosa y los meses de transición establecidos para la zona de estudio por el Instituto Meteorológico de Costa Rica. Fuente precipitación: Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica

Fig. 3. Daily precipitation (mm) and salinity (PSU) and temperature (°C) registered monthly from July 2011 to June 2012 in the *Crassostrea gigas* harvesting zones of Punta Cuchillo and Punta Morales, Gulf of Nicoya, Costa Rica. It represented dry season, rainy season and the transition months established for the study zone by the Meteorological Institute of Costa Rica. Precipitation source: Meteorological Institute of Costa Rica

Title of figure: in Spanish and English. It should be placed at the bottom of the figure, in lower case and not in bold. Times New Roman 11, double space, justified.

Impreso por el Programa de Publicaciones e Impresiones
de la Universidad Nacional, en el 2021.

La edición consta de 122 ejemplares
en papel bond y cartulina barnizable.

2420-21—P.UNA