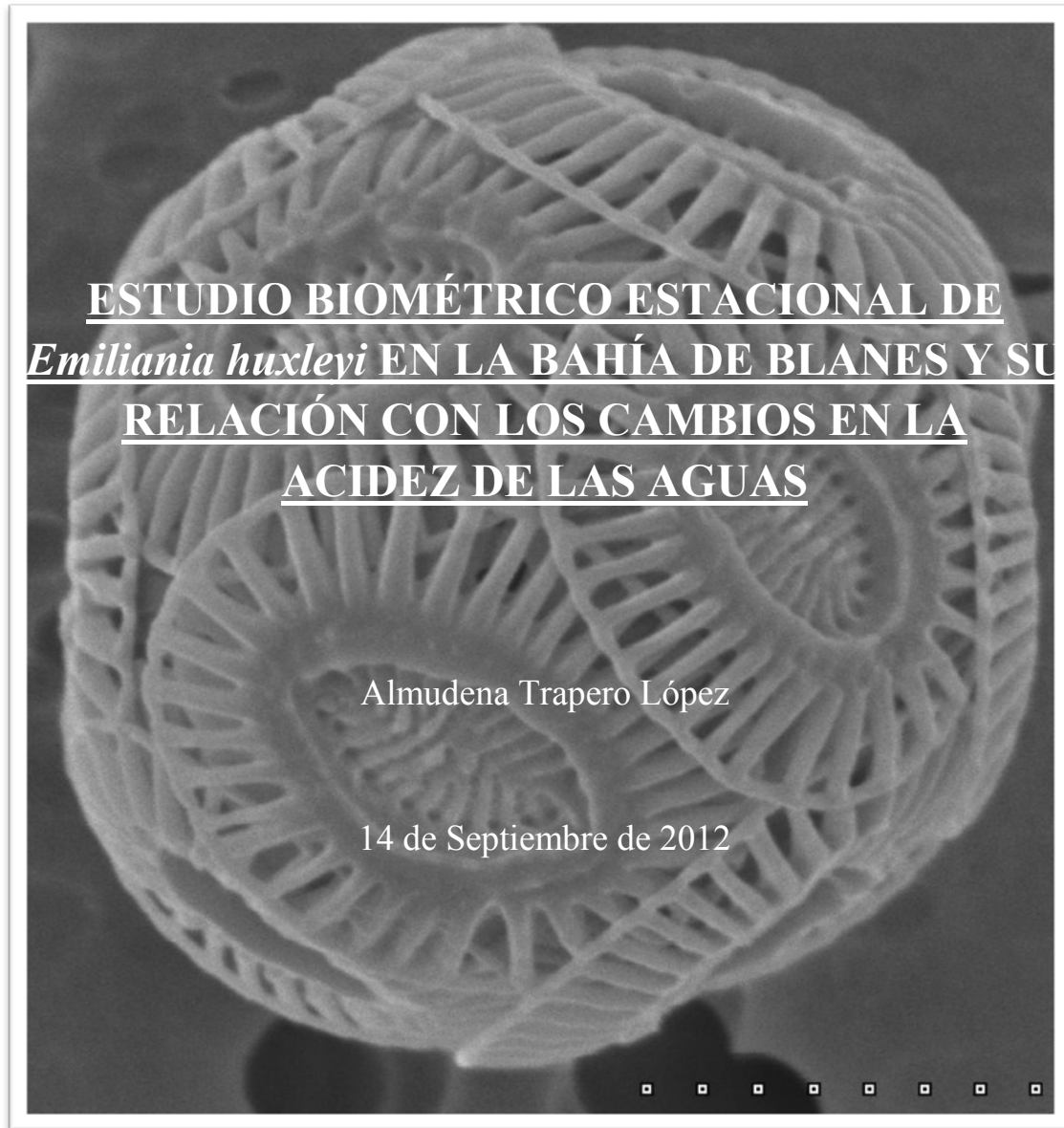


Master en Ciències del Mar: Oceanografia y Gestión del Medio Marino

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia



Directores: Carles Pelejero y Lluïsa Cros

Tutor: Antoni Calafat

Institut de Ciències del Mar, CSIC



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud por toda la ayuda prestada, totalmente incondicional, durante la realización del presente trabajo a los profesores Carles Pelejero y Lluïsa Cros.

A Carles Pelejero por todos sus consejos y por la gran ayuda con los programas para realizar las representaciones gráficas que se muestran en este trabajo.

A Lluïsa Cros por el soporte que me ha brindado desde el inicio de este trabajo durante las sesiones del microscopio, por aportarme tantos conocimientos de su gran experiencia y por enseñarme este mundo tan fascinante que son los cocolitóforos.

A José Manuel Fortuño por su paciencia con el software del microscopio SEM y por hacer que las fotografías de las cocosferas y de los cocolitos de *Emiliana huxleyi* salieran tan bien.

Finalmente, quiero agradecer a mi pareja toda la paciencia que ha tenido durante este último año, por aguantarme y a lo que está de camino, que espero que venga bien y le pueda explicar muchas cosas sobre los cocolitóforos.



## ÍNDICE

LISTADO DE ACRÓNIMOS	.iii
RESUMEN	...1
1. INTRODUCCIÓN	...2
1.1 <i>La progresiva acidificación de los mares y océanos</i>	....2
1.2 <i>Las algas cocolitoforales</i>	....3
1.3 <i>Efectos de la acidificación en <i>Emiliana huxleyi</i></i>	..5
1.4 <i>Objetivo del presente trabajo experimental</i>	...7
2. MATERIAL Y MÉTODOS	. 8
2.1 <i>Área de estudio y periodo de muestreo</i>	....8
2.2 <i>Muestras de agua y metodología utilizada</i>	. .10
2.3 <i>Observaciones al SEM. Medidas en cocosferas y cocolitos</i>	.....11
3. RESULTADOS	.14
3.1 <i>Parámetros morfológicos y su variación estacional</i>	.....14
3.2 <i>Variación estacional de los parámetros físico-químicos</i>	. ..23
4. DISCUSIÓN	.....23
5. CONCLUSIONES	.....25
REFERENCIAS	.....26

ANEXO: CD con la siguiente documentación:

1. *Fotografías de cocosferas y cocolitos distales y proximales realizadas con el microscopio SEM*
2. *Tablas Excel con todas las medidas de los parámetros morfológicos medidos*
3. *Representaciones gráficas de todos los parámetros morfológicos medidos*



## **LISTADO DE ACRÓNIMOS**

A continuación se detalla el listado de acrónimos utilizados en todo el trabajo:

CAL: Longitud del Area Central, del inglés Central Area Length.

CAW: Anchura del Area Central, del inglés Central Area Width.

COL: Longitud del Agujero Central, del inglés Central Opening Length.

COW: Anchura del Agujero Central, del inglés Central Opening Width.

DL: Longitud de la Capa Distal, del inglés Distal Length.

DW: Anchura de la Capa Distal, del inglés Distal Width.

INTL:Espesor Tubo Central (Eje Largo), Inner Tube Cycle Thickness Long Axis.

INTS:Espesor Tubo Central (Eje Corto), Inner Tube Cycle Thickness Short Axis.

LDE: Longitud de la parte radial de los Elementos Distales, del inglés Length (radial part) of Distal Elements.

LDE/WDE: Relación entre la Longitud y la Anchura de la parte radial de los Elementos Distales.

MLDE: Media de la Longitud de la parte radial de los Elementos Distales, del inglés Media of Length (radial part) of Distal Elements.

MWDE: Media de la Anchura de la parte radial de los Elementos Distales, del inglés Media of Width (radial part) of Distal Elements.

NDE: Número de Elementos Distales, del inglés Number of Distal Elements.

NPH: Número de Agujeros de la Capa Proximal, del inglés Number of Proximal Holes.

PL: Longitud de la Capa Proximal, del inglés Proximal Length.

PW: Anchura de la Capa Proximal, del inglés Proximal Width.

WDE: Anchura de la parte radial de los Elementos Distales, del inglés Width (radial part) of Distal Elements.





## **RESUMEN**

El aumento antropogénico del CO<sub>2</sub> atmosférico está afectando a la química del agua de mar, acidificando los océanos y afectando a la fisiología de muchos organismos marinos. Es esperable que este fenómeno afecte también a los cocolitóforos, que forman estructuras de carbonato cálcico y que, a través de la fotosíntesis, son importantes fijadores de CO<sub>2</sub> y organismos principales de la llamada bomba biológica, que constantemente transporta carbono desde la superficie de los océanos hasta las aguas más profundas y los sedimentos marinos, estabilizando el clima de la Tierra.

El estudio de los efectos de la acidificación sobre los cocolitóforos ha generado mucha controversia en los últimos años, habiendo autores que han llegado a la conclusión de que la tasa de calcificación de estos organismos disminuirá al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub>, mientras que otros han concluido todo lo contrario.

Trabajos recientes sugieren que algún morfotipo en concreto de *Emiliana huxleyi* podría ser más resistente en ambientes más ácidos que otros morfotipos, llegando a proponer que determinadas especies de cocolitóforos tendrían la capacidad para evolucionar hacia morfotipos más estables para poder adaptarse a condiciones más agresivas.

El presente trabajo estudia la variación estacional de una serie de parámetros biométricos de las cocosferas y cocolitos de *Emiliana huxleyi* en muestras de agua superficial de la Bahía de Blanes. Este análisis nos revela que tanto el tamaño de las cocosferas como el grosor de las estructuras de los cocolitos son menores en verano, cuando el pH del agua de mar es más bajo. No obstante, esta concordancia no encaja cuando los datos morfológicos se comparan con otros parámetros del sistema del CO<sub>2</sub> en agua de mar, apuntando hacia otros parámetros, como la temperatura, como moduladores más importantes de la calcificación de estos organismos.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. La progresiva acidificación de los mares y océanos**

El aumento antropogénico de los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico, debido principalmente a la quema de combustibles fósiles y a la deforestación, está provocando, además del calentamiento global, una progresiva acidificación de los océanos (Figura 1.1).

Este cambio crítico en la química del agua de mar tiene repercusiones en la fisiología de gran variedad de organismos marinos y, consecuentemente, en la ecología de los mares y los océanos.

Una gran parte del CO<sub>2</sub> emitido por las actividades humanas está siendo absorbido por los océanos, ya que el CO<sub>2</sub> se disuelve en el agua de mar participando en una serie de reacciones y equilibrios químicos ((1) en la Figura 1.1), cuyo resultado es el aumento de la concentración de los iones bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e hidrógeno (H<sup>+</sup>) y, por lo tanto, la disminución del pH del agua de mar. Esto también conlleva una disminución de la concentración de iones carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), afectando al estado de saturación del carbonato cálcico precipitado ( $\Omega$  en (2) de la Figura 1.1). Los organismos que, de una manera más obvia, deberían verse más afectados son aquellos que forman conchas y esqueletos de carbonato cálcico. Estudios experimentales han demostrado que estos cambios en la química del agua de mar hacen más difícil la calcificación, y más débiles las estructuras sólidas generadas (Pelejero et al., 2010)

Los organismos marinos pueden precipitar el carbonato cálcico en forma de calcita (e.g. muchos cocolitofóridos y también foraminíferos) o en forma de aragonita (e.g. pterópodos, corales). La calcita es termodinámicamente más estable que la aragonita. La tendencia a disolverse de estas dos formas cristalinas depende del estado de saturación de cada fase en particular que, a su vez, depende de la concentración de los iones calcio y carbonato en el agua de mar. A escalas de tiempo cortas (< de 1 millón de años), la concentración de iones calcio en el agua de mar no ha variado considerablemente, por lo que el parámetro crítico en la determinación del estado de saturación es la concentración de ión carbonato, que sí que está cambiando de manera drástica, dando lugar a una reducción en los valores de  $\Omega$  del agua de mar. La

precipitación de carbonato cálcico es termodinámicamente estable cuando el valor de  $\Omega$  es superior a 1 (aguas supersaturadas) y desfavorable cuando es inferior a 1 (aguas insaturadas).

Una de las reacciones de precipitación del carbonato cálcico es la (3) de la Figura 1.1. Como podemos observar, cuando los organismos marinos calcifican, se produce una liberación de  $\text{CO}_2$  en las aguas colindantes. La cantidad de  $\text{CO}_2$  liberado por mol de carbonato cálcico precipitado depende de muchos factores, como la temperatura, salinidad,  $\text{pCO}_2$ , etc (Frankignoulle et al., 1994). Actualmente, el  $\text{CO}_2$  liberado por mol de carbonato cálcico precipitado está alrededor de 0.6, pero este valor está aumentando a medida que la concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico aumenta (Frankignoulle et al., 1994).

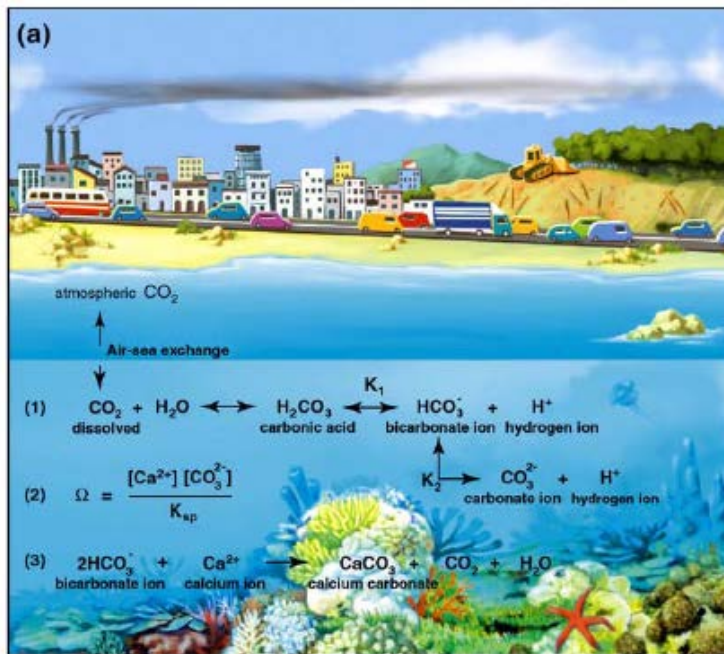


Figura 1.1. Vista esquemática de la perturbación antropogénica del ciclo del carbono que ocurre cuando parte del  $\text{CO}_2$  emitido por la combustión de combustibles fósiles y la deforestación es absorbido por los océanos (Pelejero et al, 2010)

## 1.2. Las algas cocolitoforales

Las llamadas algas cocolitoforales o cocolitóforos (portadores de cocolitos), también conocidas como cocolitoforidos, son microalgas (mayoritariamente marinas y plantónicas) que, de forma continuada o en algún momento de su ciclo de vida, forman unas estructuras de carbonato cálcico llamadas cocolitos. Todavía no se conoce bien la función de estos cocolitos, pero se sabe que juegan un papel muy importante en el ciclo del carbono (Westbroek, 1991). Estas microalgas, organismos unicelulares fotoautotróficos, son capaces de

formar grandes proliferaciones (blooms) en los océanos que a menudo cubren millones de km<sup>2</sup> y pueden incluso ser vistos desde el espacio (Moore et al., 2012; Holligan et al., 1993; Tyrell and Young, 2009) (Figura 1.2.).

A través de la fotosíntesis, los cocolitóforos son importantes fijadores de CO<sub>2</sub> y uno de los organismos principales de la llamada bomba biológica, que constantemente transporta carbono desde la superficie de los océanos hasta las aguas más profundas y los sedimentos marinos, una acción que ayuda a estabilizar el clima de la Tierra (Falkowski 2012).

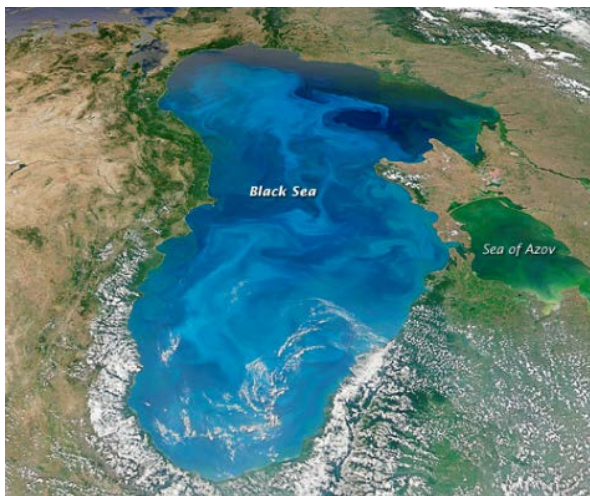


Figura 1.2. Imagen capturada por el satélite Aqua de la NASA, el 15 de julio del 2012, donde se observa un bloom de fitoplancton, probablemente cocolitóforos, sobre la superficie del Mar Negro (<http://earthobservatory.nasa.gov/IOTD/view.php?id=78705>)

Estos cocolitos que rodean la célula forman una envoltura esférica llamada cocsfera (Figura 1.3.). Las cocsferas suelen estar constituidas por un solo tipo de cocolitos, aunque se encuentran especies y géneros formadas por diferentes tipos de cocolitos. La morfología de los cocolitos se utiliza de manera habitual para clasificar las diferentes especies.

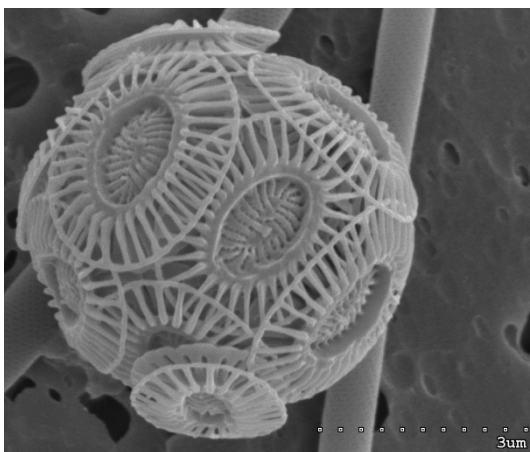


Figura 1.3. Cocsfera de *Emiliana huxleyi* fotografiada en la muestra de primavera (17/05/2011) del presente trabajo, mediante microscopía electrónica en el Institut de Ciències del Mar.

Existen dos tipos de cocolitos muy diferentes estructuralmente, los heterococolitos y los holococolitos, formados por diferentes tipos de biomineralización. Los heterococolitos están formados por unidades cristalinas de forma y tamaño variable, su biomineralización es intracelular y se producen a partir del primer anillo formador del cocolito (“proto-coccolith ring”) (Manton & Leedale, 1969; Inouye & Pienaar, 1988; Westbroek et al., 1989; Young, 1989; Fresnel, 1989). Los holococolitos están formados por numerosos cristales diminutos ( $< 0,1 \mu\text{m}$ ) y su calcificación parece ser extracelular (Manton & Leedale, 1963; Klaveness, 1973; Rowson et al., 1986) sucediendo dentro del periplasto (de Vrind-de Jong et al., 1994). Existe un tercer grupo de cocolitos, que se caracterizan por poseer formas poco simétricas y por no tener la cristalización de los otros dos grupos mencionados, denominado nanolitos. Los cocolitos que construye la microalga *Emiliana huxleyi*, sobre la cual se centra el presente trabajo, pertenecen al grupo de los heterococolitos. Es importante resaltar que *E. huxleyi*, de la familia Noëlaerhabdaceae, es la especie cocolitoforal más abundante en los océanos actuales (Paasche, 2002).

### **1.3. Efectos de la acidificación en *E. huxleyi***

Como hemos mencionado anteriormente, los cambios producidos en la química del agua de mar debidos al aumento antropogénico del  $\text{CO}_2$  atmosférico, están afectando la fisiología de determinados organismos marinos, incluyendo a aquellos que forman conchas y esqueletos de carbonato cálcico.

*A priori*, la progresiva acidificación de los océanos debería afectar especialmente los cocolitóforos, ya que construyen estructuras de carbonato cálcico que deberían verse afectadas a medida que las aguas se vuelven más corrosivas. No obstante, el estudio de los efectos de la acidificación sobre estos organismos ha generado mucha controversia en los últimos años.

Algunos autores (e.g. Riebesell et al., 2000) concluyeron inicialmente que los cocolitóforos disminuyen su tasa de calcificación al aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, otros trabajos apuntaron hacia lo contrario. Por ejemplo, Beaufort et al. (2007), en sus experimentos a diferentes niveles de pH, concluyeron que el peso y el tamaño de los cocolitos no variaba significativamente con la acidificación; tampoco había evidencias de aumento

de la disolución de los cocolitos con la profundidad entre 250 m y 2500 m. Posteriormente, Iglesias-Rodríguez et al. (2008), en un estudio con diferentes cultivos de *E. huxleyi*, encontraron un aumento de la tasa de calcificación al aumentar los niveles de pCO<sub>2</sub>. Este trabajo en particular generó mucha controversia, y motivó la realización de nuevos estudios para intentar aclarar la cuestión.

Un trabajo muy interesante que aportó más información fue el de Langer et al. (2009), que concluyó que no había una respuesta uniforme de los cocolitóforos a la acidificación, ni siquiera entre diferentes cepas de la misma especie *E. huxleyi*. Todo ello parece indicar que la afectación de estos organismos a la acidificación depende de la base genética de cada cepa en particular.

Más recientemente, Beaufort et al. (2011), encontraron, mediante el análisis de cocolitos en la columna de agua y en sedimentos marinos, la existencia de un patrón global que apuntaba a una disminución de la calcificación de los cocolitóforos con el incremento de la presión parcial del CO<sub>2</sub> y con la disminución de la concentración de iones CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Como única excepción, los autores de este trabajo descubrieron un morfotipo de *E. huxleyi* en zonas concretas de la costa de Chile y de Argentina que presentaba estructuras fuertemente calcificadas a pesar de vivir en aguas con bajos niveles de pH.

Según Bach et al. (2012), todavía no se conoce exactamente cómo los cambios en las tasas de calcificación de *E. huxleyi* se reflejan en el tamaño del cocolito, en el peso y en la tasa de exocitosis (número de cocolitos formados y expulsados por día). Lo que sí se conoce mejor es la influencia de la química del carbonato en la aparición de malformaciones en los cocolitos de *E. huxleyi* (Langer et al., 2010, 2011). La pregunta clave es qué parámetro de la química del carbonato está actualmente causando malformaciones en *E. huxleyi*, todavía sin una respuesta.

Actualmente, sigue habiendo mucha controversia sobre el efecto de la acidificación en la calcificación de las microalgas calcáreas, aunque se ha encontrado que algún morfotipo en concreto de *E. huxleyi* podría ser más resistente en ambientes más ácidos que otros morfotipos, como sugieren Smith et al. (2012). En este trabajo, centrado en la Bahía de Vizcaya, los autores

observaron que, en invierno, cuando las condiciones de pH y  $\Omega$  de calcita eran las más bajas, dominaba en un 90% el morfotipo más sobrecalcificado.

Ello podría hacer pensar que determinadas especies de cocolitóforos tendrían la capacidad para evolucionar hacia morfotipos más estables para poder adaptarse a condiciones más agresivas, pero hay pocas evidencias sobre esto y habrá que investigar más en el futuro.

#### **1.4. Objetivo del presente trabajo experimental**

En el presente trabajo estudiaremos, mediante un análisis exhaustivo de fotografías al microscopio electrónico, la variación estacional de determinados parámetros biométricos de los cocolitos y cocosferas de *E. huxleyi* en muestras de agua superficial de la Bahía de Blanes, para determinar qué tipo de relación existe entre la formación de estas estructuras y la química de las aguas. Un trabajo similar se publicó recientemente en base a muestras del Mar Egeo, en el cual se encontraron claros cambios estacionales en las dimensiones de los cocolitos (Triantaphyllou et al , 2010).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudio y periodo de muestreo**

El área de estudio se centra en el Mediterráneo Noroccidental, concretamente en la Bahía de Blanes, en el Blanes Bay Microbial Observatory (<http://www.icm.csic.es/bio/projects/icmicrobis/bbmo/>) (Gutiérrez-Rodríguez et al, 2011).

El punto de muestreo está localizado a 800 m de la costa, en una zona de 20 m de profundidad, en las coordenadas 41° 40'N, 2° 48'E (Fig. 2.1). Las aguas analizadas son superficiales, y se analizan periódicamente unas 14 veces al año.



[Fig. 2.1. Mapa de localización del área de estudio y del punto de muestreo \(Google Earth\).](#)

En la Figura 2.2. se puede observar la evolución temporal correspondiente a un ciclo anual en determinados parámetros fisicoquímicos, que incluyen medidas correspondientes a 14 muestras de agua que abarcan el período de estudio del presente trabajo, desde el 6 de Julio de 2010 hasta el 5 de Julio de 2011.

Para poder realizar el estudio de la variación estacional de *E. huxleyi* y poder estudiar posibles relaciones con los cambios en la química de las aguas, se seleccionaron 4 muestras, correspondientes a verano, otoño, invierno y primavera (03/08/2010, 16/11/2010, 08/02/2011 y 17/05/2011 respectivamente)



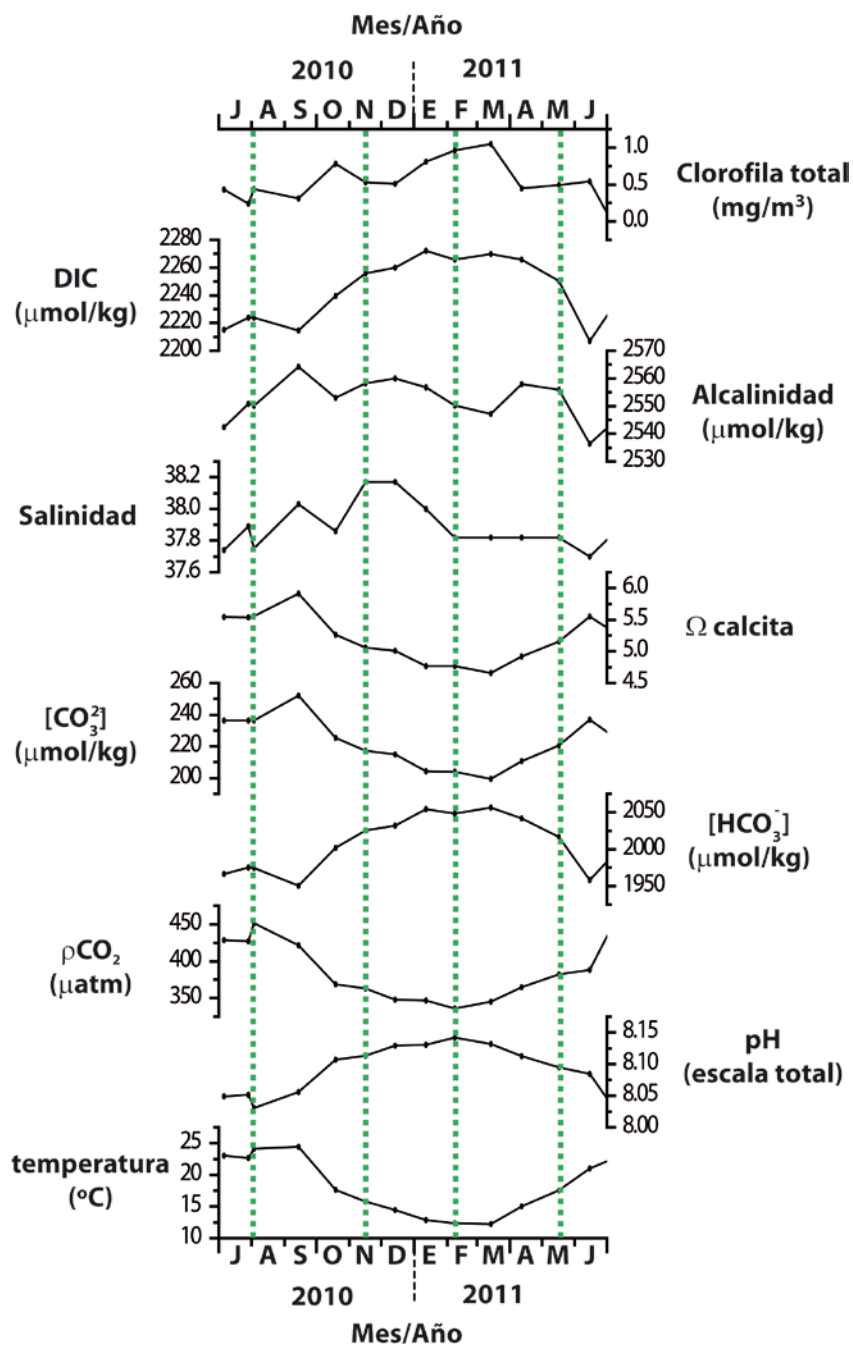


Fig. 2.2. Ciclo anual de determinados parámetros fisicoquímicos de la serie de Blanes correspondientes al periodo de estudio (las líneas verdes verticales punteadas marcan las fechas de las 4 muestras estudiadas en el presente trabajo, correspondientes a verano, otoño, invierno y primavera (03/08/2010, 16/11/2010, 08/02/2011 y 17/05/2011, respectivamente).

En estas muestras, el número de cocosferas por litro totales y de *E. huxleyi*, contadas por Lluïsa Cros, se detallan en la Tabla 1.

Día muestreo	3 Agosto 2010	16 Noviembre 2010	8 Febrero 2011	17 Mayo 2011
<i>Emiliana huxleyi</i> (cocosferas/L)	25448	31103	24918	5700
Total cocosferas/L	41883	46654	36581	30780

Tabla 1. Número de cocosferas (*E. huxleyi* y totales) por litro en las muestras seleccionadas.

Para comparar con los datos biométricos de los cocolitos y cocosferas obtenidos en este trabajo, hemos seleccionado una serie de parámetros físico-

químicos que se determinan periódicamente en la serie temporal de Blanes, en concreto temperatura, pH, salinidad, alcalinidad y clorofila total (Tabla 2).

A partir de ellos se pueden derivar otros parámetros como la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>), las concentraciones de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, y el estado de saturación (Ω) de la calcita. Además de presentar la variación temporal de estos parámetros en la Figura 2.2, en la Tabla 2 mostramos los valores *in situ* de estos parámetros para las cuatro muestras seleccionadas.

Fecha	Tª	pH	pCO <sub>2</sub> (uatm)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (umol/kg)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (umol/kg)	OmegaCa	Salinidad	Alcalinidad (umol/kg)	DIC (umol/kg)	Chl. Total
03/08/2010	24,1	8,031	452	1975	236	5,55	37,8	2550	2224	0,44
16/11/2010	15,8	8,113	363	2026	217	5,06	38,2	2558	2256	0,53
08/02/2011	12,4	8,142	336	2048	204	4,77	37,8	2550	2266	0,96
17/05/2011	17,6	8,095	382	2017	220	5,15	37,8	2556	2250	0,49

[Tabla 2. Parámetros físico-químicos medidos, \*in situ\*, en las muestras de agua seleccionadas.](#)

## **2.2. Muestras de agua y metodología utilizada**

Las muestras de agua fueron recogidas en superficie, en el punto de muestreo de Blanes (41° 40'N, 2° 48'E), y se trasladaron rápidamente para su filtración y tratamiento al laboratorio del Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona.

Se filtraron 100 ml de agua de mar usando una bomba de vacío sobre un filtro Nucleopore de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0,8 μm de tamaño de poro. Kleijne (1991) y Cros (2001) consideran que este tipo de filtros tienen las mejores propiedades para permitir la observación de los cocolitóforos más pequeños). Otro filtro con tamaño de poro de 3 μm (normalmente de nitrato acetato de celulosa de Millipore) se colocó debajo del filtro de policarbonato, con el fin de obtener una distribución uniforme de las partículas filtradas (Cros y Estrada, 2004).

Se eliminó la sal lavando los filtros con aproximadamente 1 ml de agua mineral embotellada. Los filtros se secaron al aire bajo una bombilla encendida o en estufa a 50°C (aprox. 5-10 min) y fueron conservados bajo vacío parcial en cajas herméticamente cerradas, hasta su posterior preparación para el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (Cros y Fortuño, 2002).

### **2.3. Observaciones al SEM. Medidas en cocosferas y cocolitos**

Una parte de los filtros de policarbonato, se colocaron en el soporte para el SEM con plata coloidal y se revistieron con oro-paladio. El grosor de la capa de metalizado fue de 200 Å.

Las muestras fueron observadas y los especímenes fotografiados con el Microscopio Electrónico de Barrido marca Hitachi S-3500 N operando a 5 kV. (Institut de Ciències del Mar, Departament de Microscopia, J. Manuel Fortuño).

Todas las fotografías realizadas, tanto de cocosferas como de cocolitos distales y proximales de *E. huxleyi*, quedan recogidas en el CD adjunto como Anexo.

Los parámetros morfológicos medidos, tanto en las fotografías de cocosferas como en las fotografías de cocolitos distales y proximales (Triantaphyllou et al., 2010), fueron calculados con el Software de Análisis de Imagen Image J (Abràmoff, 2004) (Figs. 2.3, 2.4 y 2.5). Las longitudes medidas en las fotografías fueron calibradas a partir del tamaño de la barra en micras registrada en cada fotografía SEM.

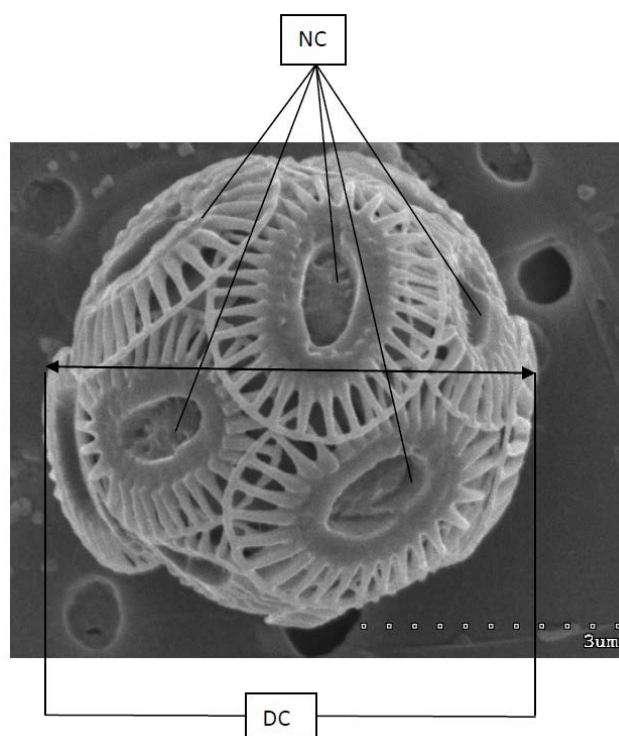


Figura 2.3. Parámetros medidos en las cocosferas de *E. huxleyi*  
(NC: Numero de Cocolitos Cocosfera; DC: Diámetro Cocosfera).

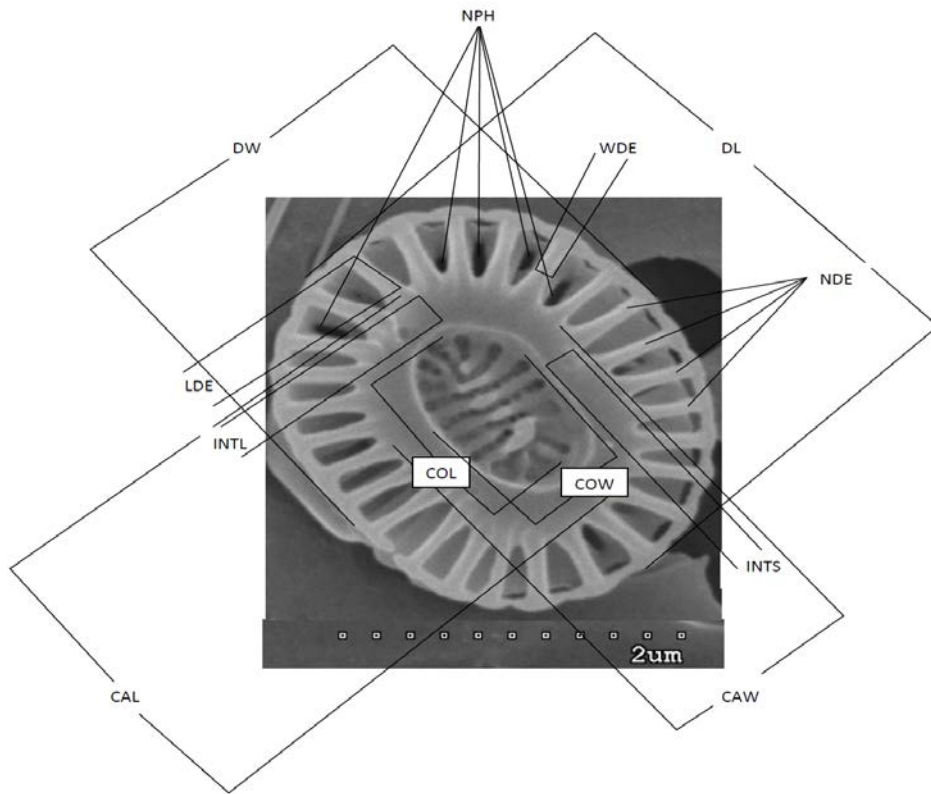


Figura 2.4. Parámetros medidos en los coccolitos distales de *E. huxleyi*

(DL: Longitud Distal ; DW: Anchura Distal; COL: Longitud Agujero Central; COW: Anchura Agujero Central ; CAL: Longitud Area Central ; CAW: Anchura Area Central ; NDE: Numero Elementos Distales; LDE: Longitud Elementos Distales; WDE: Anchura Elementos Distales; NPH: Número Agujeros Capa Proximal; INTL: Inner Tube Cycle Thickness Long Axis; INTS: Inner Tube Cycle Thickness Short Axis).

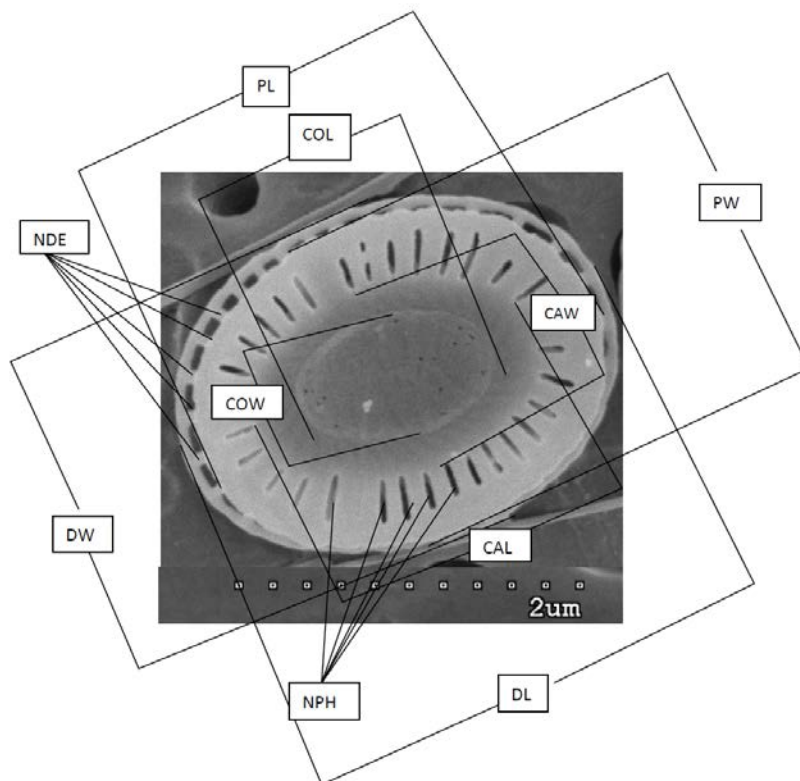


Figura 2.5. Parámetros medidos en los coccolitos proximales de *E. huxleyi*

(PL: Longitud Proximal; PW: Anchura Proximal; DL: Longitud Distal ; DW: Anchura Distal; COL: Longitud Agujero Central; COW: Anchura Agujero Central ; CAL: Longitud Area Central ; CAW: Anchura Area Central ; NDE: Número Elementos Distales; NPH: Número Agujeros Capa Proximal).

Las medidas abreviadas INTL e INTS en la Fig. 2.3 no fueron tomadas directamente sino que se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{INTL (Inner Tube Cycle Thickness Long Axis)} = (\text{CAL} - \text{COL}) / 2$$

$$\text{INTS (Inner Tube Cycle Thickness Short Axis)} = (\text{COW}) / 2$$

Estas medidas son las mismas tanto para los cocolitos distales como proximales, pero en este trabajo se encuentran ilustradas únicamente en la Figura 2.3.

Dado que en las fotografías de cocosferas únicamente se pueden contar los cocolitos que se observan en una de las caras, hicimos una aproximación contando los cocolitos enteros de la cara de delante, los multiplicamos por 2 y sumamos los cocolitos que están de lado en el borde de la cocosfera.

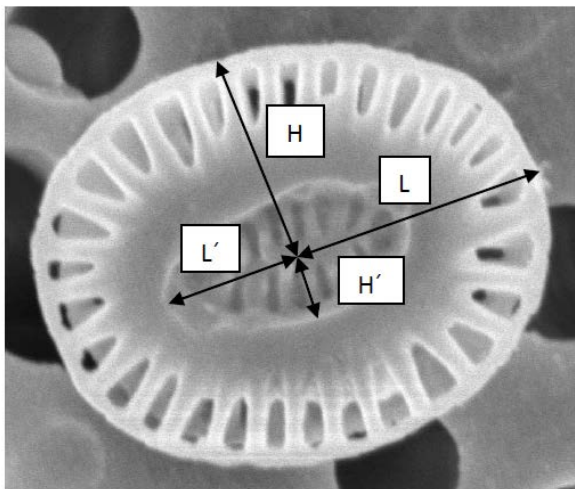
Además de todos los parámetros representados en las Figuras 2.3, 2.4 y 2.5, se calculó también el tanto por ciento de superficie ocupada por el agujero central (Figura 2.6) de la siguiente manera:

$$\text{Área 1} = \pi (L \times H)$$

$$\text{Área 2} = \pi (L' \times H')$$

$$\% \text{ superficie ocupada por agujero central} = (\text{Área 2} / \text{Área 1}) \times 100$$

Este cálculo se realizó tanto para las fotografías de cocolitos distales como proximales, comparándose entre ellas para examinar la existencia de posibles diferencias.



[Figura 2.6. Medidas realizadas para el cálculo del % de superficie ocupada por el agujero central.](#)

Una vez realizadas todas las medidas descritas anteriormente (incluidas en el CD adjunto), procedimos a la representación gráfica de todos los parámetros morfológicos por estaciones para poder comparar los resultados y ver la variación estacional de los mismos. Estas representaciones se efectuaron con el software Origin Pro 8 (tanto los histogramas como los diagramas de caja y los cuadros estadísticos) y se incluyen en el siguiente apartado de resultados y discusión.

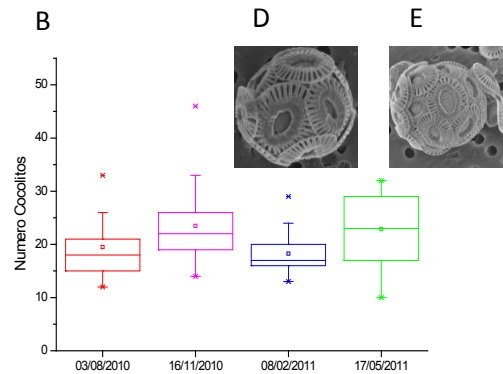
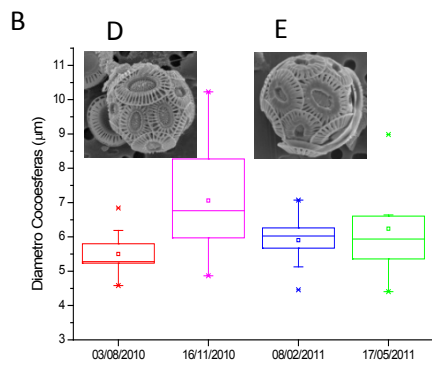
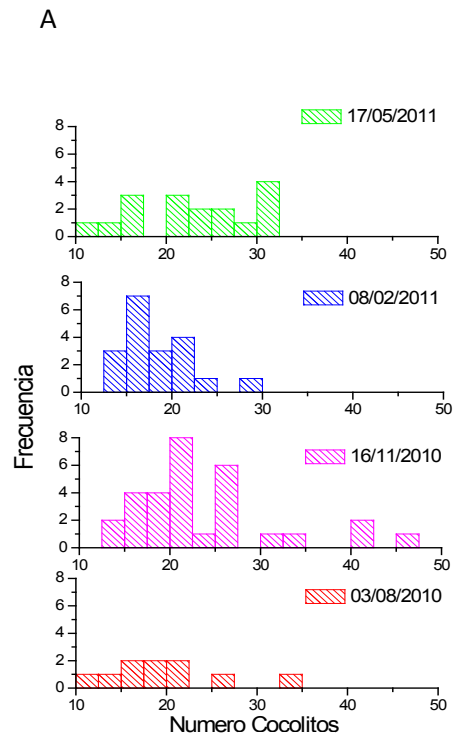
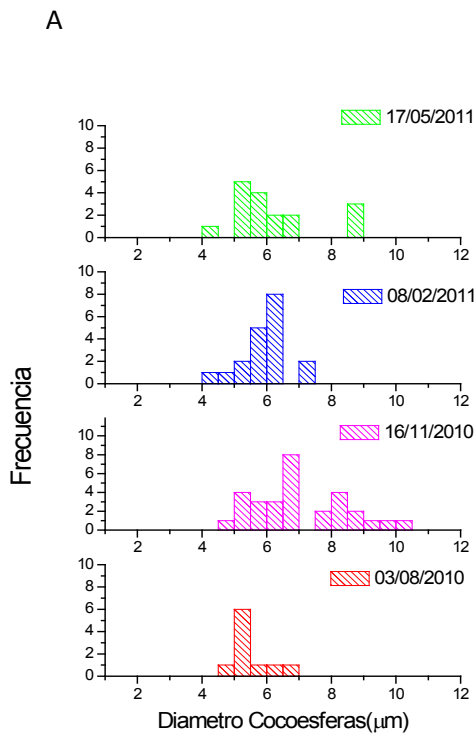
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Parámetros morfológicos y su variación estacional**

Debido al gran volumen de resultados obtenidos, para su inclusión en el documento escrito únicamente seleccionamos las representaciones gráficas más representativas y aquellas donde se observa una mayor variación estacional de los parámetros morfológicos.

El diámetro de las cocosferas (DC) varía entre 4 y 10  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 5 y 7  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.1C). Observamos que hay variación estacional, siendo las cocosferas más grandes en invierno y otoño (6-7  $\mu\text{m}$ ), mientras que en verano las encontramos más pequeñas (ca. 5  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 3.1E y 3.1D). También observamos que hay una gran variabilidad de diámetros en otoño, cosa que no se observa en las demás estaciones (Fig. 3.1A).

El número de cocolitos de las cocosferas (NC) varía entre 10 y 46, aunque mayoritariamente se encuentran entre 15 y 30 (Figs. 3.2A, 3.2B y 3.2C). Observamos que también hay variación entre las diferentes estaciones, destacando que la mayoría de cocosferas en la estación de invierno tienen alrededor de 15 cocolitos (Fig. 3.2D). En las demás estaciones, en general, se observa un mayor número, tal y como podemos observar en la imagen de la Figura 3.2E. Si lo comparamos con el diámetro de las cocosferas, vemos que el patrón es muy similar (Figs. 3.1B y 3.2B), llegando a la conclusión de que en invierno las cocosferas son más grandes pero tienen menor número de cocolitos (Figs. 3.1E y 3.2D).



C

	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	10	5,4989	0,62778	4,584	5,2855	6,84
16/11/2010	30	7,05783	1,41347	4,868	6,7685	10,226
08/02/2011	19	5,90263	0,69671	4,46	6,028	7,075
17/05/2011	17	6,23876	1,33439	4,405	5,94	8,982

C

	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	10	19,5	6,24055	12	18,5	33
16/11/2010	30	23,46667	7,89471	14	22	46
08/02/2011	19	18,26316	3,92771	13	17	29
17/05/2011	17	22,88235	6,87279	10	23	32

Figura 3.1: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para el Diámetro de las Cocosferas (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocosferas de verano e invierno respectivamente).

Figura 3.2: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para el Número de Coccolitos (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocosferas de invierno y primavera respectivamente).

En cuanto a la longitud de la capa distal (DL), varía entre 1,8 y 4,8  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 3 y 4  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.3A y 3.3C). En este caso no se observa tanta variación estacional como en los anteriores parámetros morfológicos (Figs. 3.3D y 3.3E), destacando que en la estación de verano es cuando son más pequeños (Fig. 3.3B). Cabe destacar que en la estación de primavera la longitud de la capa distal se concentra mayoritariamente entre 3,4 y 3,6  $\mu\text{m}$ , un rango muy estrecho de valores en comparación con las demás estaciones (Fig. 3.3A).

Respecto a la anchura de la capa distal (DW), varía entre 1,2 y 4,3  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.4A y 3.4B). La variación estacional es prácticamente igual a la que observamos para la longitud de la capa distal, siendo más pequeña para la estación de verano (Figs. 3.4D y 3.4E).

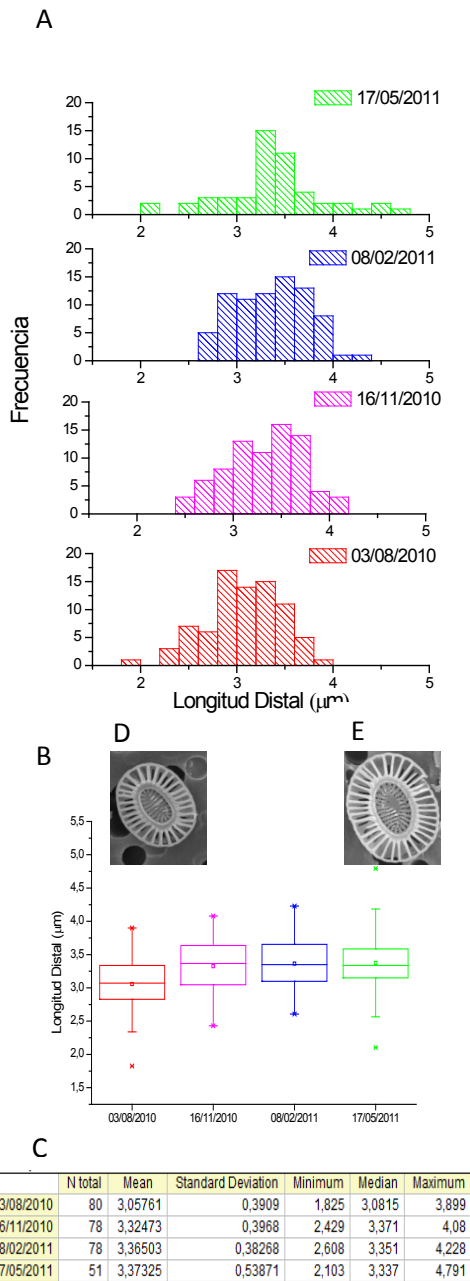


Figura 3.3: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Longitud de la Capa Distal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico ; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano y primavera respectivamente).

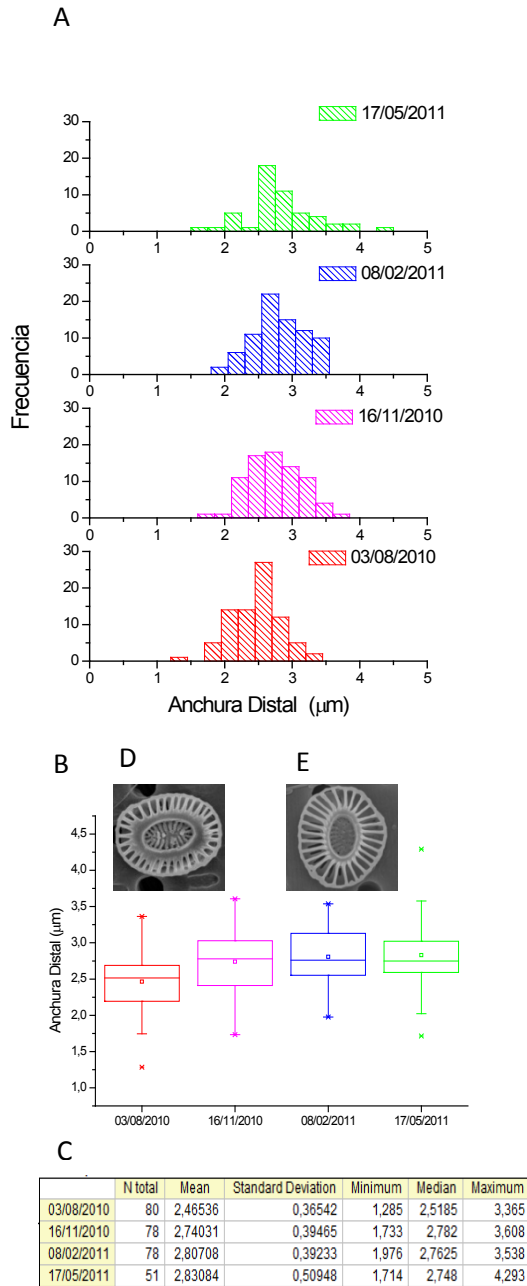


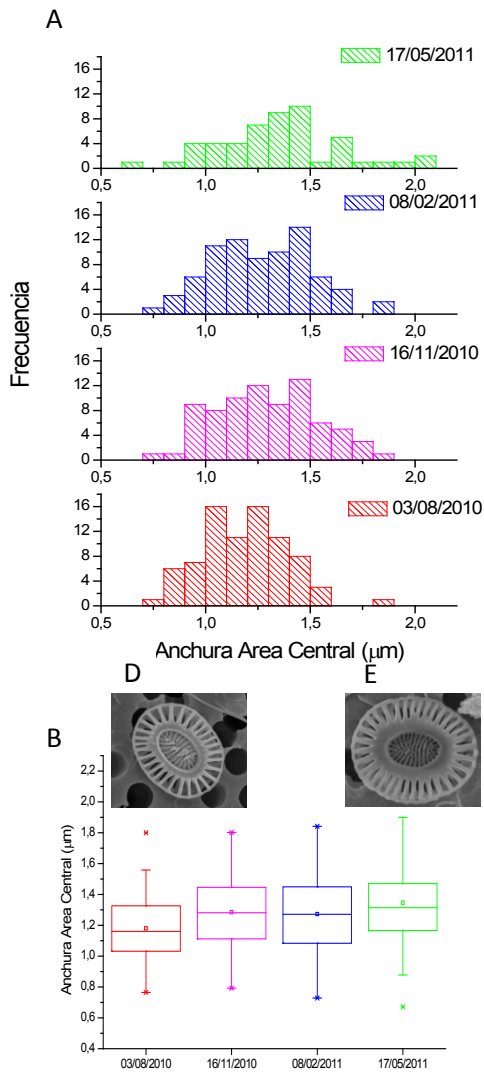
Figura 3.4: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Anchura de la Capa Distal (A: Histograma; B: Diagramas de Caja,; C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).



La anchura del área central (CAW) de los cocolitos distales varía aproximadamente entre 0,7 y 2  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.5A y 3.5C). En cuanto a la variación estacional, observamos que los valores más pequeños los encontramos en la estación de verano (~1-1,25  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.5D)). En las demás estaciones, el patrón de variación es muy similar, obteniendo valores más grandes que en la estación de verano y concentrándose éstos entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.5B). Hay que destacar que en la estación de primavera es donde se observa mayor variabilidad, obteniendo valores entre 0,6 y 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.5E).

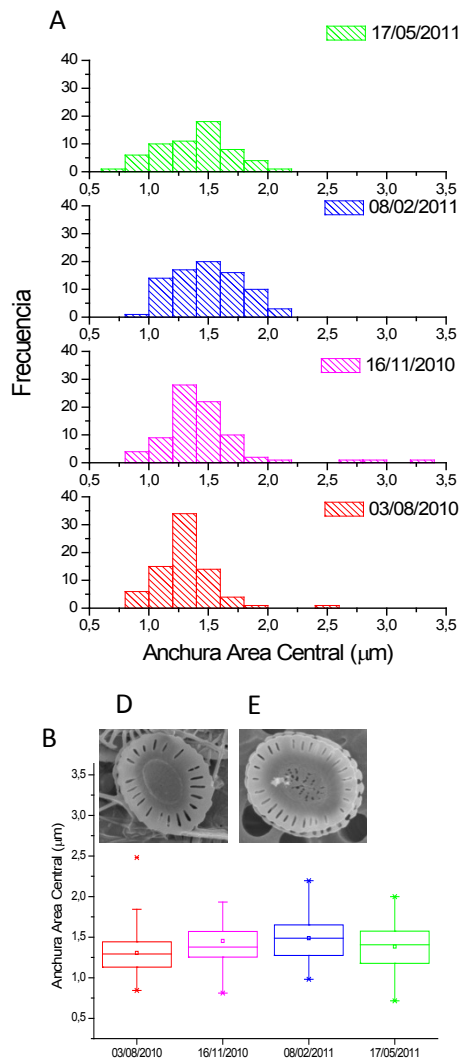
La anchura del área central (CAW) de los cocolitos proximales varía entre 0,7 y 3,3  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.6A y 3.6B). Observamos una variación estacional muy característica, encontrando los valores más grandes en la estación de invierno y los valores más pequeños en la estación de verano (Figs. 3.6B y 3.6D); hay que destacar que en la estación de otoño encontramos valores muy altos, entre 2,5 y 3,5  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.6A y 3.6E). Respecto a INTL, varía entre 0,09 y 0,6  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 0,15 y 0,4  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.7A y 3.7C). En este caso, encontramos una variación estacional muy marcada, encontrando los valores más pequeños en las estaciones de primavera y verano y los valores más grandes en las de otoño e invierno (Figs. 3.7D y 3.7E). También hay que destacar que el patrón de variación es muy similar entre las estaciones de verano y primavera y entre las estaciones de otoño e invierno, habiendo mayor variabilidad en estas últimas (Fig. 3.7B).

En cuanto a INTS, varía entre 0,03 y 0,6  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente se encuentran entre 0,15 y 0,35  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.8A y 3.8C). La variación estacional que encontramos en este parámetro es muy similar a la del parámetro anterior, los valores más pequeños los encontramos en las estaciones de verano y de primavera y los valores más grandes en las estaciones de invierno y otoño (Figs. 3.8D y 3.8E). También observamos que la estación de verano presenta un patrón de variación muy concreto, moviéndose los valores mayoritariamente entre 0,15 y 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.8B).



	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	80	1,18036	0,19989	0,765	1,172	1,8
16/11/2010	78	1,28418	0,23879	0,792	1,286	1,802
08/02/2011	78	1,273	0,23793	0,729	1,2715	1,842
17/05/2011	51	1,346	0,29208	0,671	1,314	2,071

Figura 3.5: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Anchura del Área Central de los Coccolitos Distales (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de coccolitos distales de verano y primavera respectivamente).



	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	75	1,30532	0,24319	0,843	1,292	2,48
16/11/2010	79	1,4518	0,37581	0,811	1,378	3,286
08/02/2011	81	1,48678	0,29001	0,98	1,486	2,195
17/05/2011	59	1,38459	0,29023	0,716	1,405	2

Figura 3.6: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Anchura del Área Central de los Coccolitos Proximales (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de coccolitos proximales de verano y otoño respectivamente).

En relación con el número de agujeros de la capa proximal (NPH), observamos una gran variación, entre 0 y 38, aunque mayoritariamente el número de agujeros está entre 10 y 30 (Figs. 3.9A y 3.9C). En este caso encontramos una variación estacional muy marcada, totalmente contraria a lo observado hasta el momento, obteniendo el menor número de agujeros en la estación de invierno y

el mayor en la estación de verano (Figs. 3.9D y 3.9E). Hay que destacar la gran abundancia de cocolitos sin ningún agujero en la capa proximal que se han obtenido en la estación de invierno y que no se ha observado ningún cocolito sin agujeros en la estación de verano (Fig. 3.9B). Como veremos en la discusión, estas tendencias apuntan siempre a una mayor calcificación (menos agujeros) durante invierno respecto al verano.

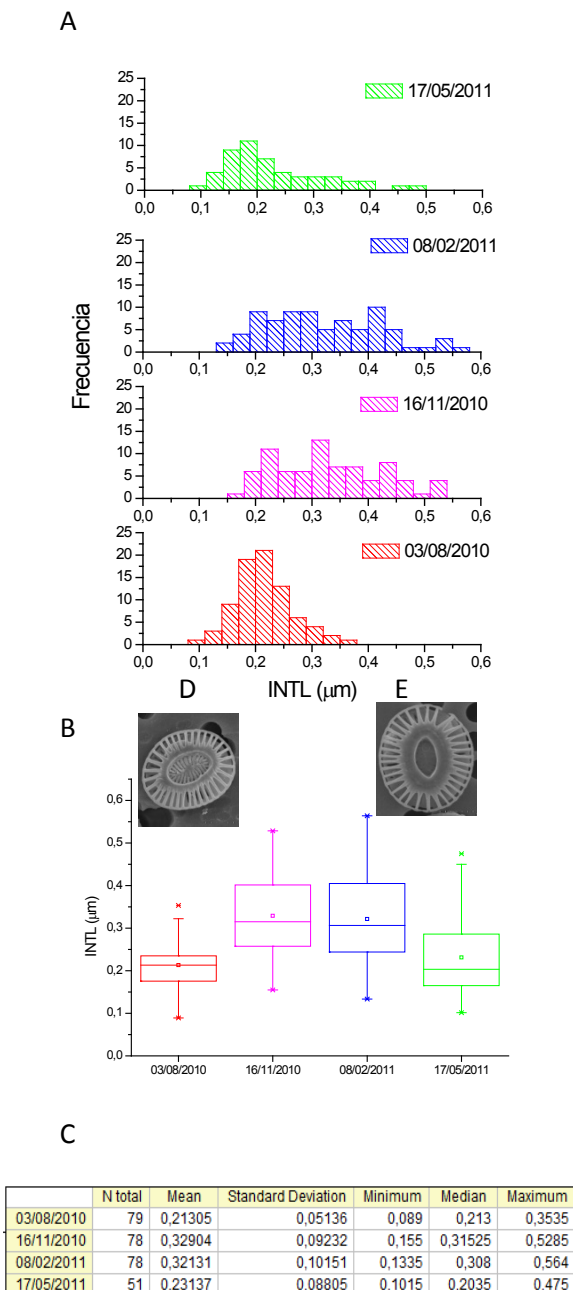


Figura 3.7: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para INTL de la Capa Distal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).

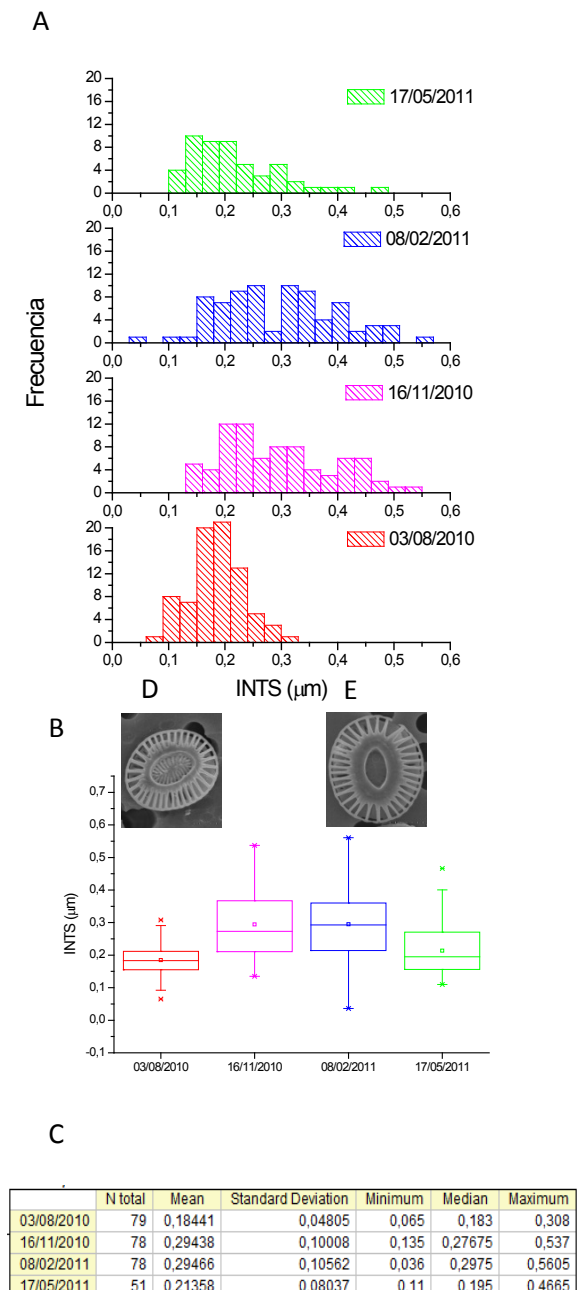
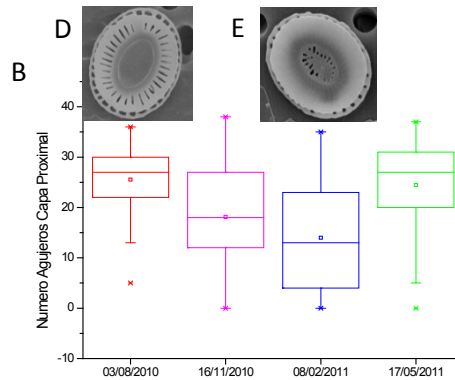
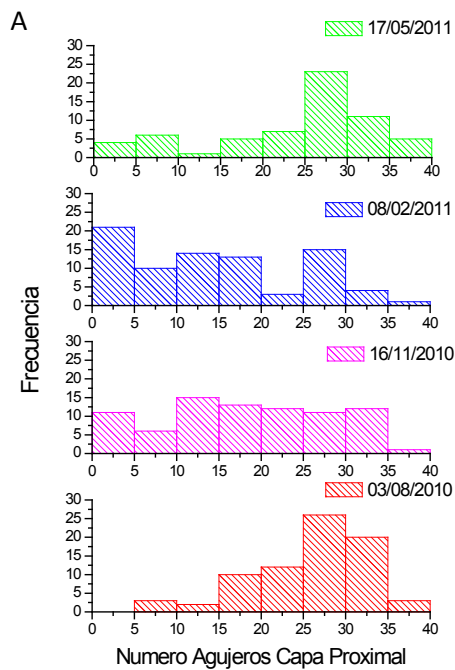
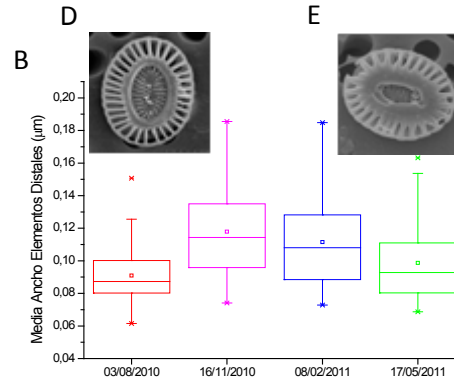
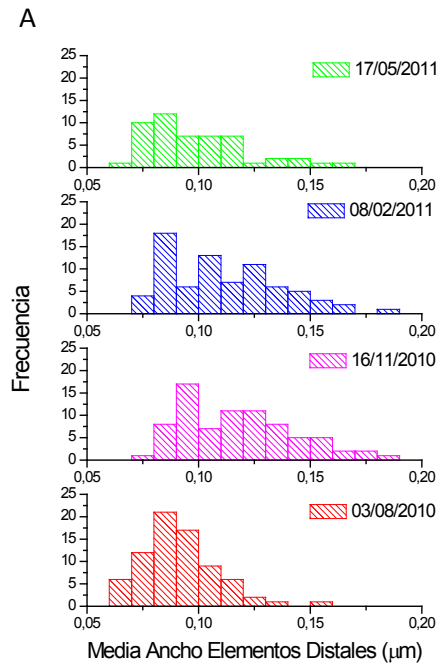


Figura 3.8: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para INTS de la Capa Distal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).



	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	76	25,53947	6,73388	5	27	36
16/11/2010	79	18,12658	9,52509	0	18	38
08/02/2011	81	13,98765	10,52318	0	13	35
17/05/2011	59	24,45763	8,9603	0	27	37



	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	75	0,0909	0,01645	0,0615	0,08733	0,15067
16/11/2010	78	0,11782	0,02571	0,07417	0,11442	0,1855
08/02/2011	76	0,11146	0,0255	0,07283	0,10833	0,18483
17/05/2011	51	0,09865	0,02231	0,06867	0,09283	0,16317

Figura 3.9: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para el Número de Agujeros de la Capa Proximal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).

Figura 3.10: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Media de Anchura de la Parte Radial de los elementos de la Capa Distal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).

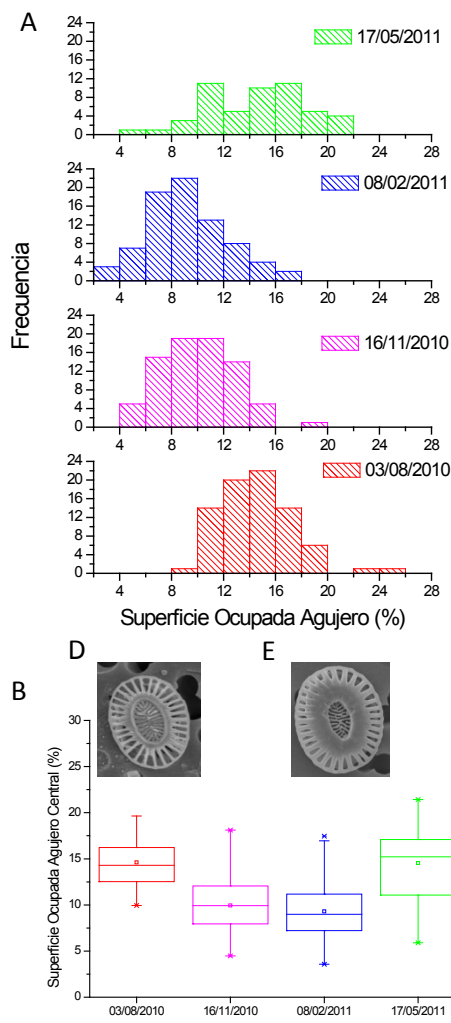
En el caso de la media de anchura de la parte radial de los elementos de la capa distal (MWDE), varía entre 0,06 y 0,19  $\mu\text{m}$ , aunque mayoritariamente las anchuras oscilan entre 0,08 y 0,13  $\mu\text{m}$  (Figs. 3.10A y 3.10C). La variación estacional resultante es también muy característica, obteniendo los valores más bajos en la estación de verano y los valores más altos en las estaciones de otoño e invierno (Fig. 3.10B). En las Figuras 3.10D y 3.10E se puede observar claramente la diferencia, estando muy calcificados en invierno.

En cuanto al tanto por ciento de superficie ocupada por el agujero central, en la capa distal varía entre 3% y 25% (Fig. 3.11C) y en la capa proximal varía entre 6% y 28%, respectivamente (Fig. 3.12C). En la capa distal observamos una gran variación estacional, con un patrón muy similar al obtenido para el número de agujeros de la capa proximal (Fig. 3.9B), valores más grandes para la estación de verano y valores más pequeños para la estación de invierno (Fig. 3.11B); en la estación de primavera también encontramos valores muy grandes, aunque hay mayor variabilidad que en verano (Fig. 3.11A).

En las Figuras 3.11D y 3.11E se puede ver claramente la diferencia de tamaño del agujero central.

En la capa proximal encontramos una variación estacional similar a la capa distal, valores más altos en la estación de verano (Fig. 3.12D) pero, en este caso, los valores más pequeños los encontramos no sólo en la estación de invierno (Fig. 3.12E), sino también en la estación de otoño (Fig. 3.12B).

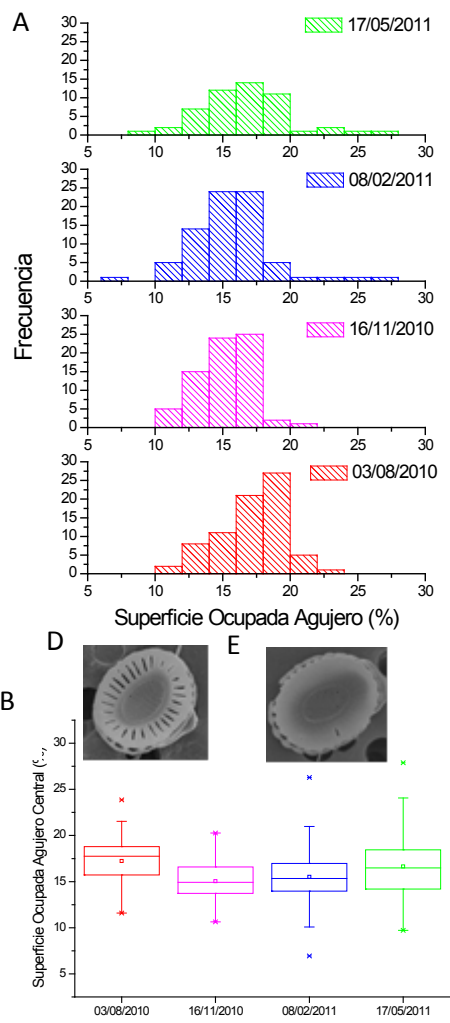
También observamos que el patrón de variación es muy similar en las estaciones de invierno, otoño y verano, habiendo mayor variabilidad en la estación de primavera, al igual que para el caso de la capa distal (Fig. 3.12A).



C

	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	79	14,61201	2,78597	9,94842	14,30179	24,62594
16/11/2010	78	9,93625	2,74513	4,47249	9,96872	18,11589
08/02/2011	78	9,29412	3,09487	3,57111	9,02802	17,46349
17/05/2011	51	14,54621	3,66085	5,89526	15,21691	21,42209

Figura 3.11: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Superficie Ocupada por el Agujero de la Capa Distal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos distales de verano e invierno respectivamente).



C

	N total	Mean	Standard Deviation	Minimum	Median	Maximum
03/08/2010	75	17,23249	2,47412	11,59422	17,7566	23,86623
16/11/2010	72	15,05341	1,98775	10,63338	15,02688	20,27038
08/02/2011	77	15,51463	3,0205	6,93454	15,33999	26,28878
17/05/2011	52	16,63632	3,38105	9,71616	16,59903	27,88766

Figura 3.12: Resultados obtenidos de las medidas realizadas para la Superficie Ocupada por el Agujero de la Capa Proximal (A: Histograma, B: Diagramas de Caja, C: Cuadro Estadístico; D y E: Imágenes de cocolitos proximales de verano e invierno respectivamente).

### **3.2. Variación estacional de los parámetros físico-químicos**

En la Figura 2.2 podemos observar la variación estacional de los parámetros físico-químicos que hemos escogido para comparar con las medidas biométricas. En relación con el pH y la concentración de iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), los valores máximos se alcanzan en invierno ( $\sim 8,15$  y  $\sim 2050 \mu\text{mol/kg}$ , respectivamente), mientras que los valores mínimos se obtienen en verano ( $\sim 8,05$  y  $\sim 1950 \mu\text{mol/kg}$ , respectivamente). Por el contrario, la presión parcial de  $\text{CO}_2$ , la concentración de iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y el estado de saturación de la calcita ( $\Omega$  de calcita) presentan valores mínimos en invierno ( $\sim 350 \mu\text{atm}$ ,  $\sim 200 \mu\text{mol/kg}$  y  $\sim 5$ , respectivamente) y máximos en verano ( $\sim 450 \mu\text{atm}$ ,  $\sim 250 \mu\text{mol/kg}$  y  $\sim 6$ , respectivamente). La evolución de estos parámetros es la típica de las series temporales a mar abierto, como por ejemplo la serie BATS (Bermuda Atlantic Time-series Study) en el Atlántico noroccidental (véase Fig. 4 de Bates et al., 2012).

## **4. DISCUSIÓN**

La variación estacional de los parámetros morfológicos queda reflejada claramente en los diagramas de caja y bigotes (B de las Figs. 3.1 a 3.12). Los parámetros DC y NC, DL y DW, CAW distal y proximal, INTL e INTS y MWDE, muestran un patrón muy similar: los valores más altos (que se relacionarían con una mejor calcificación) los encontramos en las muestras de invierno y otoño mientras que los valores más bajos (que se relacionarían con una peor calcificación) los encontramos en la muestra de verano. En cuanto a los parámetros NPH y el tanto por ciento de superficie ocupada por el agujero central muestran un patrón totalmente contrario, valores bajos en invierno y altos en verano, aunque esto es totalmente lógico ya que valores altos de estos parámetros indicarían peor calcificación (i.e. más agujeros, menos grosor de las estructuras). En este sentido destaca en particular el poco número de agujeros de la muestra de invierno, que corrobora la intensa calcificación observada en esta estación (Fig. 3.9A).

Según se ha explicado en la introducción, sería esperable que, al disminuir el pH del agua de mar, se viera reducida la tasa de calcificación de las algas cocolitoforales debido al carácter más corrosivo de las aguas más ácidas. En este sentido, teniendo en cuenta únicamente el pH *in situ*, las cocosferas y los cocolitos de las muestras de Blanes analizadas en el presente trabajo deberían aparecer más calcificados en invierno que en verano, tal y como observamos en este trabajo. Respecto a la concentración de ión carbonato y el estado de saturación, no obstante, observamos que estos parámetros son más altos en verano que en invierno. Valores altos de estos dos parámetros deberían dar estabilidad a las estructuras calcificadas formadas. Teniendo en cuenta únicamente estos parámetros, deberíamos encontrar estructuras más calcificadas en verano que en invierno, contrariamente al resultado obtenido pensando únicamente en términos de pH. En realidad, el resultado encontrado en las biometrías de *E. huxleyi* presentadas en este trabajo apuntan hacia una mejor calcificación en invierno que en verano, un resultado que está de acuerdo con el carácter más corrosivo de las aguas más ácidas, pero que se contradice con los valores de concentración de ión carbonato y de estado de saturación.

Este resultado, hasta cierto punto contradictorio, es el mismo que encontraron en un trabajo similar en el Mar Egeo, en el cual también observaron mayor calcificación en cocosferas y cocolitos durante la estación de invierno (Triantaphyllou et al., 2010). En este trabajo, los autores también apuntaron sobre otros parámetros que se han relacionado a menudo con mayor o menor calcificación, como la temperatura. Aunque el tema del tamaño corporal en organismos del plancton es muy complejo (e.g. Margalef, 1991, 1997; Schmidt et al., 2006), algunos estudios han encontrado que las estructuras de *E. huxleyi* están más calcificadas en aguas más frías (McIntyre and Be, 1967; Roth and Berger, 1975; Burns, 1977; Jordan, 1988). En estudios paleoceanográficos en base al análisis de cocolitos fósiles en sedimentos marinos, al parecer también se observaron que las estructuras correspondientes a períodos fríos (glaciales) eran más grandes que las de períodos cálidos (interglaciales; Colmenero-Hidalgo (2002, 2004)).



## **5. CONCLUSIONES**

A partir de la variación estacional observada en los parámetros biométricos de los cocolitos y cocosferas de *Emiliania huxleyi* en muestras de agua superficial de la Bahía de Blanes, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1- Las cocosferas más grandes y más calcificadas las encontramos en la estación de invierno, mientras que las más pequeñas y, en general, las aparentemente menos calcificadas las encontramos en la estación de verano.
- 2- En cuanto a los cocolitos en posición distal, en la estación de verano encontramos que presentan menor longitud, menor anchura, menor espesor de tubo central y menor anchura de la parte radial de los elementos que en invierno. Todas estas características morfológicas apuntan hacia una calcificación más intensa en la estación de invierno.
- 3- En relación a los cocolitos en posición proximal, el número de agujeros es mucho menor en invierno que en verano y primavera, apuntando también hacia una calcificación mayor en invierno que en verano.
- 4- Teniendo en cuenta únicamente el pH y el carácter más corrosivo de las aguas más ácidas, parecería que la calcificación de las cocosferas y de los cocolitos de *E. huxleyi* de las muestras de Blanes vienen controladas por este parámetro, ya que es durante el invierno, cuando el pH es más básico, cuando este organismo calcifica mejor.
- 5- No obstante, si tenemos en cuenta otros parámetros importantes como la concentración de ión carbonato y el estado de saturación de la calcita, deberíamos encontrar estructuras más calcificadas en verano que en invierno. En este sentido, nuestros resultados parecen indicar que las variaciones morfológicas estacionales de *E. huxleyi* no dependen de estos parámetros. Es posible que otros parámetros ambientales jueguen un rol más importante, como la temperatura, ya que en algas cocolitoforales a menudo se ha relacionado la mayor calcificación con las temperaturas más frías, una relación que encajaría con nuestros resultados.
- 6- Otros autores han encontrado resultados similares a los obtenidos en este trabajo, pero todavía es temprano para poder sacar conclusiones definitivas sobre cuáles son los parámetros que dominan la calcificación en estas algas y el futuro que les espera ante la progresiva acidificación de los océanos.

## REFERENCIAS

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., Ram, S. J. 2004. Image Processing with Image J. Biophotonics International Laurin Publishing Co. Inc.
- Bach, L. T., Bauke, C., Meier, K. J. S., Riebesell, U., Schulz, K. G. 2012. Influence of changing carbonate chemistry on morphology and weight of coccoliths formed by *Emiliana huxleyi*. Biogeosciences Discussions, 9: 5849–5885.
- Bates, N. R. et al. 2012. Detecting anthropogenic carbon dioxide uptake and ocean acidification in the North Atlantic Ocean. Biogeosciences, 9: 2509–2522.
- Beaufort, L., Probert, I., Buchet, N. 2007. Effects of acidification and primary production on coccolith weight: Implications for carbonate transfer from the surface to the deep ocean. Geochemistry Geophysics Geosystems Volume 8, No. 8.
- Beaufort, L., Probert, I., de Garidel-Thoron, T., Bendif, E. M., Ruiz-Pino, D., Metzl, N., Goyet, C., Buchet, N., Coupel, P., Grelaud, M., Rost, B., Rickaby, R. E. M., de Vargas, C. 2011. Sensitivity of coccolithophores to carbonate chemistry and ocean acidification. Nature, Vol. 476: 80-83.
- Burns, D.A., 1977. Phenotypes and dissolution morphotypes of the genus *Gephyrocapsa* Kamptner and *Emiliana huxleyi* (Lohmann). New Zealand Journal of Geology and Geophysics 20, 143–155.
- Colmenero-Hidalgo, E. et al. 2002. Biometry of *Emiliana huxleyi* and its biostratigraphic significance in the Eastern North Atlantic Ocean and Western Mediterranean Sea in the last 20 000 years. Marine Micropaleontology 46: 247-263.
- Colmenero-Hidalgo, E. et al. 2004. Ocean surface water response to short-term climate changes revealed by coccolithophores from the Gulf of Cadiz (NE Atlantic) and Alboran Sea (W Mediterranean). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 205: 317– 336.
- Falkowski P. 2012. The power of plankton. Nature 483: S17-S20.
- Frankignoulle, M. et al. 1994. Marine calcification as a source of carbon dioxide – positive feedback of increasing atmospheric CO<sub>2</sub>. Limnology. And Oceanography, 39: 458–462.

- Fresnel, J., 1989. Les Coccolithophorides (Prymnesiophyceae) du littoral: Genres: *Cricosphaera*, *Pleurochrysis*, *Cruciplacolithus*, *Hymenomonas* et *Ochrosphaera*. Ultrastructure, cycle biologique, systématique. Thèse de Doctorat d'Etat Sciences, Université de Caen.
- Holligan, P. M., Fernandez, E., Aiken, J., Balch, W. M., Boyd, P., Burkill, P. H., Finch, M., Groom, S. B., Malin, G., Muller, K., Purdie, D. A., Robinson, C., Trees, C. C., Turner, S. M., and van der Wal, P. 1993. A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliana huxleyi*, in the North Atlantic, *Global Biogeochemistry Cycles*, 7: 879–900.
- Iglesias-Rodríguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E. M., Hall, I. R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrell, T., Gibbs, S. J., Dassow, P. V., Rehm, E., Armbrust, E. V., Boessenkool, K. P. 2008. Phytoplankton Calcification in a High-CO<sub>2</sub> World. *Science*, Vol. 320: 336-340.
- Inouye, I., and Piennar, R.N., 1988. Light and electron microscope observations of the type species of *Syracosphaera*, *S. pulchra* (Prymnesiophyceae). *British Phycological Journal* 23: 205-217.
- Jordan, R.W., 1988. Coccolithophorid communities in the North East Atlantic. PhD thesis, University of Surrey (unpublished).
- Klaveness, D., 1973. The microanatomy of *Calyptrosphaera sphaeroidea*, with some supplementary observations in the motile stage of *Coccolithus pelagicus*. *Norwegian Journal of Botany* 20 (2-3): 151-162.
- Langer, G., Nehrke, G., Probert, I., Ly, J., Ziveri, P. 2009. Strain-specific responses of *Emiliana huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences*, 6: 2637-2646.
- Langer, G., De Nooijer, L. J., and Oetjen, K. 2010. On the role of the cytoskeleton in coccolith morphogenesis: the effect of cytoskeleton inhibitors. *Journal of Phycology*, 46: 1252–1256.
- Langer, G. and Bode, M. 2011. CO<sub>2</sub> mediation of adverse effects of seawater acidification in *Calcidiscus leptoporus*, *Geochemistry Geophysics Geosystems* 12, Q05001, doi:10.1029/2010GC003393.

- Manton, I., and Leedale, G.F., 1963. Observations on the microanatomy of *Crystallolithus hyalinus* Gaarder and Markali. Archiv für Mikrobiologie, 47: 115-136.
- Manton, I., and Leedale, G.F., 1969. Observations on the microanatomy of *Coccolithus pelagicus* and *Cricosphaera carterae*, with special reference to the origin and nature of coccoliths and scales. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 49: 1-16.
- Margalef, R. 1991. Teoría de los sistemas ecológicos. Universitat de Barcelona Publicacions. pp. 290.
- Margalef, R. 1997. Our Biosphere. Ecology Institute, Oldendorf. pp. 176.
- McIntyre, A. and Bé, A.W.H., 1967. Modern coccolithophoridae of the Atlantic Ocean - I. Placoliths and cyrtholiths. Deep-Sea Research 14: 561-597.
- Moore, T. S., Dowell, M. D., and Franz, B. A. 2012. Detection of coccolithophore blooms in ocean color satellite imagery: A generalized approach for use with multiple sensors, Remote Sensing of Environment, 117: 249–263.
- Paasche, E. 2002. A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions., Phycologia, 40: 503–529.
- Pelejero C., Calvo E., Hoegh-Guldberg O. 2010. Paleo-perspectives on ocean acidification. Trends in Ecology and Evolution Vol. 25, No. 6.
- Riebesell, U., Zondervan, I., Rost, B., Tortell, P. D., Zeebe, R. E., Morel, F. M. M. 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO<sub>2</sub>. Nature, Vol. 407: 364-367.
- Roth, P.H., Berger, W.H., 1975. Distribution and dissolution of coccoliths in the south and central Pacific. In: Sliter, W., Be, A.W.H., Berger, W.H. (Eds.), Dissolution of deep-Sea Carbonates., 13. Cushman Foundation of Foraminiferal Research Special Publication, pp. 87–113.
- Rowson, J.D., Leadbeater, B.S.C. and Green, J.C. 1986. Calcium carbonate deposition in the motile (*Crystallolithus*) phase of *Coccolithus*

- pelagicus* (Prymnesiophyceae). British Phycological Journal, 21: 359-370.
- Schmidt, D. et al. 2006. Biogeography and evolution of body size in marine plankton. Earth Science Reviews, 78: 239-266.
  - Smith, H. E. K., Tyrrell, T., Charalampopoulou, A., Dumousseaud, C., Legge, O. J., Birchenough, S., Pettit, L. R., Garley, R., Hartman, S. E., Hartman, M. C., Sagoo, N., Daniels, C. J., Achterberg, E. P., Hydes, D. J. 2012. Predominance of heavily calcified coccolithophores at low CaCO<sub>3</sub> saturation during winter in the Bay of Biscay. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(23):8845-9.
  - Triantaphyllou, M., Dimiza, M., Krasakopoulou, E., Malinverno, E., Lianou, V., Souvermezoglou, E. 2010. Seasonal variation in *Emiliana huxleyi* coccolith morphology and calcification in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean). Geobios 43: 99-110.
  - Tyrrell, T. and Young, J. R. 2009. Coccolithophores, in: Encyclopedia of Ocean Sciences, edited by: Steele, J. H., Turekian, K. K. and Thorpe, S. A., Academic Press, San Diego, 3568–3576.
  - Vrid-de Jong, E.W. de., Emburg, P.R.V. and Vrind, J.P.M. de, 1994. Mechanisms of calcification: *Emiliana huxleyi* as model system. In: The Haptophyte Algae. Ed. by: J.C. Green & S.B.C. Leadbeater. Systematics Association Special Volume 51, Clarendon Press, Oxford: pp. 149-166.
  - Westbroek, P. 1991. Life as a geological force. Dynamics of the Earth. Norton, New York (Commonwealth Fund Book Program), 240p. (Traducida al catalán por Marta Vigo, 1998. La vida com a força geològica. Dinàmica de la Terra. Ed. Proa).
  - Westbroek, P., Young, J.R. and Linschooten, K., 1989. Coccolith production (Biomineralization) in the marine alga *Emiliana huxleyi*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 36 (4): 368-373.
  - Young, J.R., 1989. Observations on heterococcolith rim structure and its relationship to developmental processes. In: Nannofossils and their applications Ed. by: J. A. Crux & S. E. van Heck. Ellis Horwood. Chichester: pp. 1-20.