

Characterization of the CaCO_3 biomineral in coralline red algae (Corallinales) from the Pacific coast of Mexico

Caracterización del biomineral CaCO_3 en algas rojas coralinas (Corallinales) de las costas del Pacífico mexicano

D Fragoso^{1,4*}, F Ramírez-Cahero², A Rodríguez-Galván², R Hernández-Reyes³, A Heredia^{2*},
D Rodríguez, M Aguilar-Franco³, L Bucio³, VA Basiuk²

¹ Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Apartado postal 70–592, 04510 México DF, México.

* E-mail: dalila_f@live.com.mx, alejandropicoheredia@gmail.com

² Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México DF, Mexico.

³ Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 01000 México DF, México.

⁴ Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

ABSTRACT. Coralline red algae assimilate HCO_3^- to precipitate CaCO_3 in their tissues in the form of calcite or aragonite. A characterization of the biomolecular content and the crystalline structure of the biomineral of coralline red algae from the Pacific coast of Mexico was performed by powder X-ray diffraction (XRD), scanning electron (SEM) and tunneling microscopy (STM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The preliminary conclusion drawn from the results is that this type of calcite-aragonite biomineral has a very low organic content occluded within the crystals. FTIR bands at 2945 and 2889 cm^{-1} indicate that the most likely organic molecules are carbohydrates; moreover, peptide bond bands (amide I ~ 1640 and amide II ~ 1540 cm^{-1}) were not detected, suggesting that proteins are not related to mineral synthesis or their stabilization. This could be explained if the biomineral is synthesized by a biologically controlled extracellular mineralization process. The XRD study showed two main mineral phases, calcite and aragonite, with very similar structural parameters to the inorganic mineral counterparts. The crystallite shapes, seen by STM, were found as plates and needles with different sizes, between 20 and 100 nm.

Key words: Corallinales, biomineral, Rietveld method, nanostructure, scanning tunneling microscopy

RESUMEN. Las algas rojas coralinas asimilan HCO_3^- para precipitar CaCO_3 en sus tejidos en forma de calcita o aragonita. Se realizó una caracterización del contenido biomolecular así como de la estructura cristalina del biomineral en algas rojas coralinas de las costas del Pacífico mexicano mediante difracción de rayos X (XRD) en polvos, microscopía electrónica de barrido (MEB) y de túnel (STM), y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Con los resultados se llegó a la conclusión preliminar de que este tipo de calcita-aragonita tiene un muy bajo contenido de materia orgánica oculta dentro de los cristales. Las bandas de FTIR a 2945 y 2889 cm^{-1} encontradas indican que las moléculas orgánicas más probables son los hidratos de carbono; además, no se detectaron bandas de enlace peptídico (amida I ~ 1640 y amida II ~ 1540 cm^{-1}), lo que sugiere que las proteínas no están relacionadas con la síntesis mineral o con su estabilización. Esto se podría explicar si el biomineral fuera sintetizado por un proceso extracelular de mineralización controlado biológicamente. El análisis de XRD mostró dos fases minerales principales, calcita y aragonita, muy similares en sus parámetros estructurales a sus contrapartes minerales inorgánicas pero con modificaciones en la estructura molecular. Las formas y tamaños de los cristales, vistos mediante STM, son típicamente en placas y agujas de diferentes tamaños, entre 20 y 100 nm.

Palabras clave: Corallinales, biomineral, método de Rietveld, nanoestructura, microscopía de túnel.

INTRODUCTION

The most important carbonate plant producers in aquatic ecosystems are the multicellular red coralline algae, taxonomically classified in the order Corallinales (Silva and Johansen 1986). In this algal group, calcite is deposited throughout the cell walls except in some limited and specialized regions, such as articulations. Similar to other groups of marine organisms like coral reefs (Mann 2001), these algae assimilate HCO_3^- to precipitate CaCO_3 in their tissues in order to build their hard biological structures. As is well

INTRODUCCIÓN

Los principales vegetales productores de carbonato en los ecosistemas acuáticos son las algas coralinas rojas multicelulares, taxonómicamente clasificadas en el orden Corallinales (Silva y Johansen 1986). En este grupo de algas la calcita es depositada sobre las paredes celulares excepto en algunas regiones limitadas y especializadas como las articulaciones. Al igual que otros grupos de organismos marinos como los arrecifes coralinos (Mann 2001), estas algas asimilan HCO_3^- para precipitar CaCO_3 en sus tejidos a fin de construir sus

known, their cell walls consist of micro- and nanostructured carbonate mineral, mainly calcite, with a hierarchically ordered structural design exceeding current manufacturing capabilities. Similar to other biominerals, biologically formed carbonates in red algae are produced under biomolecular-controlled mechanisms not yet understood (Addadi and Weiner 1992, Mann 2001) but closely related to the photosynthesis process (Borowitzka 1979, Haikali *et al.* 2004). Calcium carbonate biomineralizing organisms use Ca^{2+} , Mg^{2+} , and CO_3^{2-} as the source for developing the mineral, which is then processed by coupling to specific organic molecules to form the calcite-aragonite related structures. In this regard, recent findings of some biomolecules related to biominerals are very important to determine how those biomolecule-crystal interactions occur, as well as to determine how molecules change the shape and atomic parameters of the unit cell of the inorganic solid.

Apparently, CaCO_3 formation in red algae is a highly dynamic process, during which interactions between C=O bonded molecules and chemical elements contribute to change the crystalline d -parameters and crystallite shapes (Pueschel *et al.* 1992). The crystals appear first in the cell in a reticulum with shapes from rhombohedral to subspherical (Pueschel *et al.* 1992). Other studies condensed in the review of Bilan and Usov (2001) clearly show that the mineralization process in coralline algae is a very complex phenomenon not just in the biomineral formation but in the synthesis of rare organic polysaccharides (Bilan and Usov 2001). Moreover, unlike other biomineral structures, coralline red algae have the exceptional ability to modify their biomineral (Allemand *et al.* 2004) and organic (Bilan and Usov 2001) content during different seasons by alternating between calcite and aragonite (Adey 1970), or to include different elements controlled by changes in environmental temperature (Kamenos *et al.* 2008). The lack of information about molecules encapsulated in the walls of coralline red algae (CaCO_3 , MgCO_3) makes it difficult to determine how interactions between inorganic groups and organic compounds occur (Allemand *et al.* 2004). Hence, unraveling the processes involved in CaCO_3 biosynthesis will produce data on how the biomolecular and physicochemical aspects contribute to the formation of mineral cellular structures (Addadi and Weiner 1992, Mann 2001, Allemand *et al.* 2004). In CaCO_3 from coralline red algae the interactions between Ca^{2+} and CO_3^{2-} species with organic molecules may be of prime importance in crystal nucleation and growth in the hierarchical biomineral (Medaković *et al.* 1995). Indeed, organic molecules modify almost all the hierarchies in the inorganic solid in a bottom-up strategy including the atom parameters and crystal unit cell as in bone apatite (Heredia 2000), mollusks (Pokroy *et al.* 2006), and corals (Pokroy *et al.* 2006, Przenioslo *et al.* 2008). In coralline algae, the low concentration of organic molecules in the biomineral (Medaković *et al.* 1995) makes it difficult to establish how the organic

estructuras biológicas rígidas. Como es bien sabido, sus paredes celulares están constituidas de mineral de carbonato micro y nanoestructurado, principalmente calcita, con estructuras ordenadas jerárquicamente que hasta el momento han sido imposibles de manufacturar. Al igual que otros biominerales, los carbonatos formados biológicamente en las algas rojas son producidos mediante mecanismos controlados biomolecularmente que aún no se entienden (Addadi y Weiner 1992, Mann 2001) pero que están estrechamente relacionados con el proceso de fotosíntesis (Borowitzka 1979, Haikali *et al.* 2004). Los organismos que biomineralizan CaCO_3 utilizan Ca^{2+} , Mg^{2+} y CO_3^{2-} como fuente para generar los minerales que luego se acoplan a moléculas orgánicas específicas, formando estructuras relacionadas de calcita-aragonita. En este sentido, los recientes hallazgos de algunas biomoléculas derivadas de biominerales resultan de gran importancia para entender las interacciones entre biomoléculas y cristales, así como para determinar cómo inciden las moléculas en la forma y los parámetros atómicos de la celda unitaria del sólido inorgánico.

Aparentemente, la formación de CaCO_3 en las algas rojas es un proceso muy dinámico durante el cual las interacciones entre las moléculas ligadas mediante enlaces C=O y otros elementos químicos contribuyen en la modificación de las formas y los parámetros d cristalinos (Pueschel *et al.* 1992). Los cristales aparecen primero en la célula en un retículo con formas que van de romboédricas a subsféricas (Pueschel *et al.* 1992). Otros estudios (ver revisión de Bilan y Usov 2001) muestran claramente que la mineralización en algas coralinas es un proceso muy complejo no sólo en la formación de biominerales sino también en la síntesis de polisacáridos orgánicos poco comunes (Bilan y Usov 2001). Además, a diferencia de otras estructuras biominerales, las algas rojas coralinas tienen una capacidad excepcional para modificar su contenido de biominerales (Allemand *et al.* 2004) y orgánico (Bilan y Usov 2001) en las diferentes estaciones del año alternando entre calcita y aragonita (Adey 1970), o de incluir diferentes elementos controlados por cambios en la temperatura ambiental (Kamenos *et al.* 2008). La falta de información sobre moléculas encapsuladas en las paredes de las algas rojas coralinas (CaCO_3 , MgCO_3) dificulta la determinación de cómo suceden las interacciones entre grupos inorgánicos y compuestos orgánicos (Allemand *et al.* 2004). Por ende, el estudio de los procesos involucrados en la biosíntesis de CaCO_3 proporcionará información sobre aspectos biomoleculares y fisicoquímicos que contribuyen a la formación de estructuras celulares biominerales (Addadi y Weiner 1992, Mann 2001, Allemand *et al.* 2004). En el CaCO_3 de las algas rojas coralinas, las interacciones entre especies de Ca^{2+} y CO_3^{2-} y moléculas orgánicas podría ser de vital importancia en la formación de núcleos y en el crecimiento de los cristales de un biomineral jerárquicamente ordenado (Medaković *et al.* 1995). De hecho, las moléculas orgánicas modifican casi todas las jerarquías en el sólido inorgánico en una estrategia de abajo hacia arriba que incluye

components are responsible for the anisotropy or uptake of inorganic ions in the inorganic structures (Degens 1989, Aizenberg *et al.* 1994). These studies are of interest in order to tailor the (bio)physicochemical properties of a synthesis route for the production of highly hierarchical ordered structures or to translate this knowledge to understand the self-assembly and design of novel high performance calcium-based materials (Mann 2001).

We approached this challenge by analyzing different species of the order Corallinales. The calcite and aragonite of these species exhibit higher Mg²⁺ content than the mineral species (Medaković *et al.* 1995), decreasing the unit cell size in a more compact biomineral structure (Cusack *et al.* 2003). The CaCO₃ biomineral of coralline red algae is located at the exterior of the plasma membrane of the cells and is protected against spontaneous dissolution in aquatic ecosystems by the texture of crystals or inclusion of Mg²⁺ atoms in the unit cell of the crystallites (Medaković *et al.* 1995).

Here, we revised the taxonomy of coralline red algae to gain an insight of their structural features at different scales, such as its bio-organic content associated with the CaCO₃ biomineral, its mineralogical content and its microscale crystalline arrangement, and we used the Rietveld method to analyze the nanoscale deformation of the atomic parameters of the biomineral. The interest of this paper is the biomineral analysis of different species of coralline red algae obtained from the Pacific coast of Mexico, by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), powder X-ray diffraction (XRD), low vacuum scanning electron microscopy (LVSEM) with energy dispersive spectroscopy (EDS), and scanning tunneling microscopy (STM). The aim of the present study was to obtain information and new data on the composition of the mineral deposits and nanostructure regarding mineral content and to perform an elemental analysis of the different genera of coralline red algae (e.g., *Amphiroa*, *Jania*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon*, and *Pneophyllum*) that are predominantly distributed on the tropical Pacific coast of Mexico. Some of these species have been the object of CaCO₃ biomineral characterization; however, little information is available on the composition and structure of the mineral deposits of these species on the Mexican coast. A comparison is also made with other species (e.g., *Bossiella*, *Calliarthron*, *Haliptilon*, and *Lithothrix*) that have a particular distribution, mainly on the Pacific coast of northern Mexico. Little is also known about relationships and interactions between the composition of mineral deposits and environmental factors.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Specimens of different species of coralline red algae were randomly selected considering their representativeness on the

parámetros atómicos y la celda cristalina unitaria tal como sucede en la apatita ósea (Heredia 2000), moluscos (Pokroy *et al.* 2006) y corales (Pokroy *et al.* 2006, Przenioslo *et al.* 2008). En las algas coralinas, la baja concentración de moléculas orgánicas en el biomineral (Medaković *et al.* 1995) complica establecer la contribución de los compuestos orgánicos a la anisotropía o la captación de iones inorgánicos por las estructuras inorgánicas (Degens 1989, Aizenberg *et al.* 1994). Estos estudios son de interés para determinar las propiedades (bio)físicoquímicas de una ruta de síntesis para la producción de estructuras con un gran orden jerárquico o para traducir este conocimiento para entender la generación y diseño de materiales novedosos de alto desempeño, a base de calcio (Mann 2001).

Este tema se abordó analizando el biomineral de diferentes especies del orden Corallinales. La calcita y la aragonita en estas especies muestran un mayor contenido de Mg²⁺ que sus contrapartes de origen orgánico (Medaković *et al.* 1995), disminuyendo el tamaño de la celda unitaria en una estructura biomineral más compacta (Cusack *et al.* 2003). El biomineral de CaCO₃ de las algas rojas coralinas se encuentra en el exterior de la membrana plasmática de las células y en los ecosistemas acuáticos es protegido contra su disolución espontánea mediante la textura de los cristales o la inclusión de átomos de Mg²⁺ en la celda cristalina unitaria (Medaković *et al.* 1995).

En este trabajo se hizo una revisión taxonómica de las algas rojas coralinas para entender mejor sus características estructurales a diferentes escalas, como su contenido bioorgánico asociado con el CaCO₃ biomineral, su contenido mineralógico y su organización cristalina a microescala, y se utilizó el método de Rietveld para analizar la deformación de los parámetros atómicos del biomineral a nanoescala. Este trabajo está enfocado al análisis biomineral de diferentes especies de algas rojas coralinas obtenidas de las costas del Pacífico de México, mediante la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), difracción de rayos X en polvos (XRD), microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM) con espectroscopía de dispersión de energía (EDS) y microscopía de efecto túnel (STM). Su objetivo fue obtener información y nuevos datos sobre la composición de los depósitos de minerales y la nanoestructura en cuanto a su contenido mineral, así como desarrollar un análisis elemental de los diferentes géneros de algas rojas coralinas (e.g., *Amphiroa*, *Jania*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon* y *Pneophyllum*) que se encuentran principalmente en las costas tropicales del Pacífico mexicano. Algunas de estas especies han sido caracterizadas en su contenido de CaCO₃ biomineral; sin embargo, existe poca información sobre la composición y la estructura de los depósitos de minerales de estas especies en las costas de México. También se realizó una comparación con otras especies (e.g., *Bossiella*, *Calliarthron*, *Haliptilon* y *Lithothrix*) que tienen una distribución particular, especialmente en la costa del Pacífico del norte de México. Cabe hacer notar que

Pacific coast of Mexico (fig. 1), taking into consideration their abundance and distribution (table 1). All specimens were collected from the intertidal zone.

There are two groups of species according to the natural conditions. Cold water species live on the northwestern coast of Mexico, such as *Bossiella orbigniana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*, *Haliptilon gracile*, and *Lithothrix aspergillum*. These species have a restricted distribution, mainly along the northwestern coast of the Baja California Peninsula. The peninsula is influenced by the California Current (Hubbs and Roden 1964, Wyrki 1965), which flows to the SE of the North Pacific Current, carrying water of subarctic origin characterized by low temperatures, low salinity, and high oxygen content. The pattern of flow and limits vary seasonally: from December to July the current flows almost parallel to the coast, covering the entire length of the west coast of the Baja California Peninsula, whereas from December to April coastal components move SE to about 15° N in the tropics; from August to November the direction is variable, most of the flow being offshore and having as inferior limit Punta Eugenia (28° N), where it deflects towards the SW. The surface temperature of coastal waters increases in relation to the latitudinal gradient following a general NW–SE direction. During the winter, the change in temperature is continuous along the ocean margin, between 32°43' and 18° N, throughout the west coast of the Baja California Peninsula, continuing to the tropical coast of Mazatlán. In summer the pattern holds, presenting a shift from 15°C to 29°C. Salinity presents a similar pattern to temperature, decreasing latitudinally towards the SE. It varies from 33.6 to 34.8 in both summer and winter, but a higher gradient is observed during the latter, reaching 34 at the latitude of Punta Eugenia, while in the summer this salinity is not reached but at Magdalena Bay (Maluf 1983).

The second group of corallines consists of typical tropical water species, such as *Amphiroa mexicana*, *Jania tenella*,

tampoco se sabe mucho sobre la relación e interacción entre la composición de los depósitos de minerales y los factores ambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron aleatoriamente especímenes de diferentes especies de algas rojas coralinas, todos ellos recolectados de la zona intermareal, considerando su representatividad en la costa del Pacífico mexicano (fig. 1) y tomando en cuenta su abundancia y distribución (tabla 1).

Existen dos grupos de especies según las condiciones naturales. En la costa noroeste de México existen especies de agua fría como *Bossiella orbigniana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*, *Haliptilon gracile* y *Lithothrix aspergillum*, cuya distribución está restringida principalmente a lo largo de la costa noroccidental de la Península de Baja California que es influenciada por la Corriente de California (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) que fluye hacia el SE de la Corriente del Pacífico Norte y acarrea agua de bajas temperaturas, baja salinidad y alto contenido de oxígeno, de origen subártico. El patrón y los límites de este flujo varían estacionalmente: de diciembre a julio la corriente fluye en dirección casi paralela a la costa, cubriendo todo lo largo de la costa occidental de la península, mientras que entre diciembre y abril los componentes costeros se trasladan al SE hasta alrededor de los 15° N en el trópico; de agosto a noviembre su dirección es variable, la mayoría del flujo es mar adentro y su límite inferior es Punta Eugenia (28° N), donde se desvía hacia el SO. La temperatura superficial de las aguas costeras incrementa en relación con el gradiente latitudinal siguiendo en general una dirección NO–SE. Durante el invierno, el gradiente de temperatura es continuo en el margen oceánico entre 32°43' y

Table 1. Species of Corallinales analyzed by different methods of microscopy.

Tabla 1. Especies de Corallinales analizadas por diferentes métodos de microscopía.

Species	Herbarium reference
<i>Amphiroa mexicana</i> Taylor	PTM 6160
<i>Bossiella orbigniana</i> (Dec.) Silva ssp. <i>dichotoma</i> (Manza) Johansen	IPN 11938
<i>Calliarthron cheilosporoides</i> Manza	IPN 1235
<i>Corallina vancouveriensis</i> Yendo	IPN 12273
<i>Haliptilon gracile</i> (Lamour.) Johansen (Lam.) Garbary and HW Johansen	IPN 12266
<i>Jania tenella</i> (Kützting) Grunow	PTM 820, PTM 1384, PTM 1950, PTM 1703
<i>Neogoniolithon trichotomum</i> (Heydrich) Setchell and Mason	Neo01
<i>Pneophyllum</i> aff. <i>fragile</i> Kützting	Pne01
<i>Lithophyllum</i> aff. <i>frondosum</i> (Dufour) Furnari, Cormaci and Alongi	Lit01
<i>Lithothrix aspergillum</i> JE Gray	IPN 13029

Pneophyllum aff. *fragile*, *Neogoniolithon trichotomum*, and *Lithophyllum* aff. *frondosum*. These species are distributed from the intertidal zone and have been recorded in greater abundance mainly on the coast of Jalisco, Michoacán, Guerrero, and Oaxaca. This entire region is influenced by the Costa Rica Coastal Current, which derives from the Equatorial Countercurrent carrying water of tropical origin (Hubbs and Roden 1964, Wyrki 1965). It is characterized by high surface temperatures, high salinity, and low oxygen concentration. The seasonal variation in average minimum temperatures is of one degree (28–29°C); however, local changes occur either due to the influence of upwelling, when lower temperatures are superimposed to the general pattern, or by the isolation of water bodies, causing an increase in temperature. In the tropical portion, salinity is relatively high and fairly uniform, with values ranging from 32 to 36.5 (de la Lanza 1991).

It is important to note that though Corallinales species are widely distributed on the Mexican Pacific coast, most studies are related to the Mexican tropical Pacific region. Nongeniculate coralline species are early colonists covering 80–90% of the primary substrate (Steneck 1986) to become substrate of the rest of the benthic algal assemblage. There

18° N, a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California, continuando hasta la costa tropical de Mazatlán. Este patrón prevalece en el verano, presentando un cambio de 15°C a 29°C. La salinidad muestra un patrón similar al de la temperatura, decreciendo latitudinalmente hacia el SE; varía entre 33.6 y 34.8 tanto en verano como en invierno, pero aumenta más rápidamente durante este último, alcanzando 34 a la altura de Punta Eugenia, mientras que en verano esta salinidad no se alcanza sino hasta Bahía Magdalena (Maluf 1983).

El segundo grupo corallinas consiste de especies típicas de aguas tropicales como *Amphiroa mexicana*, *Jania tenella*, *Pneophyllum* aff. *fragile*, *Neogoniolithon trichotomum* y *Lithophyllum* aff. *frondosum*. Estas especies se distribuyen desde la zona intermareal y se han registrado en mayor abundancia particularmente en las costas de Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Toda esta región es influenciada por la Corriente Costera de Costa Rica, la cual deriva de la Contracorriente Ecuatorial y acarrea agua de origen tropical (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) caracterizada por altas temperaturas superficiales, alta salinidad y baja concentración de oxígeno. La variación estacional de la temperatura media mínima es de un grado (28–29°C); sin embargo, se presentan cambios locales debido a la influencia de surgencias, cuando menores temperaturas se imponen al patrón general, o por el aislamiento de cuerpos de agua que ocasiona incrementos en la temperatura. En la porción tropical la salinidad es relativamente alta y bastante uniforme, con valores que varían entre 32 y 36.5 (de la Lanza 1991).

Es importante indicar que a pesar de la amplia distribución de las Corallinales en las costas del Pacífico mexicano, la mayoría de sus estudios se enfocan en la región tropical. Las especies no geniculadas son los primeros colonizadores y cubren 80–90% del sustrato primario (Steneck 1986) para convertirse en el sustrato del conjunto de las demás algas bentónicas. Existen hasta 50 especies no geniculadas en todo el Pacífico tropical mexicano (Fragoso y Rodríguez 2002), donde trabajos realizados muestran que, especialmente en Guerrero y Oaxaca, *L.* aff. *frondosum* y sus especies relacionadas son las más importantes, presentando el mayor índice de abundancia específico en base a frecuencia y cobertura (López *et al.* 2000, 2004); este también parece ser el caso de *P.* aff. *fragile* y *N.* *trichotomum* (obs. pers.). En los ecosistemas de arrecifes coralinos, los cambios en la abundancia de algunas especies de algas corallinas no geniculadas pueden regular la abundancia de otros componentes arrecifales, incluyendo los corales, y modificar la estructura y función del ecosistema, por lo que son consideradas grupos funcionales claves (Harrington 2004). En las comunidades corallinas de Zihuatanejo y Huatulco (Pacífico tropical mexicano), las bases de las colonias de diferentes especies de *Pocillopora*, cuya característica distintiva es no poder formar bases calcáreas sólidas y grandes, son colonizadas por especies no geniculadas que proporcionan a la colonia un gran soporte estructural (Oseguera com. pers.).

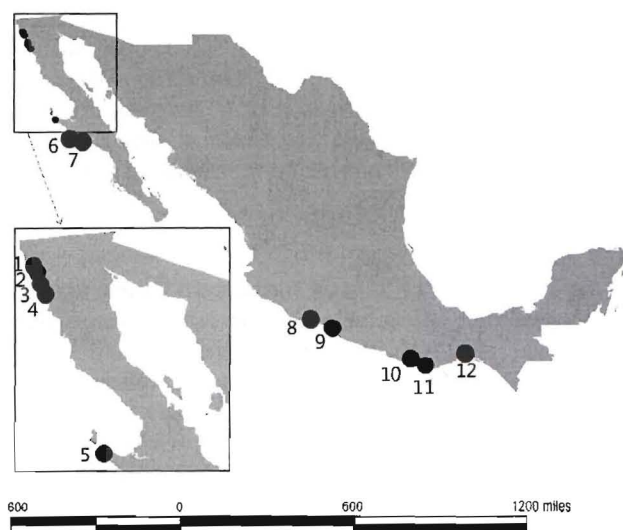


Figure 1. Coralline sampling sites: (1) Ensenada, Baja California (BC); (2) Punta Banda, BC; (3) Punta San Isidro, BC; (4) Eréndira, BC; (5) Punta Eugenia, Baja California Sur (BCS); (6) Bahía Tortugas, BCS; (7) Bahía Magdalena, BCS; (8) Caleta de Campo, Michoacán; (9) Zihuatanejo, Guerrero; (10) San Agustín, Oaxaca (Oax.); (11) Cacaluta, Oax.; and (12) La Ventosa, Oax.

Figure 1. Sitios de colecta de corallinas: (1) Ensenada, Baja California (BC); (2) Punta Banda, BC; (3) Punta San Isidro, BC; (4) Eréndira, BC; (5) Punta Eugenia, Baja California Sur (BCS); (6) Bahía Tortugas, BCS; (7) Bahía Magdalena, BCS; (8) Caleta de Campo, Michoacán; (9) Zihuatanejo, Guerrero; (10) San Agustín, Oaxaca (Oax.); (11) Cacaluta, Oax.; y (12) La Ventosa, Oax.

are as many as 50 nongeniculate species distributed throughout the Mexican tropical Pacific region (Fragoso and Rodríguez 2002). Studies in this region have shown that in Guerrero and Oaxaca especially, *L. aff. frondosum* and related species are the most important for they have the highest specific abundance index based on their cover and frequency values (López *et al.* 2000, 2004); this also seems to be the case for *P. aff. fragile* and *N. trichotomum* (pers. obs.). In coral reef ecosystems, changes in the abundance of some nongeniculate coralline species can regulate the abundance of other reef components, including corals, and modify the structure and function of the ecosystem; they are then considered key functional groups (Harrington 2004). In the coralline communities of Zihuatanejo and Huatulco (Mexican tropical Pacific), the bases of *Pocillopora* colonies of different species, whose distinctive feature is that they cannot form solid and large calcareous basements, are colonized by nongeniculate coralline species, giving the colony a great structural support (Oseguera pers. comm.).

The geniculate or articulated coralline species together with other algal species form a dense turf. *Amphiroa* and *Jania* species are the most important along the Mexican Pacific coast, excluding the nongeniculate species. Due to the architectural complexity of turf, it provides habitat for diverse assemblages of macrofauna (Kelaher *et al.* 2003), giving space, refuge, and food resources to several species. Data from Zihuatanejo Bay (García 2009) show that the macrofauna (organisms of 0.5–1 mm *sensu* Bilyard 1987, Warwick 1988) include a large number of species belonging to six phyla (Annelida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Sipuncula, and Platyhelminthes), with high densities, generally greater than 200 ind 0.1 m⁻².

Processing samples

The samples of different species were washed with tap water for 24 h. Their surfaces were carefully observed under a stereomicroscope and brushed with a bristle brush to remove any epiphytes, and were then processed for different microscopy analysis. In general, small fragments of each plant of each species were used. The samples consisted of fragments (0.5–1 cm) of the main or associated lateral branches. The crustose coralline specimens were fractured and small pieces (0.5–1 cm) of different parts of the thallus were analyzed. The entire biomineral structures were carefully washed with distilled water and air dried. The specimens were analyzed by LVSEM-EDS, STM, FTIR, and XRD. Two samples with more than one crystalline phase were selected to perform high resolution XRD to gain an insight of their fine mineral content by Rietveld refinements.

LVSEM-EDS

In the LVSEM analysis, all the samples were fixed in a sample holder using only carbon ribbon, without any

Las algas geniculadas o articuladas, junto con otras especies, forman una densa cobertura vegetal. Las especies de *Amphiroa* y *Jania* son las más importantes a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, después de las especies no geniculadas. La complejidad arquitectural de esta cobertura la convierte en un hábitat para diversos conjuntos de macrofauna (Kelaher *et al.* 2003), a quienes proporciona espacio, refugio y alimento. Datos de la bahía de Zihuatanejo (García 2009) muestran que esta macrofauna (organismos de 0.5–1 mm según Bilyard 1987, Warwick 1988) incluye gran número de especies que pertenecen a seis filos (Annelida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Sipuncula y Platyhelminthes), con altas densidades, generalmente mayores que 200 ind 0.1 m⁻².

Procesamiento de muestras

Se lavaron las muestras de diferentes especies con agua de la llave durante 24 h. Sus superficies fueron cuidadosamente observadas bajo un estereomicroscopio, eliminando epífitos con un cepillo, y luego se procesaron mediante diferentes análisis microscópicos. En general se usaron fragmentos pequeños de cada planta de cada especie. Las muestras consistieron de fragmentos del eje principal o de las ramas laterales asociadas (0.5–1 cm). Los especímenes de algas coralinas incrustantes se fracturaron y se analizaron piezas pequeñas (0.5–1 cm) de diferentes partes del talo. Las estructuras biominerales completas fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada y secadas al aire. Los especímenes se analizaron por LVSEM-EDS, STM, FTIR y XRD. Se seleccionaron dos muestras con más de una fase cristalina para realizar XRD de alta resolución y determinar su contenido de material fino mediante refinamientos Rietveld.

LVSEM-EDS

En el análisis de LVSEM, se fijaron todas las muestras en un portamuestras usando sólo cinta de carbón, sin ninguna preparación adicional. Para este análisis se utilizó un instrumento JSM-5900LV. Las mediciones se realizaron a un bajo vacío de 1–250 Pa (0.01–2.5 Torr), con un voltaje de aceleración de 5–20 kV. Se llevaron a cabo análisis químicos adicionales midiendo espectros de EDS por análisis cuantitativo ZAF.

STM

Las muestras fueron pulverizadas y depositadas sobre superficies de grafito pirolítico de alto ordenamiento (sopores HOPG de ca 5 × 5 mm proporcionados con el instrumento). La STM (Binning *et al.* 1982) se trabajó en modo de corriente constante a temperatura ambiente. Se usaron las condiciones de túnel para optimizar las imágenes (voltaje de sesgo de 1.01–1.52 V y corriente túnel de 0.050–0.4 nA). Las imágenes de STM se obtuvieron al aire libre usando el

additional preparation. A LVSEM JSM-5900LV instrument was used. We performed measurements at a low vacuum of 1–250 Pa (0.01–2.5 Torr), with an acceleration voltage of 5–20 kV. Additional chemical analyses were performed measuring EDS spectra by ZAF quantitative analysis.

STM

The samples were pulverized and deposited on surfaces of highly ordered pyrolytic graphite (HOPG *ca* 5 × 5-mm supports supplied with the instrument); STM (Binning *et al.* 1982) was operated in constant current mode at room temperature. Tunneling conditions were used to optimize the imaging (bias voltage 1.01–1.52 V and tunneling current 0.050–0.4 nA). STM imaging was carried out under open-air conditions using Nanosurf EasyScan E-STM version 2.1 hardware with a maximum scan range of 624 × 624 nm. Freshly cut Pt/Ir wire probes of 0.25-mm diameter were used for the scan. Deposition of the samples onto freshly cleaved HOPG surfaces was performed as follows: red algal material was cleaned with distilled water and then dried; portions were ground in a glass mortar and the powder deposited on the HOPG substrates ready for analysis.

FTIR

In order to gain some insight into the type of biopolymer and the chemical nature of the biomineral, FTIR measurements were performed. The samples were ground and mixed with KBr powder (100:1 ratio), and then compressed into pellets. A Nicolet 680 FT-IR spectrometer was used with a 4 cm^{-1} resolution and each sample was scanned 64 times. To determine the precise wavenumber of the different chemical groups produced in the scans, cross-referencing was performed against previously reported group-specific wavenumbers. In the case of the FTIR of *Calliarthron* sp., smoothing was applied.

XRD

For XRD analysis, the ground samples were studied using a Bruker D8 Advance diffractometer (room temperature) with Cu K α radiation having a θ – θ configuration and a graphite secondary beam monochromator. We performed short XRD analysis in order to inspect the mineralogical content of the whole structures. The scan was done between 3° and 80°, with a 2 θ ° step of 0.05 and 0.5 s per point. For the XRD patterns suitable for Rietveld refinement we measured the diffraction intensities between 20° and 80°, with a 2 θ ° step of 0.02 and a counting time of 8 s per point.

Rietveld method for powder XRD

Implemented in the FULLPROF program (Rodríguez-Carvajal 1981, Thompson *et al.* 1987, Young 1993), the

sistema Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 con un intervalo de barrido de 624 × 624 nm. Para el barrido se utilizaron sondas metálicas de Pt/Ir recién cortadas de 0.25 mm de diámetro. El depósito de las muestras sobre superficies de HPOG recientemente preparadas se realizó como sigue: el material algal fue lavado con agua destilada y secado; se trituraron porciones en un mortero de vidrio y el polvo se depositó sobre los sustratos de HOPG preparados para el análisis.

FTIR

Para obtener información sobre el tipo de biopolímero y la naturaleza química del biomineral, se realizaron mediciones de FTIR. Las muestras se trituraron y se mezclaron con polvo KBr (razón de 100:1), y posteriormente se comprimieron en píldoras. Se empleó un espectrómetro Nicolet 680 FT-IR con una resolución de 4 cm^{-1} y cada muestra se barrió 64 veces. Para determinar el número exacto de ondas de los diferentes grupos químicos producidos en los barridos, éstos se compararon con números de ondas de grupos específicos previamente publicados. En el caso de la FTIR de *Calliarthron* sp., se aplicó suavizado.

XRD

Para el análisis de XRD se estudiaron las muestras pulverizadas usando un difractómetro Bruker D8 Advance (a temperatura ambiente) con radiación de Cu K α , una configuración θ – θ y un monocromador secundario de grafito. Se hicieron análisis cortos de XRD para examinar el contenido mineralógico de las estructuras enteras. El barrido se realizó entre 3° y 80°, con un paso de 2 θ ° de 0.05 y 0.5 s por punto. Para los patrones de XRD adecuados para el refinamiento Rietveld se midieron las intensidades de difracción entre 20° y 80°, con un paso de 2 θ ° de 0.02 y un tiempo de conteo de 8 s por punto.

Método de Rietveld para XRD en polvos

Implementado en el programa FULLPROF (Rodríguez-Carvajal 1981, Thompson *et al.* 1987, Young 1993), el método de Rietveld es utilizado para refinar estructuras de cristales con parámetros iniciales a partir de datos publicados para una estructura de tipo mineral, en este caso la calcita ($a = 4.9896 \text{ \AA}$, $c = 17.0610 \text{ \AA}$, y $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$), la dolomita ($a = 4.812 \text{ \AA}$, $c = 16.020 \text{ \AA}$, y $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) (Effenberger *et al.* 1981), y la aragonita ($a = 4.9611 \text{ \AA}$, $b = 7.9672 \text{ \AA}$, $c = 5.7407 \text{ \AA}$, y $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) (Villiers 1971). El método de Rietveld se usa para varias cosas como estudiar el cambio en la anisotropía de las tensiones entre los átomos cuando éstos interactúan con moléculas orgánicas como en las conchas de moluscos (Pokroy *et al.* 2006) y corales (Przenioslo *et al.* 2008). En el presente trabajo se modificaron los parámetros de Rietveld ya

Rietveld method is used to refine crystal structures with initial parameters from the data reported for a mineral type structure, in this case calcite ($a = 4.9896 \text{ \AA}$, $c = 17.0610 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$), dolomite ($a = 4.812 \text{ \AA}$, $c = 16.020 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) (Effenberger *et al.* 1981), and aragonite ($a = 4.9611 \text{ \AA}$, $b = 7.9672 \text{ \AA}$, $c = 5.7407 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) (Villiers 1971). The Rietveld method is used with many other aims, such as to study the change in the anisotropy of the tensions among atoms when they interact with the organic molecules as in the case of mollusk shells (Pokroy *et al.* 2006) and corals (Przenioslo *et al.* 2008). We modified the Rietveld parameters because the diffractograms showed changes in unit cell parameters, crystal sizes, and peak shape, with tails on the right side. Additionally, we included Mg^{2+} atoms in the calcite structure model (Heredia *et al.* 2005). A pseudo-Voigt function modified by Thompson *et al.* (1987) was chosen to generate the shape of the diffraction peaks. Here we report the refinement of 19 independent parameters for the space group $R\bar{c}$ (No. 167 calcite) and $Pmcn$ (No. 62 aragonite): zero point, scale factor, three background polynomial coefficients, unit cell dimensions, half-width, pseudo-Voigt, asymmetry parameters for the peak shape, and positional and thermal isotropic factors according to the usual functions used in Rietveld refinements, for the ground samples. One excluded region ($28.0\text{--}28.5 \text{ } 2\theta^\circ$) was used. For the microstrain study, the LaB_6 powdered sample was used as standard in order to make corrections due to the instrumental broadening of diffraction lines. The size-microstrain analysis in this study was done using whole-pattern analysis within the Rietveld method. For the size-microstrain analysis within the Rietveld method, the chosen diffraction profile function was the modified Thompson-Cox-Hastings pseudo-Voigt (Thompson *et al.* 1987), with a Lorentzian function for size and a Gaussian for microstrain.

RESULTS

Coralline structure and elemental analysis

The crystal microstructure presents two main types of crystallite shapes: needle-like shapes (*Neogoniolithon trichotomum*, *Jania tenella*, *Amphiroa mexicana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*) and plate-like shapes (*Halitilon gracile*, *Bossiella orbigniana*, *Lithothrix aspergillum*). The complex structures (fig. 2a, e) present textured crystals that can be seen from LVSEM images (fig. 2b, c, d, f, g, h).

The microspheres (fig. 2b–c), interpreted as starch granules by Woelkerling (1988), presented a high Ca^{2+} content, as shown by the EDS analysis (inset in fig. 2b; tables 2, 3, “sphere” columns). Additionally, the samples with crystalline protrusions show a very defined texture (fig. 2a), which can be originated from a central layer (black arrows in fig. 2c). The Mg content (EDS results, table 2) in some samples might

que los difractogramas mostraron cambios en los parámetros de la celda unitaria, los tamaños de los cristales y la forma de los picos, con colas del lado derecho; además se incluyeron átomos de Mg^{2+} en el modelo de la estructura de la calcita (Heredia *et al.* 2005). Se escogió una función pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987) para generar la forma de los picos de difracción. Aquí se reporta el refinamiento de 19 parámetros independientes para los grupos espaciales $R\bar{c}$ (calcita No. 167) y $Pmcn$ (aragonita No. 62): punto cero, factor de escala, tres coeficientes polinomiales de fondo, dimensiones de la celda unitaria, ancho medio, pseudo-Voigt, parámetros de asimetría para la forma de los picos y factores isotrópicos posicionales y térmicos según las funciones normalmente empleadas en el refinamiento Rietveld, para las muestras trituradas. Se utilizó una región excluida ($28.0\text{--}28.5 \text{ } 2\theta^\circ$). Para estudiar la microtensión se usó la muestra pulverizada LaB_6 como estándar para corregir el ensanchamiento instrumental de las líneas de difracción. El análisis del tamaño y la microtensión en este estudio se realizó empleando el análisis del patrón completo dentro del método de Rietveld. Para el análisis del tamaño y la microtensión dentro de este método se escogió la función del perfil de difracción pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987), con una función lorentziana para el tamaño y una gaussiana para la microtensión.

RESULTADOS

Estructura coralina y análisis elemental

La microestructura de los biominerales presenta dos principales tipos de formas cristlinas: en forma de agujas (*Neogoniolithon trichotomum*, *Jania tenella*, *Amphiroa mexicana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*) y en forma de placas (*Halitilon gracile*, *Bossiella orbigniana*, *Lithothrix aspergillum*). Las estructuras complejas (fig. 2a, e) presentan cristales texturizados que pueden observarse en imágenes de LVSEM (fig. 2b, c, d, f, g, h).

Las microesferas (fig. 2b–c), interpretadas como gránulos de almidón por Woelkerling (1988), mostraron un contenido alto de Ca^{2+} según el análisis de EDS (ampliación en fig. 2b; tablas 2, 3, columnas encabezadas “sphere”). Además, las muestras con protrusiones cristalinas muestran una textura muy definida (fig. 2a), que puede originarse de una capa central (flechas negras en fig. 2c). El contenido de Mg (resultados de EDS, tabla 2) en algunas muestras puede ser un factor que reduzca la celda unitaria cristalina (Meldrum y Hyde 2001, Cusack *et al.* 2003) para incrementar la estabilidad (Antao *et al.* 2004). En este caso, en vista del bajo contenido de Mg^{2+} en la estructura coralina ($\sim 1\%$) el biomineral no puede considerarse CaCO_3 magnésico (Tucker y Wright 1991).

El análisis elemental por EDS de los cristales (ampliación en fig. 2b) muestra una notable diferencia en la

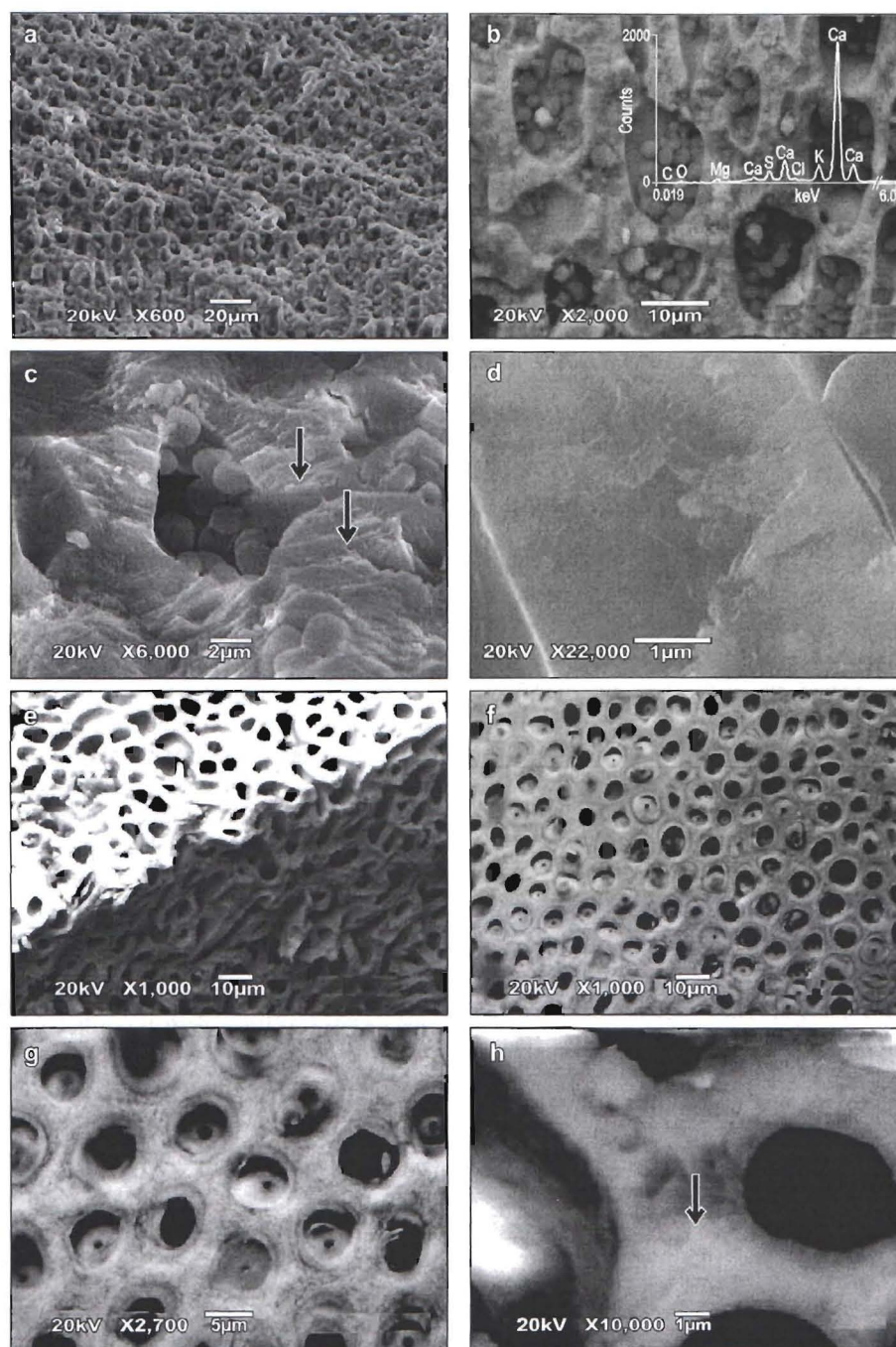


Figure 2. Low vacuum scanning electron microscopy images showing the morphology of *Lithophyllum* aff. *frondosum* (a–d) and *Calliarthron cheilosporoides* (e–h). In the *L.* aff. *frondosum* images it is possible to see the spheres and complex structures and, in more detail, textured crystals joining in a layer (black arrows in c). The *C. cheilosporoides* images show a black structure with crystalline texture similar to that of *L.* aff. *frondosum* (black arrow in h, layer where the textured crystals seem to join). The energy dispersive spectroscopy analysis showed high quantities of calcium (inset in b).

Figura 2. Imágenes de la microscopía electrónica de barrido de bajo vacío mostrando la morfología de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (a–d) y *Calliarthron cheilosporoides* (e–h). En las imágenes de *L.* aff. *frondosum* es posible observar las esferas y las estructuras complejas y, en mayor detalle, los cristales texturizados uniéndose en una capa (flechas negras en c). Las imágenes de *C. cheilosporoides* muestran una estructura con textura cristalina similar a la de *L.* aff. *frondosum* (flecha negra en h, capa donde aparentemente se unen los cristales texturizados). El análisis con espectroscopía de dispersión de energía mostró cantidades altas de calcio (ampliación en b).

be a factor for decreasing the crystalline unit cell (Meldrum and Hyde 2001, Cusack *et al.* 2003) to increase stability (Antao *et al.* 2004). In this case, because of the low Mg^{2+} content in the coralline structure (~1%) the biomineral cannot be considered magnesian $CaCO_3$ (Tucker and Wright 1991).

The EDS elemental analysis of the crystals (inset in fig. 2b) shows a notable difference in stoichiometry in Ca content compared with the pure calcite or aragonite (tables 2, 3). In this case, the Ca content is much higher than the stoichiometrical one in the mineral samples, which can be related to the presence of another unidentified solid containing higher quantities of Ca (possibly the one responsible for the peaks at about 18.45, 21, and 23.9 in $2\theta^\circ$ of the X-ray analysis).

STM

The scanning tunneling images also show two main nano-crystal morphologies (fig. 3; tables 2, 3): needle- and plate-like shapes. The low content of organic material in the biomineral of the algae assists STM imaging because the tunneling electron beam can easily overcome the thickness of the carbonaceous material (fig. 3). For comparison, pyrolytic graphite can be observed at the surface on the left side of *Neogoniolithon trichotomum* (black arrows in fig. 3a). The corresponding crystal shapes and their sizes are shown in table 2, and examples of biomineral samples from four different algal species are shown in figure 3.

The height scales show that the surface of the crystals is very homogeneous; that is, in almost all cases no big color contrasts can be seen (fig. 3).

In the *N. trichotomum* image (fig. 3a), the crystallites do not look structurally homogeneous in shape although they clearly present defined structures. In all cases the low organic content assisted STM imaging. The higher brightness compared with the other images can be due to the presence of non-conductive organic material. The image of *Lithophyllum* aff. *frondosum* (fig. 3b) shows plate-like crystallites (indicated by brackets) that are very smooth in surface and relatively homogeneous in size and shape. In other samples (*Calliarthron cheilosporoides*, fig. 3c) the crystallites have less symmetry but it is possible to observe layers, which are probably crystalline planes. In *Jania tenella* (fig. 3d) the crystals are bigger than those in the other samples (see table 2).

FTIR

The chemical nature of the algae shows three different types of chemical bonds: one is a carbonate mineral and the others are probably a silicate solid and a biopolymer (fig. 4).

Of all the series of bands from the Copralline red algae, the most notable are those of calcite (Bottcher *et al.* 1997) at 2533, 1808, 1446, 870, and 716 cm^{-1} , although bands from an organic molecule at 2945, 2889 (C-H), and 1034 cm^{-1} (C-O) can be seen in *Bossiella orbigniana* and *Calliarthron*

estequiometría del contenido de Ca en comparación con la calcita o la aragonita puras (tablas 2, 3). En este caso, el contenido de Ca es mucho mayor que en la estequiometría de las muestras biominerales, lo que podría estar relacionado con la presencia de otro sólido no identificado con cantidades mayores de Ca (posiblemente el responsable de los picos alrededor de 18.45, 21 y 23.9 en $2\theta^\circ$ del análisis de rayos X).

STM

Las imágenes de STM también muestran dos principales morfologías cristalinas: en forma de agujas y de placas. El bajo contenido de materia orgánica en el biomineral de las algas es favorable para la obtención de imágenes por STM ya que el rayo electrónico de túnel puede fácilmente rebasar el grosor del material carbónico (fig. 3). En comparación, se observa grafito pirolítico en la superficie del lado izquierdo de *Neogoniolithon trichotomum* (flechas negras en fig. 3a). En la tabla 2 se presentan las formas cristalinas correspondientes y sus tamaños, y en la figura 3 se muestran ejemplos de muestras de biomineral de cuatro diferentes especies de algas.

Las escalas de altura indican que la superficie de los cristales es muy homogénea; esto es, en casi ninguno de los casos se observan grandes contrastes de color (fig. 3).

En la imagen de *N. trichotomum* (fig. 3a) la forma de los cristales no parece ser estructuralmente homogénea aunque éstos presentan estructuras claramente definidas. En todos los casos el bajo contenido orgánico favoreció la toma de imágenes por STM. La mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede deberse a la presencia de materia orgánica no conductiva. La imagen de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (fig. 3b) muestra cristales en forma de placas (indicados con corchetes) con una superficie muy lisa, y relativamente homogéneos en tamaño y forma. En otras muestras (*Calliarthron cheilosporoides*, fig. 3c) los cristales son menos simétricos pero es posible observar capas que probablemente constituyen planos cristalinos. En *Jania tenella* (fig. 3d) los cristales son más grandes que los de otras muestras (ver tabla 2).

FTIR

La naturaleza química de las algas muestra tres diferentes tipos de enlaces químicos: uno es un mineral carbonatado y los otros probablemente son un sólido de silicato y un biopolímero (fig. 4).

De todas las series de bandas de las algas rojas las más notables son las de la calcita (Bottcher *et al.* 1997) a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} , aunque se pueden observar bandas de una molécula orgánica a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) en *Bossiella orbigniana* y *Calliarthron cheilosporoides*. También es posible observar bandas de un compuesto de silicio no cristalino a 1110 (Si-O) y 924 cm^{-1} (Si-O) (Lazarev 1972). Las bandas a 2945 y 2889 cm^{-1} son de

Table 2. Elemental analysis (%) by energy dispersive spectroscopy of species of geniculate Corallinales.**Tabla 2.** Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de especies de Corallinales geniculadas.

Element wt (%)	<i>Calliarthron</i>	<i>Amphiroa</i>		<i>Bossiella</i>		<i>Jania</i>		<i>Lithothrix</i>		<i>Haliptilon</i>
		Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	
Ca	70.70	68.80	62.70	14.62	61.90	84.11	78.30	50.50	52.00	85.00
O	29.20	25.20	30.50	24.90	22.76	2.33	15.71	4.20	17.20	13.60
N	—	2.70	2.20	6.44	2.00	10.20	2.31	2.60	2.10	—
Mg	—	1.58	0.90	0.64	0.70	—	0.78	0.17	0.90	—
C	—	0.88	1.00	11.26	1.57	2.56	0.87	1.77	1.64	—
Si	—	0.063	0.13	2.24	0.82	—	0.20	0.07	0.14	—
S	—	0.34	1.00	9.57	1.35	0.11	1.00	0.78	2.00	0.60
CrSS* (nm)	Plate, ~10	Plate, 10–20		Needle, ~100		Needle, ~70		Needle, ~30		Needle ~50

* CrSS = crystallite shape and size (nm) from scanning tunneling microscopy.

Table 3. Elemental analysis (%) by energy dispersive spectroscopy of species of non-geniculate red algae.**Tabla 3.** Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de dos especies de algas rojas no geniculadas.

Element wt (%)	<i>Lithophyllum</i>		<i>Neogoniolithon</i>
	Inner	Sphere	
Ca	63.90	61.79	61.40
O	31.40	17.34	25.15
N	—	—	—
Mg	1.38	0.80	5.80
C	1.00	1.85	7.60
Si	0.11	—	—
S	0.61	1.98	—
Al	0.33	0.17	—
Cl	0.73	10.45	—
K	0.38	5.30	—
CrSS* (nm)	Plate, ~30		Needle, ~30

* CrSS = crystallite shape and size (nm) from scanning tunneling microscopy.

cheilosporoides. It is also possible to detect bands of a non-crystalline silicon compound at 1110 (Si-O) and 924 cm⁻¹ (Si-O) (Lazarev 1972). The bands at 2945 and 2889 cm⁻¹ are hydrocarbon bands (C-H). All the bands due to organic components are strongly reduced when compared with the crystalline phase, which is related to the inorganic/organic ratio. This suggests that the mineral content exceeds exceptionally the quantity of organic content (fig. 4). Although the chemical content in the samples seems to be very homogeneous, the cases of *C. cheilosporoides* and *B. orbigniana* and to a lesser extent of *Corallina*

hidrocarburo (C-H). Todas las bandas atribuibles a los componentes orgánicos se encuentran notablemente disminuidas en comparación con la fase cristalina, lo que está relacionado con la razón de componentes inorgánicos/orgánicos. Esto sugiere que el contenido mineral excepcionalmente excede la cantidad de contenido orgánico (fig. 4). Aunque el contenido químico de las muestras parece ser muy homogéneo, los casos de *C. cheilosporoides* y *B. orbigniana*, y en menor medida de *Corallina vancouveriensis*, son ligeramente diferentes debido a la fuerte intensidad de las bandas a 1110 (Si-O) y 1034 cm⁻¹ (C-O).

Estructura interna del biomineral por XRD en polvo

Las algas coralinas están principalmente compuestas de calcita muy cristalina, aragonita (fig. 5) y una tercera fase cristalina no identificada (indicada con flechas en fig. 6). En todos los casos la calcita es la fase mineral más representativa como se ha descrito en otros casos también en presencia de aragonita (Medaković *et al.* 1995).

La diferencia principal entre la calcita y la aragonita mineral y el biomineral de las algas coralinas es la posición de los picos, que está directamente relacionada con el contenido de Mg²⁺ y otros iones. Además, el contenido de materia orgánica puede modificar los parámetros cristalinos (tabla 4) (Medaković *et al.* 1995, Przenioslo *et al.* 2008).

Las algas coralinas presentan picos que cambiaron en sus posiciones cristalográficas hacia ángulos mayores. Esto significa un aumento en el tamaño de la celda unitaria (fig. 2) como el encontrado por otros autores (Medaković *et al.* 1995) en algas rojas.

Análisis de la red cristalina usando el método de Rietveld para XRD en polvos

Con base en los datos de difracción se realizó un análisis de Rietveld de las muestras biogénicas. Las mediciones de



Figure 3. Scanning tunneling microscopy of ground samples of four coralline red algae deposited onto pyrolytic graphite. In *Neogoniolithon trichotomum* (a) the crystallites do not look structurally homogeneous and are not very regular in shape although clearly needle-like structures; the higher brightness compared with the other images can be due to the presence of non-conductive organic material. The *Lithophyllum* aff. *frondosum* (b) image shows plate-like crystallites (brackets) that are very smooth in surface and relatively homogeneous in structure. In *Calliarthron cheilosporoides* (c) the crystallites have less symmetry and it is possible to observe grooves that can be crystalline planes. In *Jania tenella* (d) the crystals are clearly bigger than those observed in the other images, and are very homogeneous in surface and in size.

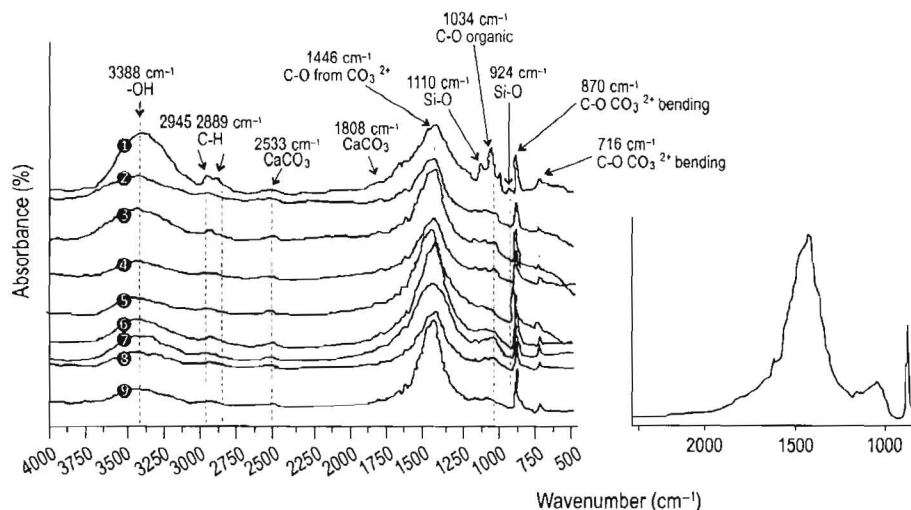
Figura 3. Microscopía de efecto túnel de muestras pulverizadas de cuatro algas rojas coralinas depositadas en grafito pirolítico. En *Neogoniolithon trichotomum* (a) los cristales no parecen ser estructuralmente homogéneos y no son muy regulares en su forma aunque claramente son estructuras en forma de aguja; la mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede atribuirse a la presencia de material orgánico no conductivo. La imagen de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (b) muestra cristales en forma de placa (corchetes) con superficies muy lisas y estructuras relativamente homogéneas. En *Calliarthron cheilosporoides* (c) los cristales presentan menor simetría y es posible observar ranuras que pueden ser planos cristalinos. En *Jania tenella* (d) los cristales son claramente más grandes que los observados en las otras imágenes, y muy homogéneos en superficie y tamaño.

vancouveriensis are slightly different due to the high intensities of the bands at 1110 (Si-O) and 1034 cm^{-1} (C-O).

Inner structure of the biomineral by powder XRD analysis

Coralline algae are mainly composed of highly crystalline calcite, aragonite (fig. 5), and a third crystalline phase not

XRD y Rietveld mostraron una estructura cristalina de calcita y aragonita ligeramente modificada y una tercera fase mineral no identificada (flechas en fig. 6). La principal reflexión (104) es de la calcita (figs. 5, 6). En el refinamiento de los datos con mayores intensidades de aragonita no fue posible alcanzar un modelo estructural correcto. La razón puede haberse en el bajo grado de cristalinidad y la escasa información (conteos) del mineral del grupo aragonita. Un paso



1. *Calliarthron*, 2. *Lithothrix*, 3. *Bossiella*, 4. *Lithophyllum*, 5. *Neogoniolithon*, 6. *Haliptilon*, 7. *Corallina*, 8. *Amphiroa*, 9. *Jania*.

Figure 4. Fourier transform infrared spectroscopy of pristine samples of red algae. A series of bands related to calcite can be observed at 2533, 1808, 1446, 870, and 716 cm^{-1} . The bands at 2945, 2889 (C-H), and 1034 cm^{-1} (C-O) clearly indicate the presence of organic molecules, and those at 1110 (Si-O) and 924 cm^{-1} (Si-O) the presence of a silicon compound. In the insert, a more accurate observation of the frequencies around the amide I and II positions clearly shows no presence of those bands (near the vertical lines).

Figura 4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de muestras pristinas de algas rojas. Se puede observar una serie de bandas relacionadas con la calcita a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} . Las bandas a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) claramente indican la presencia de moléculas orgánicas, y las bandas a 1110 (Si-O) y 924 cm^{-1} (Si-O) la presencia de un compuesto de silicio. En la ampliación, una observación más precisa de las frecuencias alrededor de las posiciones de amida I y II muestra claramente la ausencia de estas bandas (cerca de las líneas verticales).

identified (reflections with arrows in fig. 6). In all cases calcite is the most representative mineral phase as is described in other cases with the presence of aragonite (Medaković *et al.* 1995).

The main difference between the mineral calcite and aragonite and coralline alga biomineral is the position of the peaks, which is directly related to their Mg^{2+} content as well as to other ions. Additionally, the content of organic material can change the crystalline parameters (table 4) (Medaković *et al.* 1995, Przenioslo *et al.* 2008).

Coralline algae have peaks that changed in their crystallographic positions. The change is towards higher angles. It means a decrease in the unit cell size (fig. 2) as reported for red algae by other authors (Medaković *et al.* 1995).

Analysis of the bulk crystalline lattice using the Rietveld method for powder XRD

Based on diffraction data we performed Rietveld analysis of the biogenic samples. The XRD and Rietveld measurements showed a slightly modified calcite and aragonite crystalline structure and an unidentified third mineral phase (arrows in fig. 6). The main reflection (104) is of the calcite (figs. 5, 6). In the refinement of the data with higher aragonite intensities it was not possible to attain a correct structural model. The reason can be the low degree of crystallinity and scant information (counts) in the aragonite group mineral. A

adicional incluyendo sólo los datos de la fase de calcita mejoró el análisis (figs. 5, 6).

En la tabla 5 se comparan los parámetros de la red de calcita y aragonita resultantes, así como los parámetros de tensión determinados en nuestras muestras con la calcita y aragonita de referencia y otros datos. La reducción en el tamaño de la celda unitaria se debe a Mg^{2+} incorporado en la red, y las tensiones y la anisotropía probablemente se deben a la presencia de estos iones en diferentes partes de la estructura cristalina y a que no están homogéneamente distribuidos en ella. Asimismo, la asimetría de los picos (figs. 5, 6) puede estar relacionada con un cambio en los parámetros estructurales de la calcita (Itaya *et al.* 1997).

El valor de la microtensión (0.4%) probablemente se deba a la baja intensidad de las líneas de difracción en la fase aragónica en comparación con la calcítica dentro del mismo patrón de XRD, lo cual podría indicar la presencia de impurezas. Además, en algunos casos las intensidades de las líneas de difracción son comparables con el fondo, lo que resulta una dificultad adicional en la determinación del tamaño y la microtensión mediante el método de Rietveld.

DISCUSIÓN

Dado que la LVSEM puede producir imágenes de muestras biológicas con alta resolución, cabe esperar imágenes

further step just including the calcite phase data improved the analysis (figs. 5, 6).

The resulting lattice parameters of calcite and aragonite, as well as the strain parameters determined for our samples are compared with the reference calcite and aragonite and other data in table 5. The reduction in unit cell size is due to the Mg^{2+} incorporated into the lattice, and the strains and anisotropy are probably due to the presence of these ions in different parts of the crystallite structure and not homogeneously distributed in it. Moreover, the asymmetry of the peaks (figs. 5, 6) could be related to a change in the structural parameters of the calcite (Itaya *et al.* 1997).

Furthermore, the microstrain value (0.4%) is probably due to the low intensity of the diffraction lines in the aragonite phase as compared with those from calcite within the same XRD pattern. This may confirm the presence of impurities. Moreover, in some cases the intensities of those diffraction lines are comparable with the background, which is an additional difficulty in extracting size-microstrain by the Rietveld method.

DISCUSSION

Since LVSEM can produce high resolution images of biological samples we expect to have homogeneous images of the organic and inorganic material, as seen in figure 2. It is clear that the carbonate mineral is highly arranged in texture starting at a base where two layers of crystals join (black arrows in fig. 2). LVSEM showed a highly ordered polycrystalline structure (fig. 2). Moreover, the organic content is low, enabling STM imaging to be performed relatively easily without regions blocking the electron current intensities (fig. 3). Another interesting structural aspect of the high resolution STM is the sensitivity to changes in topography. In our case the topography is very homogeneous and in some samples the change in color (scale bars) indicates a very small change in height between crystals. This means that the nanocrystals are most probably coupled to each other in clusters (fig. 3). These clusters explain why the Rietveld measurement produced an average crystal size of ~ 200 nm. Two main crystal shapes were observed: needle- and plate-like crystallites. The elemental analysis sometimes showed a variable content of elements (tables 2, 3), with a very high content of Ca in the structure and not necessarily a high amount of Mg in it (just in the case of *N. trichotomum* the content is $\sim 5.8\%$). Other elements such as Ca, O, and C occurred in almost all the samples though not in the same proportion, but a high percent of those elements were present in the $CaCO_3$ material as shown by the FTIR and XRD analyses (figs. 4, 5, 6).

The asymmetry of the XRD peaks is noteworthy, although its relevance to the crystal shape or relationship with the elemental content is not straightforward. The

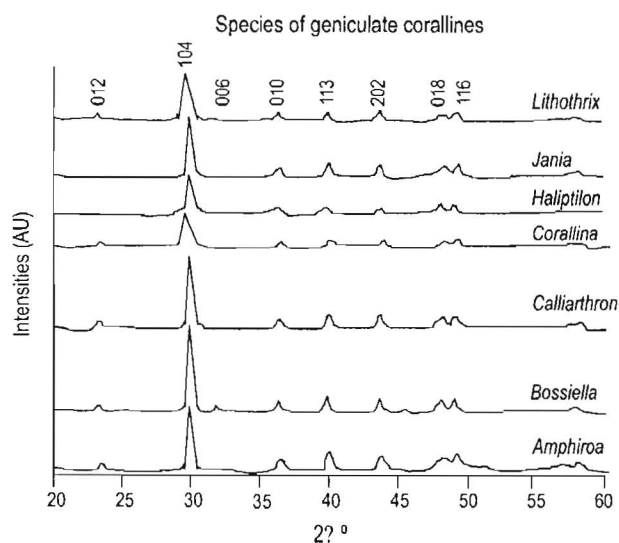


Figure 5. X-ray diffractogram of geniculate coralline species. The most intense peak corresponds to the calcite (104) reflection and no amorphous phase is seen in any case. The height of the peak reflects a qualitative increase in size of the crystallites when the crystals have an isotropic shape. In that case, *B. orbigniana* would present one of the biggest crystallites in the group.

Figura 5. Difractograma de rayos X de las especies coralinas geniculadas. El pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. La altura del pico refleja un incremento cualitativo en el tamaño de los cristales cuando tienen una forma isotrópica. En tal caso, *B. orbigniana* presentaría uno de los cristales más grandes del grupo.

homogéneas del material orgánico e inorgánico como las que se aprecian en la figura 2. Es claro que el mineral carbonatado tiene una textura muy ordenada desde la base donde se unen dos capas de cristales (flechas negras en fig. 2). La LVSEM mostró una estructura policristalina muy ordenada (fig. 2). Además, el bajo contenido orgánico permitió tomar imágenes por STM con cierta facilidad sin que algunas regiones obstruyeran el flujo de electrones (fig. 3). Otro aspecto estructural de interés de la STM de alta resolución es la sensibilidad a cambios en la topografía. En nuestro caso de estudio la topografía es muy homogénea y en algunas muestras el cambio de color (barras de escala) indica un cambio muy pequeño en altura entre los cristales. Esto significa que los nanocristales muy probablemente estén acoplados entre sí en conglomerados (fig. 3) que explican por qué la medición Rietveld produjo un tamaño de cristal medio de ~ 200 nm. Se observaron dos principales formas cristalinas: cristales en forma de agujas y de placas. El análisis de elementos a veces mostró un contenido variable de éstos (tablas 2, 3), con un contenido muy alto de Ca en la estructura pero no necesariamente una cantidad muy alta de Mg (sólo en el caso de *N. trichotomum* el contenido fue de $\sim 5.8\%$). Se observaron otros elementos como Ca, O y C en casi todas las muestras aunque no en la misma proporción, pero se encontró un alto

Table 4. Comparison of the positions in the Bragg reflections of the calcite and aragonite of mineral origin for the Rietveld refinement and the peaks found in the X-ray diffraction experiments of the geniculate and nongeniculate species of red algae.**Tabla 4.** Comparación de las posiciones en las reflexiones de Bragg de la calcita y la aragonita de origen mineral para el refinamiento Rietveld y los picos encontrados en los experimentos de difracción de rayos X de las especies geniculadas y no geniculadas de algas rojas.

Reflections between (2 θ)	Calcite		Aragonite		Geniculate species*		Nongeniculate species*			Unknown	
	Angle (2 θ)	Reflection	Angle (2 θ)	Reflection	Angle (2 θ)	Reflection	d (nm)	Angle (2 θ)	Reflection	d (nm)	Angle (2 θ)
10–18	23.0	012	21.0	110	24.4	012	0.36	20.8a	110	0.43	26.0
	29.4	104	23.4	020	29.8c	104	0.29	23.8c	012	0.37	26.7
	31.5	006	26.24	111	31.73c	006	0.28	27.6c		0.32	28.4
			31.2	002							
	36.0	110	33.17	012	36.36c	010	0.25	33.0a	012	0.27	
			36.24	102				35.7a	010	0.25	
	39.4	113			39.84c	113	0.22	44.1c	010	0.2	
	43.2	202	37.3	031	43.7c	202	0.2	52.9c	113	1.7	
	47.5	018	41.2	211	48.1c	018	0.18	62.5c	202	0.15	
	48.5	116	45.94	221	49.1c	116	0.18				

*See table 1.

Table 5. Lattice parameters and discrepancy factors for the calcite phase of *Lithophyllum* sp. A clear decrease can be observed in the unit cell size as well as in the maximum strain. The strain value can be explained by the presence of other elements in the unit cell and a possible interaction with organic groups.**Tabla 5.** Parámetros de la red y factores de discrepancia para la fase calcítica de *Lithophyllum* sp. Se observa una reducción clara en el tamaño de la celda unitaria así como en la tensión máxima. El valor de la tensión puede explicarse por la presencia de otros elementos en la celda unitaria y por una posible interacción con grupos orgánicos.

Calcite lattice parameters	$a = 4.91807(5)$ $c = 16.72039(3)$
Decrease in size (%) compared with mineral calcite	$a = 1.4$ $c = 2.0$
Average maximum strain and standard deviation (anisotropy)	0.40% (5.4714)
R_{exp} (%)	4.32
R_{Bragg} (%)	3.72

structure of the crystallite is distorted and our model assumes an increase in the strain of the components of the crystals. This may be organic.

Further analytical studies with the Rietveld method are planned to visualize the lattice structures and their geometrical distortions. The features in the X-ray diffractograms of *Calliarthron cheilosporoides* and *Bossiella orbigniana* are very similar among them but very different to those of *Lithotrix aspergillum* and *Amphiroa mexicana*. At least in this case these differences agree with the molecular

porcentaje de estos elementos en el material de CaCO₃, como lo indican los análisis de FTIR y XRD (figs. 4, 5, 6).

La asimetría de los picos de XRD es notable, aunque no es clara su relevancia en la forma del cristal o su relación con el contenido elemental. La estructura del cristal está distorsionada y nuestro modelo supone un incremento en la tensión de los componentes de los cristales. Esto podría ser orgánico.

Se planea realizar estudios analíticos adicionales con el método de Rietveld para visualizar las estructuras de la red y sus distorsiones geométricas. Las características en los difractogramas de rayos X de *Calliarthron cheilosporoides* y *Bossiella orbigniana* son muy similares entre sí pero muy distintas a las de *Lithotrix aspergillum* y *Amphiroa mexicana*. Al menos en este caso estas diferencias concuerdan con las filogenias moleculares, lo que sugiere que el proceso de biomineralización puede ser controlado genéticamente expresando alguna característica filogenética.

En este estudio se consideraron especímenes de dos regiones biogeográficas con diferentes patrones de temperatura y salinidad; sin embargo, nuestros resultados no reflejan cambios significativos en los parámetros medidos mediante diferentes técnicas microscópicas. Medaković *et al.* (1995) mencionaron que las tasas de calcificación y la proporción de la calcita magnésica en aguas frías son menores que en aguas tropicales. Esto no resultó evidente en nuestro estudio, posiblemente porque las muestras en general correspondieron a la misma temporada en ambas regiones. De acuerdo con nuestros resultados, en futuros trabajos será necesario comparar una o más especies en ambas regiones durante el mismo periodo estacional y analizar su comportamiento con respecto a la biomineralización.

phylogenies, suggesting that the biomineralization process can be genetically controlled expressing some phylogenetic features.

This study considered specimens from two biogeographic regions with different temperature and salinity patterns; however, our results do not reflect significant changes in the parameters measured using different microscopy techniques. Medaković *et al.* (1995) mentioned that calcification rates and the proportion of magnesium calcite in colder waters are lower than those in the tropics. This was not observed in our analysis, possibly because the samples, in general, corresponded to the same season in both regions. According to these results, in future studies it is necessary to compare one or more species in both regions during the same seasonal period and analyze their behavior with respect to biomineralization.

CONCLUSIONS

We have shown, by LVSEM and STM, that the crystals of the different genera studied here are very well arranged on two scales: (1) in clusters of nanocrystals and (2) in a palisade-like structure in areas where presumably the cell assembles these crystals. It is feasible that prismatic calcite grows in vessels as clusters and is then arranged layer by layer along the surface in the central layer or organic template which helps to orient and give structural homogeneity. The organic content seems to be non-proteinaceous by FTIR analysis. Furthermore, the elemental analysis showed a high diversity of elements such as Mg^{2+} probably included in the lattice and related to the reduction and general change in calcite unit cell size. Hence, the change in unit cell seems to be isotropical and the peak asymmetries have no clear interpretation although some authors regard them as changes in the mineralogical solids by biological activity called mineralogical phase transitions (Itaya *et al.* 1997).

In summary, biostructural studies of biogenic crystals will lead to a better understanding of their complicated properties and mechanisms of growth. Additional studies with more red coralline algal species are necessary to understand if the biomineralization is related to the phylogenetic relationships and biomineral micro- and nanostructure. In the case of red algae, further studies using STM and the Rietveld method are being conducted by our group to better determine the responsibility of ions and biopolymers in the formation of the biomineral.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CONACYT (Mexico) and UNAM. The first author thanks CONACYT for financial support (grant no. 144066). We thank the central microscopy laboratory at the Physics Institute (UNAM) and especially C Magaña for his technical assistance, as well as M Cusack (Department of Geographical and Earth Sciences, University

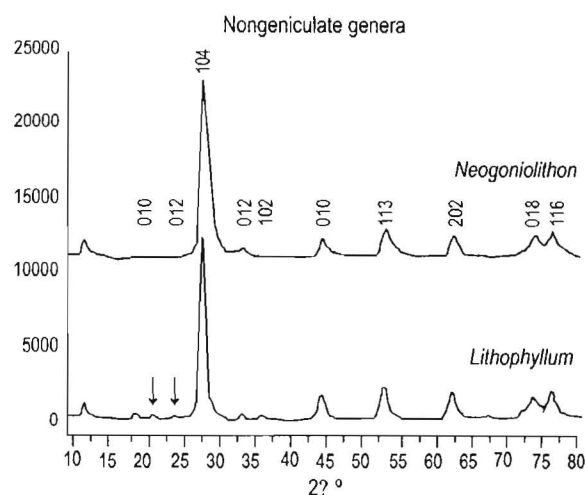


Figure 6. X-ray diffractograms of species of nongeniculate corallines. From the FTIR, as seen in figure 4, the most intense peak corresponds to the calcite (104) reflection and no amorphous phase is seen in any case. A third crystalline phase corresponding to the positions indicated by arrows was not identified. Almost all the calcite peaks show high asymmetry with a tail on the right side.

Figura 6. Difractograma de rayos X de las especies de coralinas geniculadas. A partir del FTIR, como se observa en la figura 4, el pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. No se identificó una tercera fase cristalina que corresponda a las posiciones indicadas con flechas. Casi todos los picos de la calcita muestran una alta asimetría con la cola del lado derecho.

CONCLUSIONES

Por medio de LVSEM y STM se mostró que los cristales de los diferentes géneros estudiados están bien ordenados en dos escalas: (1) en conglomerados de nanocristales y (2) en una estructura como palizada en zonas donde la celda presumiblemente congrega estos cristales. Es posible que la calcita prismática crezca en vasos como racimos y luego se ordena capa por capa a lo largo de la superficie en la capa central o plantilla orgánica que ayuda a orientar y proporciona homogeneidad estructural. Según el análisis de FTIR, el contenido orgánico parece no ser protéico. Además, el análisis elemental mostró una gran diversidad de elementos como Mg^{2+} probablemente incluidos en la red y asociados con la reducción y cambio general en el tamaño de la celda unitaria de la calcita. Por tanto, el cambio en la celda unitaria pareciera ser isotrópico y la asimetría de los picos no tiene una clara interpretación, aunque algunos autores la consideran como cambios en los sólidos mineralógicos por actividad biológica llamados transiciones de fase mineralógica (Itaya *et al.* 1997).

En resumen, los estudios bioestructurales de cristales biogénicos proporcionan un mejor conocimiento de sus complicados mecanismos de crecimiento y propiedades. Se

- Maluf LY. 1983. Physical oceanography. In: Cody TJ, Cody ML (eds.), Island Biogeography in the Sea of Cortez. Univ. California Press, Berkeley, pp. 13–25.
- Mann S. 2001. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Medaković D, Popović S, Zavadnik N, Gržeta B, Plazonic M. 1995. X-ray diffraction study of mineral components in calcareous algae (Corallinaceae, Rhodophyta). Mar. Biol. 122: 479–485.
- Meldrum FC, Hyde ST. 2001. Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. J. Crystal Growth 231: 544–558.
- Pokroy B, Fitch AN, Lee PL, Quintana JP, Caspi EN, Zolotoyabko E. 2006. Anisotropic lattice distortions in the mollusk-made aragonite: A widespread phenomenon. J. Struct. Biol. 153: 145–150.
- Przenioslo R, Stolarski J, Mazur M, Brunelli M. 2008. Hierarchically structured scleractinian coral biocrystals. J. Struct. Biol. 161: 74–82.
- Pueschel CM, Eichelberger HH, Trick HN. 1992. Specialized calciferous cells in the marine alga *Rhodogorgon caribbowensis* and their implications for models of red algal calcification. Protoplasma 166: 89–98.
- Rodríguez-Carvajal J. 1981. FULLPROF program for Rietveld refinement and pattern matching analysis (unpublished). The program is a strongly modified version of that described by DB Wiles and RA Young.
- Silva PC, Johansen HW. 1986. A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). Br. Phycol. J. 21: 245–254.
- Steneck RS. 1986. The ecology of coralline algal crusts: Convergent patterns and adaptative strategies. Ann. Rev. Ecol. Syst. 17: 273–303.
- Thompson P, Cox DE, Hastings JB. 1987. Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron X-ray data from Al_2O_3 . J. Appl. Crystallogr. 20: 79–83.
- Tucker ME, Wright VP. 1991. Carbonate Sedimentology. Wiley-Blackwell.
- Villiers JPR. 1971. Crystal structures of aragonite, strontianite and witherite. Am. Mineral. 56: 758–767.
- Warwick RM. 1988. The level of taxonomic discrimination required to detect pollution effects on marine benthic communities. Mar. Pollut. Bull. 19: 259–268.
- Woelkerling WJ. 1988. The Coralline Red Algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. British Museum and Oxford University Press, London and Oxford, 268 pp.
- Wyrski K. 1965. Corrientes superficiales del Océano Pacífico oriental tropical. Bull. Inter-Am. Trop. Tuna Comm. 9(5): 270–295.
- Young RA. 1993. The Rietveld Method. Oxford Univ. Press, Oxford.

Recibido en mayo de 2009;
aceptado en diciembre de 2009.

of Glasgow) for her great interest, scientific support, and helpful discussions. All authors thank AM D'amore Wilkinson from the department of Linguistics, Universidad Autonoma de Zacatecas for her important help with the English version.

REFERENCES

- Addadi L, Weiner S. 1992. Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem.* 31(2): 153–169.
- Adey WH. 1970. The effects of light and temperature on growth rates in boreal-subarctic crustose corallines. *J. Phycol.* 6: 269–276.
- Aizenberg J, Albeck S, Weiner S, Addadi L. 1994. Crystal-protein interactions studied by overgrowth of calcite on biogenic skeletal elements. *J. Crystal Growth* 142: 156–164.
- Allemand D, Ferrier-Pages C, Furla P, Houlbreque F, Puverel S, Reynaud S, Tambutte E, Tambutte S, Zoccola D. 2004. Biomineralisation in reef-building corals: From molecular mechanisms to environmental control. *C. R. Palevol.* 3: 453–467.
- Antao SM, Mulder WH, Hassan I, Crichton WA, Parise JB. 2004. Cation disorder in dolomite, CaMg(CO₃)₂, and its influence on the aragonite + magnesite ↔ dolomite reaction boundary. *89(7):* 1142–1147.
- Bilan MI, Usov AI. 2001. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 27: 2–16.
- Bilyard RG. 1987. The value of benthic infauna in marine pollution monitoring studies. *Mar. Pollut. Bull.* 18(11): 581–585.
- Binning G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. 1982. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49: 57.
- Borowitzka MA. 1979. Calcium exchange and the measurement of calcification rates in the calcareous red alga *Amphiroa foliacea*. *Mar. Biol.* 50: 339–347.
- Bottcher ME, Gehlken PL, Steele DF. 1997. Characterization of inorganic and biogenic magnesian calcites by Fourier transform infrared spectroscopy. *Solid State Ionics* 101–103: 1379–1385.
- Cusack M, Fraser AC, Stachel T. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 134: 63–69.
- Degens T. 1989. *Perspectives on Biogeochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 423 pp.
- De la Lanza EG. 1991. *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT Editor, Mexico, 579 pp.
- Effenberger H, Mereiter K, Zemann J. 1981. Crystal structure refinements of magnesite, calcite, rhodochrosite, siderite, smithsonite, and dolomite, with discussion of some aspects of the stereochemistry of calcite type carbonates. *Z. Kristallogr.* 233–243.
- Fragoso D, Rodríguez D. 2002. Corallinas no geniculadas en las costas del Pacífico tropical mexicano. *An. Inst. Biol. Ser. Bot.* 73(2): 97–136.
- García M. 2009. Estructura comunitaria de la fauna asociada a algas submareales en tres sitios contrastantes en Zihuatanejo, Guerrero. M.Sc. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 99 pp.
- Haikali BE, Bensoussan N, Romano JC, Bousquet V. 2004. Estimation of photosynthesis and calcification rates of *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, by measurements of dissolved oxygen, pH and total alkalinity. *Sci. Mar.* 68(1): 45–56.
- Harrington LM. 2004. Ecology of crustose coralline algae: Interactions with scleractinian corals and responses to requieren más trabajos sobre especies de algas rojas coralinas para entender si la biomineralización está relacionada con las relaciones filogenéticas y la micro y nanoestructura de biomineral. En el caso de las algas rojas, se están realizando más estudios usando STM y el método de Rietveld para poder determinar mejor la responsabilidad de los iones y los biopolímeros en la formación del biomineral.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (México) y la UNAM. D. Fragoso agradece a CONACYT (México) por el apoyo financiero (num. de beca 144066). Agradecemos al laboratorio central de microscopía del Instituto de Física (UNAM) y en particular a C Magaña por su asistencia técnica, así como a M Cusack (Departamento de Ciencias Geográficas y de la Tierra, Universidad de Glasgow) por su gran interés, apoyo científico y discusiones beneficiosas. Todos los autores agradecen a AM D'amore Wilkinson del departamento de Linguística de la Universidad Autónoma de Zacatecas por su importante ayuda en la versión original en inglés.

Traducido al español por Christine Harris.

- environmental conditions. Ph.D. thesis, School of Marine Biology and Aquaculture, James Cook University, 149 pp.
- Heredia A. 2000. Analysis of modern and ancient bones: Morphology, structure and contributions to the study of biomaterials. B. Sc. Thesis. Faculty of Sciences. Universidad Nacional Autónoma de México. 64 pp.
- Heredia A, Rodríguez-Hernández AG, Lozano LF, Peña-Rico MA, Velázquez R, Basiuk VA, Bucio L. 2005. Microstructure and thermal change of texture of calcite crystals in ostrich eggshell *Struthio camelus*. *Mater. Sci. Eng. C25:* 1–9.
- Hubbs CL, Roden GI. 1964. Oceanography and marine life along the Pacific coast of Middle America. In: Wauchope R (ed.), *A Handbook of Middle American Indians*. Univ. Texas Press, Austin, pp. 143–186.
- Itaya T, Tomuro M, Ninagawa K. 1997. Asymmetric X-ray diffraction peak of metamorphosed carbonaceous material. *Island Arc* 6: 228–232.
- Kamenos NA, Cusack M, Moore PG. 2008. Coralline algae are global palaeothermometers with bi-weekly resolution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72: 771–779.
- Kelahr BP, Underwood AJ, Chapman MG. 2003. Experimental transplantations of coralline algal turf to demonstrate causes of differences in macrofauna at different tidal heights. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 282: 23–41.
- Lazarev AN. 1972. *Vibrational Spectra and Structure of Silicates*. Consultants Bureau, New York.
- López N, Rodríguez D, Candelaria C, González-González J. 2000. Subtidal macroalgal communities in Acapulco and Zihuatanejo, Guerrero, Mexico. In: Munawar M, Laurence SG, Munawar IF, Malley DF (eds.), *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ecovision World Monograph Series, pp. 335–351.
- López N, Rodríguez D, Candelaria C. 2004. Intraspecific variation in algal species in Guerrero, Mexico. *Universidad y Ciencia (spec. num.)* 1: 7–15.