



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas

Título de la tesis

Fijación de nitrógeno en Bahía San Quintín, Baja California

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

Julieta Hernández López

Ensenada B. C. México, Enero de 2017

Resumen

FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN BAHÍA SAN QUINTÍN, BAJA CALIFORNIA

Las praderas de pastos marinos son uno de los ecosistemas más productivos en el mundo y prestan una gran cantidad de servicios ambientales. Junto con la luz y la temperatura, el nitrógeno (N) es un factor que limita su crecimiento y la fijación de N_2 es un proceso que puede contribuir a aliviar dicha limitación. En este estudio se determinaron las tasas de fijación de N_2 en praderas de *Zostera marina* y se estudió el contenido y la composición isotópica en los tejidos de dos de las principales macrófitas de Bahía San Quintín (BSQ), el pasto *Z. marina* y la macroalga *Ulva* spp. BSQ es una laguna costera localizada en el noreste del Océano Pacífico, en donde las surgencias costeras son intensas durante primavera e inicio de verano. Las mareas controlan la dinámica y la distribución de las propiedades del agua dentro de la laguna ya que los aportes terrestres de agua son considerados nulos. Los muestreos de tejidos para la determinación de la composición elemental e isotópica de C y de N, se realizaron en el periodo comprendido entre febrero de 2013 y febrero de 2014 de manera bimensual, en una red de nueve estaciones distribuidas en toda la laguna a lo largo de un gradiente con diferente influencia oceánica. La variabilidad temporal del C y del N en ambas macrófitas aparentemente estuvo determinada por variaciones en las tasas de crecimiento y en el caso del N también por su disponibilidad en el medio. Espacialmente la variación de la razón C/N estuvo relacionada con los gradientes del nitrógeno inorgánico disuelto proveniente del océano. El valor promedio anual

de $\delta^{13}\text{C}$ y de $\delta^{15}\text{N}$ fue de $-9.7 \pm 0.1 \text{ ‰}$ y de $11.3 \pm 0.1 \text{ ‰}$ para *Z. marina* y de $-12.4 \pm 0.2 \text{ ‰}$ y de $13.1 \pm 0.1 \text{ ‰}$ para *Ulva* spp. Las diferencias en la composición isotópica entre ambas macrófitas probablemente se deben a factores como el tiempo de recambio isotópico, que es menor en *Ulva* spp. que en *Z. marina* y a diferencias en el fraccionamiento durante la captación y la asimilación del C y del N. La poca variabilidad espacial de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ refleja la distribución homogénea del C inorgánico. En general los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron más altos en los tejidos de ambas macrófitas que en el nitrato oceánico ($9.2 \pm 0.3 \text{ ‰}$), indicando un enriquecimiento del reservorio de N al interior de la laguna, asociado a los procesos de nitrificación-desnitrificación acoplados en los sedimentos. El patrón de la distribución espacial de $\delta^{15}\text{N}$ fue consistente durante todos los periodos de muestreo. En la zona central, los tejidos estuvieron enriquecidos con ^{15}N con respecto a las otras zonas de la laguna, lo cual está asociado al enriquecimiento del reservorio del N en los sedimentos debido a los procesos acoplados de nitrificación-desnitrificación y probablemente a tasas de fijación más bajas. En la zona más interna se encontraron los valores de $\delta^{15}\text{N}$ más bajos, en donde, para el periodo de invierno, se encontró que la contribución de la fijación de N_2 a la demanda de N por parte de *Z. marina* es mayor ($\sim 10\%$).

Para la determinación de las tasas de fijación en los sedimentos y en la filósfera de *Z. marina* el muestreo se realizó en cuatro sitios durante el invierno de 2015. En cada sitio se recolectaron núcleos de sedimento dentro de la pradera y en la zona adyacente a la pradera sin vegetación. El rango de variación de las tasas de fijación de N_2 en BSQ fue de 167 a $288 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ siendo las bacterias heterótrofas el grupo con mayor contribución, tanto en los sedimentos como en la

filósfera. La ausencia de diferencias significativas espaciales de las tasas de fijación de N_2 , probablemente se debe a que el muestreo se realizó durante el invierno, periodo en el cual las tasas de crecimiento y la biomasa de *Z. marina* son las más bajas comparadas con otras estaciones del año, lo que ocasiona que el C orgánico lábil disponible para los diazótrofos varíe poco, inclusive entre los sedimentos con y sin vegetación, así como entre profundidades del sedimento. Las bacterias epífitas contribuyeron únicamente con el 7% de la fijación total. Se estimó que durante el invierno las tasas de fijación de N_2 pueden corresponder a una tercera parte de las tasas de desnitrificación, por lo que ésta reacción de incorporación de N nuevo puede representar un proceso importante en el balance de N en BSQ. Sin embargo, para tener conclusiones más contundentes es necesario medir tasas de fijación de N_2 durante otras temporadas del año, ya que las tasas podrían ser mayores cuando se presentan las máximas tasas de crecimiento y biomasa de *Z. marina*.

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

FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN BAHÍA SAN QUINTÍN, BAJA CALIFORNIA

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

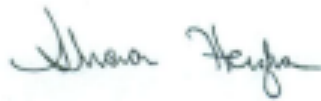
PRESENTA

JULIETA HERNÁNDEZ LÓPEZ

Aprobada por:



Dr. Victor F. Camacho-Ibar
Director de tesis



Dra. Sharon Z. Herzka-Llona
Sinodal



Dr. Francisco Delgadillo-Hinojosa
Sinodal



Dr. Ramon Cajal Medrano
Sinodal



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Sinodal

DEDICATORIA

A mi hija Sofía y a mi esposo Gerardo

A mis padres Yolanda y León Jesús

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto “*Estudio integral del ciclo del nitrógeno en Bahía Falsa*” con No. CB-2010-01-154376 otorgado al Dr. Víctor F. Camacho-Ibar con el cual se financió este trabajo y la beca que se me otorgó de septiembre a diciembre de 2015. También agradezco a CONACyT por la beca con No. 205987 para poder realizar mi doctorado.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Víctor Camacho-Ibar, aunque hubo momentos de mucha tensión siempre fue comprensivo y paciente. Ha sido un gran maestro, siempre buscó la manera de darme el mejor consejo respetando mi punto de vista. Gracias por la oportunidad, el apoyo, el tiempo y la confianza, por cuestionarme y escucharme, por alentarme. GRACIAS VÍCTOR!

También agradezco a la Dra. Sharon Herzka, por estar siempre al pendiente de mí, por hacerme sentir respaldada y apoyada, por todos sus comentarios y consejos, por su amistad y el entusiasmo que puso en este trabajo para darle brillo a mis escritos.

A mis sinodales el Dr. Eugenio Carpizo-Ituarte, el Dr. Ramón Cajal-Medrano y el Dr. Francisco Delgadillo-Hinojosa, por tener siempre críticas constructivas, por todo su apoyo y por enriquecer este trabajo con sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Jose Sandoval-Gil por su apoyo desinteresado, por sus múltiples consejos, por mejorar mis escritos, por todas sus enseñanzas, por sus palabras de aliento, pero principalmente por su grandiosa amistad.

Al Dr. Walter Daesslé y al Dr. José Zertuche por permitirme hacer uso de sus laboratorios para realizar parte esencial de este trabajo.

A todos aquellos que me apoyaron e hicieron muy ameno mi trabajo en el laboratorio y las salidas de campo, su compañía y ayuda es invaluable. Gracias Oscar, Nevía, Alfonso, Jose, Alex, Mary Carmen, Lalo, Mauricio, Edwin, Zarko y personal de Ostrícola Nautilus.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por todas las facilidades para poder realizar este proyecto, al personal administrativo y técnico porque siempre me apoyaron para agilizar cualquier contratiempo. A la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC y al Programa de Doctorado en Oceanografía Costera, por aceptarme en el posgrado y darme las herramientas necesarias para concluirlo.

A mi familia la pequeña, Sofía y Gerardo, no hay palabras con la que pueda agradecer el amor y la ternura que me dieron para poder cumplir esta meta. Por aguantar como los grandes la distancia y las despedidas. Gracias Gerardo por tu apoyo en todos sentidos, no se cuantas veces aguantaste las lágrimas y me hiciste sonreír. Eres un gran compañero de vida. Gracias Sofía por estar aquí y llenar mi mundo de sueños y esperanza. LOS AMO!

A mis padres, por su amor incondicional, porque nunca han dejado de creer en mí, por hacer hasta lo imposible por verme feliz, jamás encontraré la manera de pagar todo lo que me han dado. A mis suegros por todo su cariño y apoyo, soy afortunada de tenerlos en mi vida. A mis hermanos, sobrinos y cuñados, por la complicidad, las risas, los abrazos y la energía que le dan a mi vida.

A todos mis amigos, los que estuvieron hombro a hombro conmigo en este recorrido, a los que pasaron por sólo un instante pero dejaron huella y a los que están lejos pero siempre al pendiente. Fueron fundamentales para sobrevivir al doctorado.

ÍNDICE GENERAL

Introducción general	9
Capítulo I. Patrones isotópicos de carbono y de nitrógeno de <i>Ulva</i> spp. y <i>Zostera marina</i> coexistiendo en una laguna costera: registros de oceanografía regional, fisiología de las plantas y procesos biogeoquímicos	15
Resumen	15
1. Introducción	17
2. Materiales y métodos	23
2.1 Área de estudio	23
2.2 Recolección y análisis de muestras	25
2.3 Análisis de nitrógeno inorgánico disuelto.....	26
2.4 Mediciones de temperatura y del índice de surgencia.....	26
2.5 Análisis del contenido elemental y de los isótopos estables	27
3. Resultados	28
3.1 Condiciones oceanográficas	28
3.2 Composición elemental.....	30
3.3 Composición isotópica	36
4. Discusión	41
4.1 Composición elemental.....	43
4.2 Composición isotópica	47
4.3 Diferencias interespecíficas en la composición isotópica entre macrófitas	60

Capítulo II. Variación espacial de las tasas de fijación de nitrógeno en la rizosfera y en la filósfera de <i>Zostera marina</i> en una laguna costera en el Pacífico NE.....	64
Resumen	64
1. Introducción.....	66
2. Hipótesis	74
3. Objetivos	75
4. Metodología	76
4.1 Área de estudio	76
4.2 Tasas de fijación de nitrógeno	78
4.3 Variables accesorias del sedimento	81
4.4 Análisis de datos	81
5. Resultados	82
5.1 Tasas de fijación de N en sedimentos	83
5.2 Tasas de fijación de N en la filósfera	86
5.3 Variables accesorias	89
6. Discusión	92
6.1 Contribución de los diferentes grupos de diazótrofos	92
6.2 Tasas de fijación de N en los sedimentos	93
6.3 Tasas de fijación de N en la filósfera	96
6.4 Contribución de la fijación de N a la demanda de N de <i>Z. marina</i>	99
6.5 Contribución de la fijación como fuente de N en BSQ	100
Conclusiones generales	104
Referencias	106

Anexo I.....	135
Anexo II.....	148
Anexo III.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Formas químicas y procesos de transformación del N en ecosistemas marinos. Los procesos mostrados en gris ocurren únicamente en ambientes anóxicos. Las formas químicas del nitrógeno están graficadas versus su estado de oxidación (Tomada de Gruber, 2008)..... 10

Figura I.1 Mapa de Bahía San Quintín. Se muestran las nueve estaciones de muestreo (E1-E9). La estrella negra representa el sitio en donde se tomaron las muestras de agua para la determinación de la concentración y la composición isotópica de nitratos. El círculo negro representa el sitio en donde se localizo el termógrafo. 25

Figura I.2 Series de tiempo (A) del índice diario de surgencia costeras (ISC) y de (B) la temperatura superficial del agua cerca de la boca de Bahía San Quintín. Los puntos negros y las líneas punteadas en (A) representan la concentración de nitrato en la boca de la laguna. Las líneas grises verticales indican los días de muestreo cuando se tomaron las muestras de pastos, macroalgas y nutrientes... 29

Figura I.3 Patrones temporales del contenido de carbono (%C) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9). Las líneas punteadas horizontales representan el promedio global del %C para cada macrófita (38.6%, n=207, para *Z. marina* y 31.6%, n=159, para *Ulva* spp.)..... 33

Figura I.4 Patrones temporales del contenido de nitrógeno (%N) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la

boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9). Las líneas punteadas horizontales representan el promedio global del %N para cada macrófita (3.0%, n=207, para *Z. marina* y 2.4%, n=159, para *Ulva* spp.).....35

Figura I.5 Contenido de N (%N) vs. razón atómica C/N. Resultados para *Z. marina* (A) y para *Ulva* spp. (B) de todos los muestreos y todas las estaciones. Las líneas verticales punteadas representan el valor sugerido como limitación de N, 1.8% para *Z. marina* (Duarte, 1990) y 2.2% para *Ulva* spp. (Pedersen and Borum, 1996).36

Figura I.6 Patrones temporales de la composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9). Las líneas punteadas horizontales representan el promedio global del $\delta^{13}\text{C}$ para cada macrófita (-9.7 ‰, n=207, para *Z. marina* y -12.5 ‰, n=159, para *Ulva* spp.)38

Figura I.7 Patrones temporales de la composición isotópica de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9). Las líneas punteadas (punto-guión) horizontales representan el promedio global del $\delta^{15}\text{N}$ para cada macrófita (11.6 ‰, n=207, para *Z. marina* y 13.1 ‰, n=159, para *Ulva* spp.). Las líneas punteadas (guiones) representan el promedio de la composición isotópica de nitrato en el agua ($\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3$) colectada cerca de la boca de BSQ (9.2 ‰ n=5)40

Figura I.8 Patrones espaciales de los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* en BF (A) y en el bSQ (B). Los puntos representan el promedio ($\pm$ ES) de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para todos los muestreos en cada estación. La línea punteada (punto-guión) horizontal representa el promedio global del $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* (11.6 ‰, n=207). La línea punteada (guiones) representa el promedio de la composición isotópica de nitrato en el agua ($\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3$) colectada cerca de la boca de BSQ (9.2 ‰ n=5).....41

Capítulo II

Figura II.1 Mapa de Bahía San Quintín (BSQ). Se muestran las cuatro estaciones de muestreo (OUT, o-BF, i-BF y bSQ).77

Figura II.2 Ejemplo de un cromatograma visualizado con el programa PeakSimple 4.32. En pico dentro del ovalo rojo corresponde al etileno.....81

Figura II.3 Variación espacial de las tasas de fijación de N en la superficie de los sedimentos con (CV) y sin (SV) vegetación. Se muestran los tratamientos con luz y en oscuridad. Los valores representan el promedio $\pm$ 1 error estándar (n=3).....84

Figura II.4 Perfiles de las tasas de fijación de N en los núcleos sin (SV) y con (CV) vegetación. Los valores representan los promedios de las réplicas $\pm$ 1 error estándar (n=3)85

Figura II.5 Variación espacial de las tasas de fijación integrada en sedimentos con (CV) y sin (SV) vegetación. Se muestran los tratamiento con (+Mo) y sin (Total) molibdato de sodio. Los valores representan el promedio de las réplicas $\pm$ 1 error estándar (n=3), excepto para i-BF en donde no se incluyeron los valores extremos (n=2). El valor con asterisco representa el valor extremo de un núcleo en i-BF CV.86

Figura II.6 Variación espacial del las tasas de fijación de N en la filósfera, (a) por centímetro de la planta y (b) por m ² . Se muestran los tratamientos con luz y en oscuridad. Los valores representan el promedio $\pm$ 1 error estándar (n=6). La línea punteada en b representa la densidad de haces de <i>Z. marina</i>	88
Figura II.7 Variación espacial de la suma de las tasas de fijación de nitrógeno en sedimentos y en epífitas de los sitios con vegetación.....	89
Figura II.8 Variación espacial de la composición granulométrica en sedimentos de BSQ considerando los sitios CV y SV indistintamente debido a que no se encontraron diferencias significativas.....	90
Figura II.9 Variación espacial del (a) contenido de carbono orgánico (Corg), (b) el contenido de N, (c) el contenido de limos, (d) el contenido de clorofila-a (Cl-a) en los sedimentos y (e) la composición isotópica de N ($\delta^{15}\text{N}$) en las hojas de <i>Z. marina</i> . Los valores representan el promedio $\pm$ 1 error estándar.	92
Figura II.10 Flujos que aportan o remueven NID de BSQ, los números entre paréntesis corresponden a los valores de los flujo de NID y están dados en $\times 10^3$ mol N d ⁻¹ , para detalles de los valores revisar el texto. Las flechas indican la dirección del flujo entre el océano/atmósfera y BSQ. El los procesos internos en símbolo + representa adición y el – remoción de NID del sistema.	102

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I

Tabla I.1 Resumen de los resultados del análisis de varianza de dos vías por permutaciones. Comparaciones entre meses y entre estaciones y su interacción para <i>Z. marina</i> y <i>Ulva</i> spp. de los valores del %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ como variables dependientes. Se muestra el cálculo de la pseudo-F y de los valores p. Los resultados no significativos ($p>0.05$) se muestran en negritas.	31
Tabla I.2 Composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en <i>Z. marina</i> y en <i>Ulva</i> spp. en diferentes estudios. Los valores con asteriscos indican que el valor representa el promedio $\pm$ ES, mientras que los valores sin asteriscos representan el promedio $\pm$ DS.....	48

Capítulo II

Tabla II.1 Valores de la biomasa, la demanda, la tasas de fijación de N y la contribución de la fijación de N para <i>Z. marina</i>	100
--	-----

Introducción general

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para todos los organismos vivos y en sistemas costeros y en el océano abierto la disponibilidad del N reactivo puede controlar la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas. El N biodisponible en los sistemas acuáticos proviene de la regeneración interna del N preexistente (N regenerado), de la fijación biológica de N_2 atmosférico y de los aportes externos de N (N nuevo) derivados de las descargas fluviales, la depositación atmosférica, el agua subterránea y los procesos de advección y mezcla en la columna de agua (Dugdale and Goering, 1967; Sarmiento and Gruber, 2006; Sigleo et al., 2005). El N fijado que es removido dentro de los sistemas a través de los procesos de desnitrificación, oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX por sus siglas en inglés) y sepultamiento (Brandes et al., 2007) es compensado por el N nuevo. Las actividades antropogénicas han alterado el balance entre los aportes de N nuevo y la pérdida de N en los ecosistemas marinos debido al uso de fertilizantes en la agricultura, la rápida expansión industrial, la urbanización costera y las actividades acuícolas como la ostricultura (Galloway et al., 2004; Songsangjinda et al., 2000). El ciclo del N es quizás el más complejo de todos los ciclos biogeoquímicos en el mar. El N existe en más formas químicas que la mayoría de los otros elementos y presenta diversas transformaciones químicas (Fig. 1), la mayoría de las cuales son llevadas a cabo por organismos marinos como parte de su metabolismo, tanto para sintetizar componentes estructurales como para obtener energía para su crecimiento. El N en el mar se presenta con cinco estados de oxidación relativamente estables, formando así diferentes especies químicas que incluyen el nitrato (NO_3^-), con estado de oxidación de +V, el nitrito (NO_2^-), con estado de

oxidación +III, el óxido nitroso (N_2O), con estado de oxidación +I, el nitrógeno molecular (N_2) con estado de oxidación 0 y el amonio (NH_4^+), con estado de oxidación -III (Gruber, 2008). Como resultado de la alta diversidad de estados de oxidación, el N participa en reacciones de óxido reducción, cuya ocurrencia depende en mayor grado de la disponibilidad de oxígeno como aceptor electrónico y por lo que la disponibilidad de oxígeno controla de manera directa o indirecta casi todas las reacciones del ciclo del N.

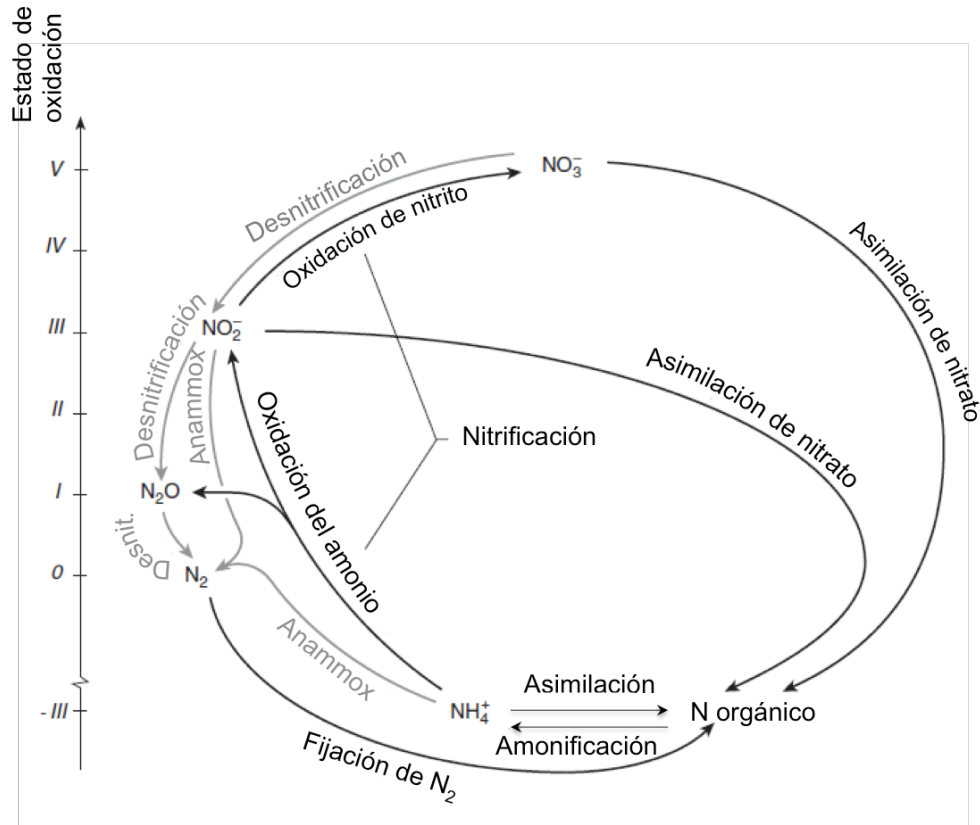


Figura 1. Formas químicas y procesos de transformación del N en ecosistemas marinos. Los procesos mostrados en gris ocurren únicamente en ambientes anóxicos. Las formas químicas del nitrógeno están graficadas versus su estado de oxidación (Tomada de Gruber, 2008).

El amonio, el nitrato, el nitrito y el nitrógeno orgánico son formas de N reactivo y generalmente son agrupadas como N fijado. Aproximadamente el 78% del aire está compuesto por N₂, pero a pesar de su alta disponibilidad, su uso está limitado a algunos procariontes denominados diazótrofos. Los diazótrofos mediante el proceso de fijación de N₂ (Nfix), reacción mediada por la enzima nitrogenasa, transforman el N₂ en N orgánico, en el cual se utiliza una gran cantidad de energía (16 ATP) para romper el triple enlace de la molécula de N₂, dando como resultado la siguiente reacción:



El proceso de Nfix es una fuente importante para el reservorio de N biodisponible y puede controlar la producción primaria en sistemas marinos oligotróficos (Carpenter and Capone, 2008). Aunque por mucho tiempo se consideró que *Trichodesmium* (organismo filamentoso) era el género de cianobacterias con mayor contribución a la Nfix en ambientes pelágicos en el océano, Moisander et al. (2010) reportaron que 2 grupos de cianobacterias unicelulares pueden ser los organismos más dominantes en este proceso. Se estima que globalmente la fijación de N₂ es de ~140 Tg N año⁻¹ (Fowler et al., 2013). Aunque se considera que los sedimentos contribuyen únicamente con ~10% (15 Tg N año) de la fijación marina global (Gruber, 2008), en las zonas costeras este aporte de N puede ser una fuente importante de N reactivo para los productores primarios a nivel local.

Aunque se reconoce que los organismos diazótrofos son predominantes en aguas oligotróficas (aguas pobres en N como giros oceánicos, arrecifes coralinos etc.),

estos organismos también se desarrollan en sitios donde la demanda de N por los productores primarios es muy alta y donde los procesos como la desnitrificación y/o el ANAMMOX causan la pérdida continua del nitrógeno biodisponible (Severin and Stal, 2008). El proceso de fijación en estuarios y lagunas costeras es particularmente intenso en los sedimentos y estos pueden servir como una fuente o un sumidero importante de N en estos sistemas (Fulweiler et al., 2007) y por lo tanto controlar la intensidad de la producción primaria. Los sedimentos presentan una gran diversidad de cianobacterias de dos tipos, cianobacterias fotosintéticas (con y sin heterocistos) y bacterias heterotróficas (Stal et al., 2010) y se ha demostrado que las bacterias heterotróficas como las sulfatoredutoras también realizan fijación de N (Steppe and Paerl, 2002). La presencia de los diversos grupos de cianobacterias en los sedimentos someros permite que la fijación de N ocurra de día y de noche, por lo que las estimaciones de las tasas de N_{fix} suelen realizarse en condiciones de oscuridad e iluminación (Charpy et al., 2007; Severin and Stal, 2008). En praderas de pastos marinos se ha sugerido que la fijación de N llevada a cabo en los sedimentos y en la filósfera puede representar una fuente importante de N nuevo para los pastos marinos (Welsh, 2000), a pesar de que en muchos sistemas costeros la concentración de N en el agua intersticial es alta, debido a la remineralización de la materia orgánica.

Las tasas de fijación de nitrógeno pueden ser medidas con el uso de isótopos estables y de manera indirecta a través del método de reducción de acetileno. Éste último, evalúa la actividad de la nitrogenasa, midiendo directamente la tasa de reducción de acetileno y se calcula la fijación de nitrógeno por medio de la

relación entre ambos procesos (Hardy et al., 1968). Por otra parte, la contribución de la fijación de N_2 para las macrófitas puede calcularse midiendo la abundancia natural de la razón $^{15}N/^{14}N$ de los tejidos. Los valores de $\delta^{15}N$ se han utilizado como un trazador natural de diversos procesos biogeoquímicos en sistemas marinos (Owens, 1988). Dado que el N fijado tiene un valor de $\delta^{15}N$ cercano a 0‰ (Sharp, 2007), se espera que, mientras los valores en los tejidos de las macrófitas sean más cercanos a 0‰ la contribución de la fijación de N sería mayor. Sin embargo, para poder hacer un cálculo es necesario conocer la composición isotópica de las diferentes fuentes externas y reservorios internos de N. Aunque es posible hacer inferencias acerca de los factores que pueden contribuir a la variabilidad la composición isotópica en los tejidos de las macrófitas, si se tiene conocimiento de los procesos que afectan al N biodisponible en un ecosistema específico.

En México el estudio de la fijación de N en sistemas marinos está limitado a sistemas coralinos (Casareto et al., 2008), por lo que se considera importante hacer más investigación en este tópico para los sistemas mexicanos y poder tener un mejor entendimiento del ciclo del N.

Bahía San Quintín (BSQ) es un sistema en dónde se sabe que el océano adyacente es la principal fuente de N nuevo, principalmente proveniente de las surgencias costeras que se intensifican durante primavera y verano (Camacho-Ibar et al., 2003), sin embargo no se sabe cual es la contribución de la fijación de N como fuente de N reactivo. Aunque anteriormente se había considerado que las tasas de fijación en esta laguna son probablemente muy bajas (Camacho-Ibar et al., 2003), información isotópica reciente sugiere que este proceso puede

contribuir con el N suficiente para disminuir los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los tejidos de *Zostera marina* en la zona más interna de la laguna (Carriquiry et al., 2016; Hernández-Sánchez, 2014; Sandoval-Gil et al., 2016, 2015). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la importancia de la fijación de N_2 en BSQ, como fuente de N reactivo en la laguna. Para lo anterior se determinaron las tasas de fijación de N_2 en los sedimentos y en la filósfera de *Z. marina* y se caracterizó la composición isotópica de dos de los principales productores primarios en BSQ, *Z. marina* y *Ulva* spp.

Capítulo I. Patrones isotópicos de carbono y de nitrógeno de *Ulva* spp. y *Zostera marina* coexistiendo en una laguna costera: registros de oceanografía regional, fisiología de las plantas y procesos biogeoquímicos

Trabajo sometido a la revista PLOS ONE: Carbon and nitrogen isotopic patterns in co-existing *Ulva* spp. and *Zostera marina* in a coastal lagoon: records of regional oceanography, plant physiology and local biogeochemical processes

Resumen

El contenido de carbono (C) y de nitrógeno (N) y su composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) fueron estudiados en los tejidos del pasto marino *Zostera marina* y la macroalga oportunista *Ulva* spp. en Bahía San Quintín, una laguna costera dominada por la marea e influenciada por surgencias en el noreste del Océano Pacífico. Las muestras fueron recolectadas bimensualmente durante un año a lo largo de un gradiente espacial con diferente influencia oceánica, incluyendo periodos de surgencia y de no surgencia. La variabilidad de la composición isotópica fue mayor en *Ulva* spp. que en *Z. marina*, probablemente como resultado de un tiempo de recambio del tejido menor en la macroalga. La variabilidad temporal en el C y el N estuvo aparentemente determinada por variaciones en las tasas de crecimiento, aunque el contenido de N también refleja la disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en el agua. Los gradientes espaciales de la razón C/N fueron principalmente determinados por los gradientes de N proveniente del océano. El contenido de N en *Ulva* spp. decreció en las estaciones

más cercanas a la boca, del inicio de verano a febrero de 2014, reflejando la falta de N en el agua oceánica. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en *Z. marina* variaron de -14.0 a -6.4 ‰ (promedio -9.7 ± 0.1 ‰), y de -18.1 a -7.1 ‰ (promedio de -12.4 ± 0.2 ‰) en *Ulva* spp., sugiriendo diferencias interespecíficas en la captación y la asimilación de C. La variabilidad espacial de $\delta^{13}\text{C}$ fue pequeña debido a que la concentración de C inorgánico fue relativamente homogénea, mientras que la variabilidad temporal mostró un decremento asociado con las surgencias. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ variaron de 7.3 a 13.9 ‰ (promedio de 11.3 ± 0.1 ‰) en los pastos y de 9.7 a 18.7 ‰ (promedio de 13.1 ± 0.1 ‰) en las macroalgas, con gran parte de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ mayores a los del nitrato oceánico (9.2 ± 0.3 ‰), lo cual sugiere que el enriquecimiento isotópico dentro de la laguna está asociado a los procesos de nitrificación-desnitrificación acoplados en los sedimentos. Como en otros estuarios, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron consistentemente mayores en *Ulva* spp. que en *Z. marina*, probablemente debido a diferencias interespecíficas durante la asimilación de N.

Palabras clave: *Zostera marina*, *Ulva* spp., contenido elemental, composición isotópica, surgencias

1. Introducción

Las praderas de pastos marinos se encuentran entre los ecosistemas más productivos del mundo, proveen importantes servicios ecológicos incluyendo el almacenamiento de carbono (C), incrementando el sustrato disponible para los organismos bentónicos, funcionando como hábitat de crianza para importantes especies comerciales y para la estabilización de los sedimentos (Fourqurean et al., 2012; Mazarrasa et al., 2015; Orth et al., 2006). Las praderas de pastos marinos también son sitios importantes para el ciclo de los nutrientes y funcionan como biofiltros capturando el exceso del nitrógeno (N) proveniente de la acuicultura y otras actividades antropogénicas (Sandoval-Gil et al., 2016). El área global de los hábitats de pastos marinos ha disminuido en las décadas recientes debido a perturbaciones naturales y antropogénicas (Duarte et al., 2008; Orth et al., 2006; Waycott et al., 2009). En algunas regiones, la reducción de la cobertura del área de las praderas de pastos marinos ha sido asociada con la presencia de macroalgas oportunistas que crecen rápidamente como resultado de la eutrofización ocasionada por el excesivo aporte de N desde el continente (Nelson and Lee, 2001; Valiela et al., 2016). Sin embargo, la relación entre la cobertura de pastos marinos y la biomasa de macroalgas es a menudo difícil de evaluar, ya que la distribución espacial y la dinámica de la biomasa de estas macrófitas depende de diversos factores ambientales y ecológicos (Hessing-Lewis and Hacker, 2013; Holmquist, 1997; Jorgensen et al., 2007).

El contenido elemental del N y del carbono (%C y %N) y la composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) de los tejidos de la macrófitas, han sido utilizados para evaluar las

fuentes, la disponibilidad y el destino de los nutrientes en los sistemas costeros (Cohen and Fong, 2006; Fourqurean et al., 1997; Papadimitriou et al., 2005). La concentración elemental de las macrófitas está determinada por la disponibilidad de nutrientes así como los factores medioambientales que controlan su crecimiento, tales como la disponibilidad de la luz y la temperatura, los cuales varían estacionalmente e interanualmente (Altamirano et al., 2000; Dudley et al., 2010; Grice et al., 1996). Dada la alta disponibilidad de bicarbonato (HCO_3^-) en el medioambiente marino, el balance de nutrientes (i.e. razón molar C/N) en los tejidos vegetativos reflejan la limitación espaciotemporal de N en los ecosistemas costeros (Atkinson and Smith, 1983; Duarte, 1990).

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de la vegetación sumergida están fuertemente determinados por el nivel de la discriminación isotópica en contra del ^{13}C que ocurre durante la fijación de C, así como por la composición isotópica del reservorio de C inorgánico. En el medioambiente marino, las especies de C utilizadas por las macrófitas marinas presentan diferente composición isotópica ($\sim 9\text{‰}$ y 0‰ para el CO_2 y para el HCO_3^- respectivamente, Kroopnick, 1985). Los pastos marinos y las macroalgas, que son plantas tipo C-3, tienen la capacidad de utilizar ambas especies de C, el CO_2 acuoso ($\text{CO}_{2\text{-aq}}$) y el HCO_3^- , como fuentes de C para la fotosíntesis (Beer, 1996; Beer and Koch, 1996; Beer and Rehnberg, 1997). Por lo que resulta difícil determinar la contribución relativa de cada especie de carbono al reservorio de la planta. Debido al incremento de la demanda de C durante el periodo máximo de las tasas de crecimiento, la discriminación en contra del ^{13}C puede reducirse durante la captación y la fotosíntesis ocasionando un enriquecimiento isotópico en los tejidos de las macrófitas (Papadimitriou et al.,

2005; Vizzini and Mazzola, 2003). En sistemas estuarinos con un aporte importante de descargas de los ríos, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en los tejidos de las macrófitas muestran un gradiente espacial muy marcado, ya que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ del carbono inorgánico disuelto (CID) de los ríos está relativamente empobrecido en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C} < -10\text{‰}$) comprado con el CID oceánico ($\sim 2\text{‰}$) debido a la remineralización de la materia orgánica terrestre (Kaldy et al., 2013; Lemons et al., 2011; Papadimitriou et al., 2005; Ruesink et al., 2015; Simenstad and Wissmar, 1985). Contrariamente, se espera un estrecho rango de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en los ecosistemas en regiones áridas en donde hay poco o nulo aporte de agua proveniente de los ríos (Fourqurean et al., 1997; Lemons et al., 2011). Dados los valores relativamente bajos de $\delta^{13}\text{C}$ en las aguas subsuperficiales provenientes de las surgencias en los sistemas costeros (Sheu et al., 1996), los tejidos de las macrófitas en los sistemas estuarinos influenciados por las surgencias pueden exhibir un empobrecimiento del ^{13}C durante la temporada de surgencias relativa a la temporada de no surgencias, particularmente en las áreas con mayor influencia oceánica.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los productores primarios acuáticos dependen fuertemente de la composición isotópica del reservorio de N disuelto (Christiaen et al., 2014). La razón isotópica del reservorio de N inorgánico disuelto (NID), es por una parte afectada por la fuente de agua externa (aguas de surgencia subsuperficiales, aportes de ríos y fuentes de N atropogénico; Fourqurean et al., 2005, 1997; Papadimitriou et al., 2005) así como por los procesos biogeoquímicos, incluyendo la desnitrificación pelágica, la nitrificación-desnitrificación acoplada en los sedimentos y la fijación de N (Alkhatib et al., 2012; Dähnke and Thamdrup, 2013;

Rooze and Meile, 2016). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las macroalgas y en los pastos marinos han sido utilizados como trazadores de descargas de aguas residuales, las cuales están típicamente enriquecidas en ^{15}N (valores de $\delta^{15}\text{N} > 10\text{‰}$) (Cohen and Fong, 2005; Cole et al., 2004; McClelland et al., 1997; Orlandi et al., 2014). Sin embargo, se ha sugerido que el incremento de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de los pastos marinos al interior de la Bahía de Tomales, California, EUA, resulta de la asimilación de N enriquecido en ^{15}N durante la desnitrificación bentónica (Fourqurean et al., 1997). Estimaciones de la nitrificación-desnitrificación acoplada en los sedimentos, resultan en un enriquecimiento isotópico (ϵ_{sed}) del reservorio de N de $\sim 4\text{‰}$ (Alkhatib et al., 2012).

Los valores relativamente altos de $\delta^{15}\text{N}$ en las macrófitas marinas, no necesariamente reflejan los aportes de las descargas antropogénicas o del proceso bentónico de nitrificación-desnitrificación acoplado. En diversos sistemas estuarinos a lo largo del noreste de la costa del Océano Pacífico, en donde las surgencias son una fuente significativa de nutrientes, la línea base de la composición isotópica del N disuelto está altamente influenciada por el nitrato oceánico, el cual presenta valores de $\delta^{15}\text{N}$ relativamente altos ($\sim 9\text{‰}$), debido a la desnitrificación en la zona del mínimo de oxígeno de Pacífico ecuatorial subtropical y del transporte subsuperficial de éstas aguas hacia el norte (Liu and Kaplan, 1989; Sigman et al., 2005). Como resultado, valores relativamente altos de $\delta^{15}\text{N}$ han sido reportados para las macrófitas recolectadas en el área de California y Baja California (Carriquiry et al., 2016; Frankovich and Fourqurean, 1997; Huntington and Boyer, 2008; Lemons et al., 2011). En contraste, el fraccionamiento isotópico durante la fijación es considerado pequeño ($-0.7 \pm 1.6 \text{‰}$

Sharp, 2007), por lo que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ cercanos a 0‰ en los tejidos de las macrófitas han sido asociados a la asimilación de N proveniente de la fijación de N (Anderson and Fourqurean, 2003; Sandoval-Gil et al., 2015; Udy and Dennison, 1997).

Como es el caso para varios estuarios en el noreste del Océano Pacífico y otras regiones en el mundo, la biomasa relativamente alta y la cobertura de *Z. marina* y *Ulva* spp en Bahía San Quintín (BSQ), Baja California (Ward et al., 2004; Zertuche-González et al., 2009), ha sido asociada a la transferencia de carbono autóctono a consumidores y al ciclo de nutrientes dentro de la laguna (Emery et al., 2016; Ibarra-Obando et al., 2004; Sandoval-Gil et al., 2016, 2015; Zertuche-González et al., 2009). BSQ es una laguna costera altamente influenciada por eventos intensos de surgencias que ocurren cerca de la boca. Dada la falta de aportes de agua de ríos, la principal fuente de NID (y CID) a la laguna es el océano, particularmente durante la temporada de surgencias (de abril a Julio; Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2004; Ribas-Ribas et al., 2011). Sin embargo el NID típicamente decrece rápidamente su concentración hacia el interior de la laguna debido al rápido consumo por productores primarios, por lo que pastos y las macroalgas en las zonas más internas de la laguna probablemente dependen de la remineralización y del N fijado (Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2004; Ribas-Ribas et al., 2011; Zertuche-González et al., 2009).

El cultivo de ostiones se ha llevado a cabo en BSQ durante décadas (Aguirre-Muñoz et al., 2001) y las excreciones de los ostiones son una importante fuente de amonio para las macrófitas cercanas (Sandoval-Gil et al., 2016). Se ha sugerido

que la cobertura de *Z. marina* en la laguna ha decrecido (Ward et al., 2003), mientras que la biomasa de *Ulva* spp. y su cobertura han incrementado (Zertuche-González et al., 2009). Sin embargo, relaciones directas entre la dinámica poblacional y la biomasa de estas especies aún no ha sido demostrada (Jorgensen et al., 2009). Un estudio reciente demostró que los efectos negativos de los florecimientos de la macroalgas a los hábitats de pastos marinos en sistemas influenciados por surgencias dependen de muchos factores, concluyendo que es necesarios se estudien los mecanismos que afectan la interacción entre ambas macrófitas, con el fin de determinar las respuestas a nivel ecosistema (Hessing-Lewis and Hacker, 2013).

En el presente estudio, nuestro objetivo fue caracterizar la variabilidad espaciotemporal de las fuentes y la disponibilidad de C y de N en BSQ a partir de mediciones del contenido elemental (%C y %N) y de la composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) de dos de las macrófitas más abundantes (*Z. marina* y *Ulva* spp.) durante un ciclo anual. Las macrófitas fueron muestreadas durante un año en nueve sitios a lo largo de un gradiente espacial entre la boca y la zona más interna de la laguna. En la zona más cercana a la boca se refleja el aporte de nitratos ($\delta^{15}\text{N-NO}_3^- \sim 9\text{‰}$) y del CO_2 empobrecido de ^{13}C , durante la temporada de surgencia. En contraste, en la parte central e interna de la laguna, se reflejan procesos biogeoquímicos internos, específicamente el proceso de nitrificación-desnitrificación acoplado y fijación de N (para $\delta^{15}\text{N}$) y la remineralización de materia orgánica (para $\delta^{13}\text{C}$).

2. Materiales y métodos

2.1 Área de estudio

BSQ (Fig. 1.1) es una laguna costera somera (~2 m de profundidad promedio) e hipersalina, localizada en el noreste de la costa del Océano Pacífico en Baja California, México (30° 30'N, 116° W). La laguna tiene forma de Y y su boca mide de ancho ~1 km, la cual esta abierta hacia el océano. El brazo este es conocido como brazo San Quintín (bSQ) y el brazo oeste como Bahía Falsa (BF). Dado el clima regional tipo Mediterráneo, prevalecen las condiciones áridas. Los aportes de agua terrestres están restringidos al arroyo San Simón durante el invierno cuando la precipitación es mayor a la promedio. Las mareas semidiurnas (amplitud máxima de ~2.5 m durante mareas vivas y ~1 m durante mareas muertas) controlan la dinámica física y la distribución de las propiedades del agua (salinidad, temperatura, nutrientes disueltos, etc.) dentro de la laguna (Melaku Canu et al., 2016). El tiempo de residencia de toda la laguna es de ~8 días, con un tiempo de renovación menor a un día cerca de la boca, ~5 días en BF y más de 15 días en las zonas más internas del bSQ (Camacho-Ibar et al., 2003; Melaku Canu et al., 2016). A pesar de que los vientos del noroeste prevalecen durante todo el año, éstos se intensifican durante la primavera y el verano ocasionando eventos de surgencia más intensos durante éstas temporadas, con implicaciones como el aporte de agua fría y rica en nutrientes del océano adyacente a BSQ. Los eventos de surgencias y la hidrodinámica de la laguna generan un gradiente en las propiedades del agua, con un incremento de temperatura de la boca hacia las zonas más internas de BSQ (rango de temperatura de 11-27 °C; Alvarez-Borrego

and Alvarez-Borrego, 1982). La salinidad incrementa de valores oceánicos (~33.6) en la boca a valores arriba de 39 en la zona más interna del bSQ (Camacho-Ibar et al., 2003). Debido a la falta de aportes terrestres y descargas atropogénicas (Aguirre-Muñoz et al., 2001), la única fuente externa de nutrientes disueltos y fitoplancton a la laguna es el océano adyacente. La concentración de nutrientes en el océano adyacente y en la laguna es muy variable. Durante las surgencias intensas, las mareas pueden aportar agua con concentraciones de NO_3^- arriba de $16 \mu\text{M}$ y concentraciones de CID $>2170 \mu\text{mol kg}^{-1}$ (Ribas-Ribas et al., 2011). La vegetación acuática sumergida está compuesta principalmente por *Z. marina*, que cubre ~46% de la laguna (Ibarra-Obando, 2007; Ward et al., 2004). A pesar de que *Ulva* spp. sólo cubre ~10% de la laguna, durante la primavera y el verano temprano forma parches densos cerca de la boca y en BF y su biomasa puede ser tan alta como la de *Z. marina* (Camacho-Ibar et al., 2003; Zertuche-González et al., 2009). La acuacultura de ostiones (*Cassostera gigas*) es la actividad económica más importante en la laguna y cubre ~33% de la superficie de BF (Ward et al., 2003). Las estructuras de los ostricultivos pueden alterar la circulación del agua en BF, ocasionando la acumulación de materia orgánica en áreas con una alta densidad de racas (Delgado-González et al., 2010). Sin embargo, no se han observado condiciones de eutrofización asociadas al cultivo de ostiones, probablemente debido a la relativa baja intensidad de los acuicultivos, la circulación intensa, los bajos tiempos de residencia y la capacidad de la vegetación sumergida que asimila el NID excretado (Sandoval-Gil et al., 2016).

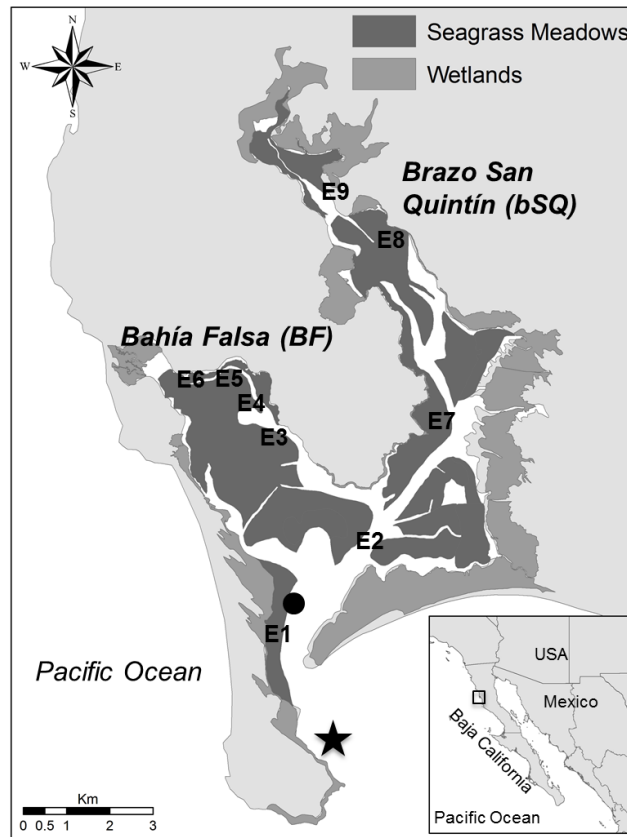


Figura I.1 Mapa de Bahía San Quintín. Se muestran las nueve estaciones de muestreo (E1-E9). La estrella negra representa el sitio en donde se tomaron las muestras de agua para la determinación de la concentración y la composición isotópica de nitratos. El círculo negro representa el sitio en donde se localizó el termógrafo.

2.2 Recolecta y análisis de muestras

Se realizaron ocho muestreos en nueve praderas de pastos marinos distribuidos en BSQ, entre febrero de 2013 y febrero de 2014 (Fig. I.1). En cada estación de muestreo, seis haces de *Z. marina* y seis frondas de *Ulva* spp. fueron recolectados. Después de la recolecta, las muestras se mantuvieron en hielo en dentro de hieleras durante el periodo de muestreo a $\sim 4^{\circ}\text{C}$, por un tiempo que no

fue mayor a 3 horas. En el laboratorio, las frondas de las macroalgas y las hojas de los pastos, fueron seleccionadas evitando los tejidos dañados o con necrosis. Para *Z. marina* se utilizó la tercera hoja más joven, la cual tiene un tiempo aproximado de integración de 30 días, permitiendo el monitoreo temporal mensual. El material de ambas macrófitas fue enjuagado con agua destilada y se limpió suavemente con un bisturí para remover el sedimento y las epífitas, posteriormente fue secado a ~60 °C por 48 h. Cada muestra seca fue pulverizada y homogeneizada por separado utilizando un mortero de ágata con pistilo. Se pesaron 1.5 ± 0.5 mg de muestra que fue colocada en cápsulas de estaño para el análisis de la composición elemental e isotópica.

2.3 Análisis de nitrógeno inorgánico disuelto

Durante cada muestreo se obtuvieron muestras de agua superficiales en una estación cercana a la boca de la laguna (Fig. I.1) para la determinación de la concentración de NO_3^- y su composición isotópica ($\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$). Las muestras de agua fueron filtradas a través de filtros Whatman GF/F previamente a su congelación. La concentración de NID fue determinada utilizando técnicas colorimétricas (Strickland and Parsons, 1972) con un analizador de flujo segmentado (Skalar SanPlus).

2.4 Mediciones de temperatura y del índice de surgencia

La temperatura fue medida utilizando un termógrafo HOBO Pendant Temperature Data Logger VA-001-64, localizado cerca de la boca de la laguna (Fig. I.1) y programado para grabar cada 15 minutos.

Los valores diarios del índice de surgencia costera (ISC) fueron obtenidos del sitio web

<http://www.pfeg.noaa.gov/products/PFEL/modeled/indices/upwelling/upwelling.html>

. Este índice es calculado para la estación 30 °N, 119 °W. Las series de tiempo del ISC fueron filtradas utilizando una media móvil de tres días que mostró la mejor correlación entre el ISC y la temperatura en la boca de la laguna (Delgadillo-Hinojosa et al., 2015).

2.5 Análisis del contenido elemental y de los isótopos estables

Para determinar el %C, el %N, el $\delta^{13}\text{C}$ y el $\delta^{15}\text{N}$ de las macrófitas y el $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$, los tejidos y las muestras de agua fueron enviados al laboratorio Stable Isotope Facility de la Universidad de California, Davis, CA. En el laboratorio se utilizan estándares internos que reportaron una desviación estándar $<0.2\text{‰}$ para el $\delta^{13}\text{C}$ y $<0.3\text{‰}$ para el $\delta^{15}\text{N}$ para las muestras sólidas y de 0.4‰ para el $\delta^{15}\text{N}$ de las muestras de agua. La razón isotópica se expresa en notación delta (δ) y se reporta en partes por mil (‰) relativa a los valores de los estándares internacionales V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite) y aire atmosférico para el C y el N, respectivamente. Las razones isotópicas son calculadas con la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = ((R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1) \times 10^3$$

en donde R_{muestra} y $R_{\text{estándar}}$ son las razones entre el isótopo pesado y el ligero ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de la muestra y del estándar, respectivamente.

2.6 Análisis de datos

Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de Normalidad y de Homocedasticidad, se realizó un análisis de varianza por permutaciones

(Anderson et al., 2008) para evaluar las diferencias entre los meses y las estaciones (factores fijos) en el contenido elemental (C y N) y los valores $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Los análisis para los tejidos de *Z. marina* y de *Ulva* spp. fueron realizados por separado. Matrices de semejanza fueron calculadas de los datos sin transformar utilizando distancias Euclidianas. Todos los análisis fueron calculados con la suma de cuadrados tipo III. Los valores p fueron calculados de 10000 permutaciones de los residuales usando un modelo reducido. Se realizaron pruebas pareadas como pruebas post hoc para determinar las diferencias entre sitios y tiempos de muestreo. El valor p calculado a partir de Monte Carlo fue utilizado en los análisis post hoc cuando no se obtuvo un número razonable de permutaciones. Los resultados de las pruebas post hoc se muestran en el Anexo I y II, para *Z. marina* y para *Ulva* spp., respectivamente. Los análisis fueron realizados con el programa PRIMER v6.1 & PERMANOVA+.

3. Resultados

3.1 Condiciones oceanográficas

Las surgencias costeras durante el periodo de muestreo mostraron la típica estacionalidad de la región, con eventos de surgencia particularmente intensos ($\text{ISC} > 100 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ } 100 \text{ m}^{-1}$ de línea de costa) y frecuentes de abril a julio y surgencias débiles de octubre a enero (Fig. I.2A). La temperatura superficial del agua de mar en la boca de la laguna mostró una variación temporal, con los valores más bajos ($\sim 14\text{-}15^\circ\text{C}$) durante el invierno y el más alto ($\sim 20^\circ\text{C}$) en el verano tardío. Pulsos de agua con temperatura baja ($13\text{-}14^\circ\text{C}$) fueron registrados en marzo y en abril durante eventos intensos de surgencia (Fig. I.2B). Durante

estos eventos de surgencia, en la boca de la bahía se midieron concentraciones de nitrato relativamente altas ($>8 \mu\text{M}$), mientras que las concentraciones fueron menores a $1 \mu\text{M}$ durante los muestreos de octubre de 2013 a febrero de 2014. El valor promedio ($\pm \text{SD}$; $n=5$) del $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ en las muestras de agua recolectadas cerca de la boca de la laguna fue $9.2 \pm 0.3 \text{ ‰}$.

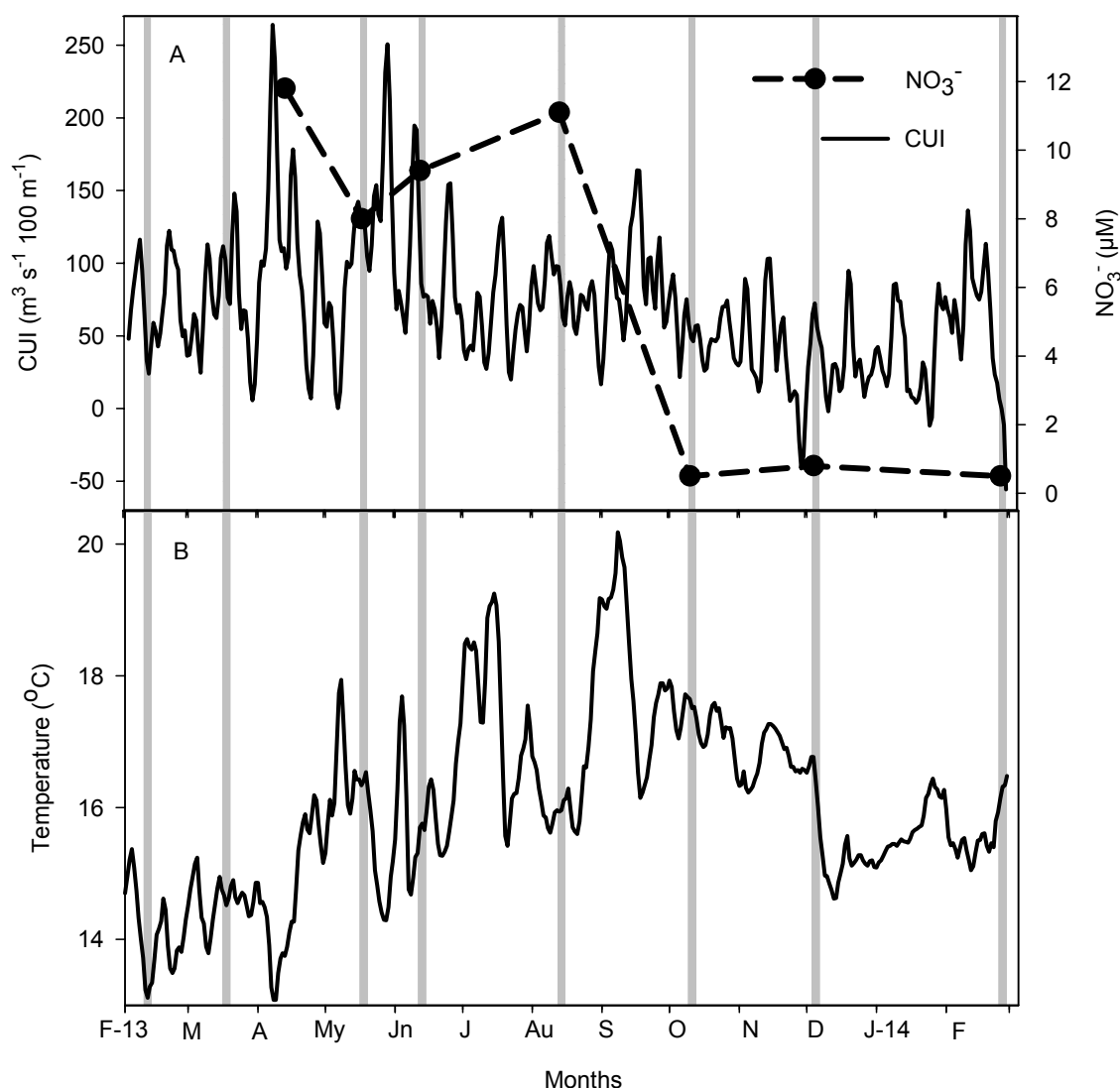


Figura 1.2 Series de tiempo (A) del índice diario de surgencia costeras (ISC) y de (B) la temperatura superficial del agua cerca de la boca de Bahía San Quintín. Los

puntos negros y las líneas punteadas en (A) representan la concentración de nitrato en la boca de la laguna. Las líneas grises verticales indican los días de muestreo cuando se tomaron las muestras de pastos, macroalgas y nutrientes.

3.2 Composición elemental

El análisis permutacional de dos vías para el %C y el %N mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la interacción entre el tiempo y las estaciones para ambas macrófitas (Tabla I.1). El rango de los valores del %C para *Ulva* spp. (16.8 a 42.4 %) fue mayor que para *Z. marina* (33.8 a 42.9 %) y no se observó un patrón espacial claro (Fig. I.3). Los valores del %C de los pastos fueron cercanos al promedio global de 38.6 ± 0.1 % ($\pm$ SE) independientemente de la estación de muestreo (Fig. I.3), sin embargo, los valores decrecieron significativamente de febrero a mayo de 2013 e incrementaron significativamente ($p < 0.05$) de mayo a junio y de diciembre a febrero de 2014 en todos los sitios (Tabla I.1). En *Ulva* spp., la mayor variabilidad del %C fue observada en las estaciones más cercanas a la boca (E1 y E2, Fig. I.1). Las muestras de BF (estaciones E3-E6) y del bSQ (estaciones E7 y E8) mostraron un rango de valores más estrecho (Fig. I.3). Mayor %C fue encontrado en mayo con respecto a marzo en todos los sitios excepto en E1. Después de mayo no se presentaron cambios significativos ($p > 0.05$) en el resto del muestreo, excepto por los valores significativamente ($p < 0.05$) menores medidos en diciembre de 2013 en *Ulva* spp. colectados en las estaciones con mayor influencia oceánica (E1, E2 y E3).

Tabla I.1 Resumen de los resultados del análisis de varianza de dos vías por permutaciones. Comparaciones entre meses y entre estaciones y su interacción para *Z. marina* y *Ulva* spp. de los valores del %C, %N, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ como variables dependientes. Se muestra el cálculo de la pseudo-F y de los valores p. Los resultados no significativos ($p>0.05$) se muestran en negritas.

			BF		bSQ	
	Dependent	Factors	Pseudo-F	p(perm)	Pseudo-F	p(perm)
<i>Z. marina</i>	C content	Time	45.43	0.0001	26.3370	0.0001
		Location	5.43	0.0002	5.4305	0.0008
		T x L	2.02	0.0044	1.7951	0.0278
	N content	Time	37.33	0.0001	23.9820	0.0001
		Location	15.54	0.0001	9.0271	0.0001
		T x L	2.94	0.0001	2.4376	0.0018
	$\delta^{13}\text{C}$	Time	33.73	0.0001	9.4388	0.0001
		Location	15.41	0.0001	8.2363	0.0001
		M x S	5.32	0.0001	4.4390	0.0001
	$\delta^{15}\text{N}$	Time	10.85	0.0001	8.6388	0.0001
		Location	44.63	0.0001	32.6480	0.0001
		T x L	3.32	0.0001	3.5581	0.0001
<i>Ulva</i> spp.	C content	Time	16.28	0.0001	5.8202	0.0002
		Location	2.46	0.0364	2.9354	0.0420
		T x L	1.61	0.0476	3.1303	0.0010

	N content	Time	13.96	0.0001	3.5713	0.0049
		Location	4.11	0.0014	5.1569	0.0045
		T x L	2.89	0.0001	2.1647	0.0229
	$\delta^{13}\text{C}$	Time	3.91	0.0017	3.2250	0.0081
		Location	4.88	0.0007	3.9960	0.0102
		T x L	1.49	0.0806	0.8388	0.6360
	$\delta^{15}\text{N}$	Time	5.94	0.0002	4.7236	0.0010
		Location	1.90	0.1094	2.1474	0.1102
		T x L	2.86	0.0004	2.3372	0.0187

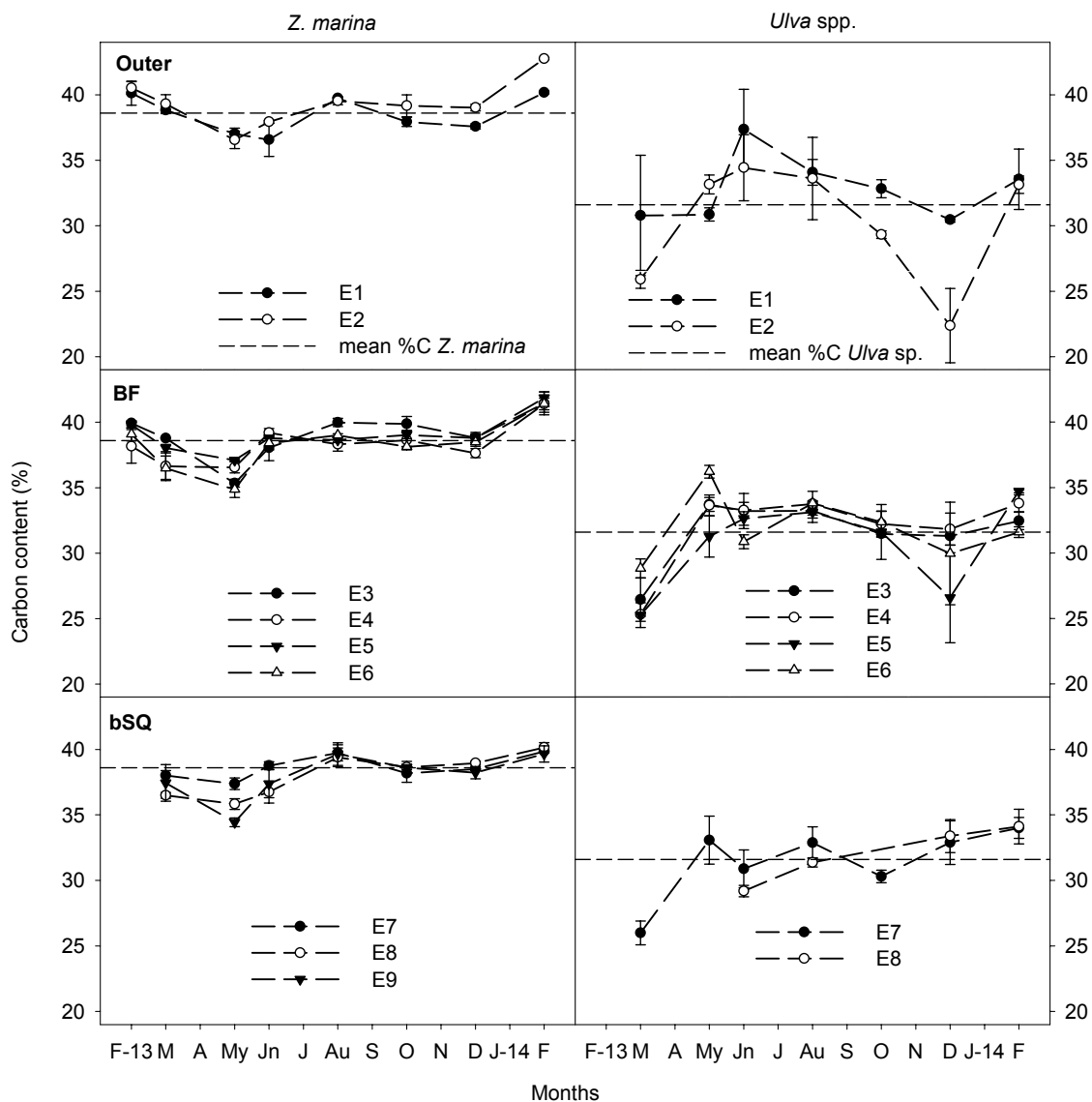


Figura I.3 Patrones temporales del contenido de carbono (%C) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9) (n=3, ± 1 error estándar). Las líneas punteadas horizontales representan el promedio global del %C para cada macrofita (38.6%, n=207, para *Z. marina* y 31.6%, n=159, para *Ulva* spp.)

El rango de los valores del %N de *Ulva* spp. (1.0 a 5.4 %) fue mayor que para *Z. marina* (1.4 a 4.6%), encontrándose variaciones temporales en ambas especies (Fig. I.4). De junio de 2013 al final del periodo de muestreo, los valores del %N de las hojas de los pastos permanecieron cercanos al promedio global (3 ± 0.04 %). El %N en *Z. marina* tendió a decrecer de las estaciones más cercanas a la boca a las más internas de la laguna en ambos brazos. El %N en *Ulva* spp. mostró un incremento del inicio al final del periodo de muestreo, con valores por debajo del promedio global 2.3 ± 0.1 % en marzo de 2013, a valores máximos arriba de 3% en mayo y junio de 2013 en las estaciones mas cercanas a la boca y en BF, decreciendo en los muestreos posteriores (Fig. I.4). En el caso del bSQ el %N fue mayor en agosto y decreció posteriormente. No se presentaron tendencias espaciales consistentes para el %N de *Ulva* spp.

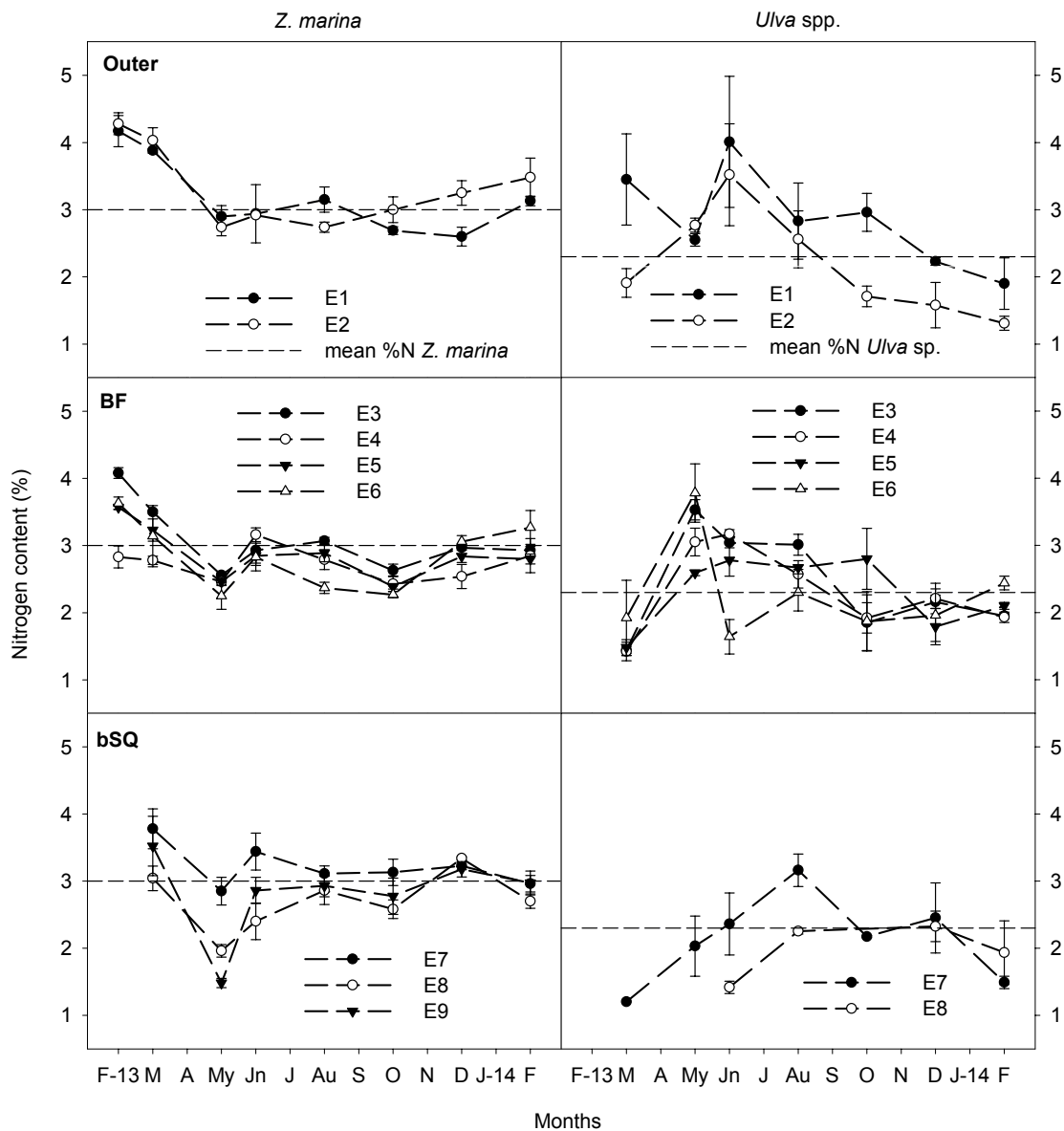


Figura I.4 Patrones temporales del contenido de nitrógeno (%N) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9) (n=3, $\pm$ error estándar). Las líneas punteadas horizontales representan el promedio global del %N para cada macrofita (3.0%, n=207, para *Z. marina* y 2.4%, n=159, para *Ulva* spp.)

Se obtuvo una interacción significativa ($p < 0.05$) de la razón molar C/N para *Z. marina* y *Ulva* spp., entre el tiempo y las estaciones (Tabla I.1). El promedio global fue de 15.7 ± 0.2 (rango de 9.6 a 29.1) para *Z. marina* y de 17.3 ± 0.4 (rango de 8.6 a 35.2) para *Ulva* spp. (Fig. I.5). Los valores más altos de la razón C/N en la hojas de *Z. marina* se encontraron entre mayo y agosto (Fig. I.5), principalmente en las estaciones más internas. La razón molar en *Ulva* spp. mostró los valores más bajos (entre 9 y 15) en marzo, mayo y junio, particularmente en las estaciones más cercanas a la boca.

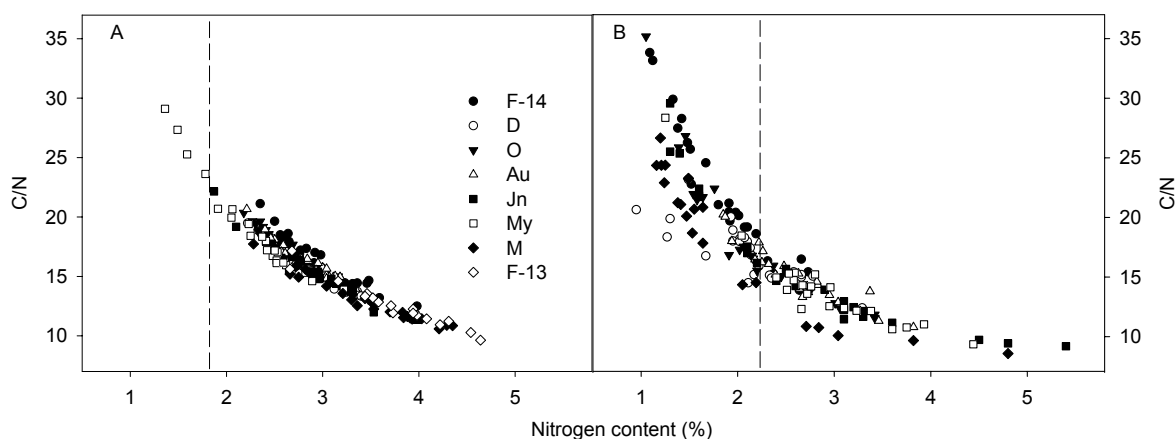


Figura I.5 Contenido de N (%N) vs. razón atómica C/N. Resultados para *Z. marina* (A) y para *Ulva* spp. (B) de todos los muestreos y todas las estaciones. Las líneas verticales punteadas representan el valor sugerido como limitación de N, 1.8% para *Z. marina* (Duarte, 1990) y 2.2% para *Ulva* spp. (Pedersen and Borum, 1996).

3.3 Composición isotópica

El rango de valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *Z. marina* fue de -14.0 a -6.4 ‰, con un promedio de -9.7 ± 0.1 . En el caso de *Ulva* spp., variaron de -18.1 a -7.1 ‰ con un promedio

de $-12.4 \pm 0.2 \text{ ‰}$ (Fig. I.6). El análisis permutacional de varianza para los valores de *Z. marina* mostró una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo y las estaciones (Tabla I.1). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *Z. marina* no mostraron patrones claros en la distribución espacial. En contraste, los valores de *Z. marina* mostraron un claro patrón temporal (excepto en las estaciones más internas E6, E8, y E9), con un decremento significativo ($p < 0.05$) de marzo a junio-agosto, seguido por un incremento hasta el final del periodo de muestreo (Fig. I.6). No se encontró un patrón temporal para los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *Ulva* spp., excepto en las frondas de la estación E1, las cuales mostraron un patrón similar al encontrado en *Z. marina*, con los valores más bajos en junio-agosto. Se presentaron pocas diferencias espaciales, con los valores de la estación E1 significativamente ($p < 0.05$) más bajos que en el resto de las estaciones.

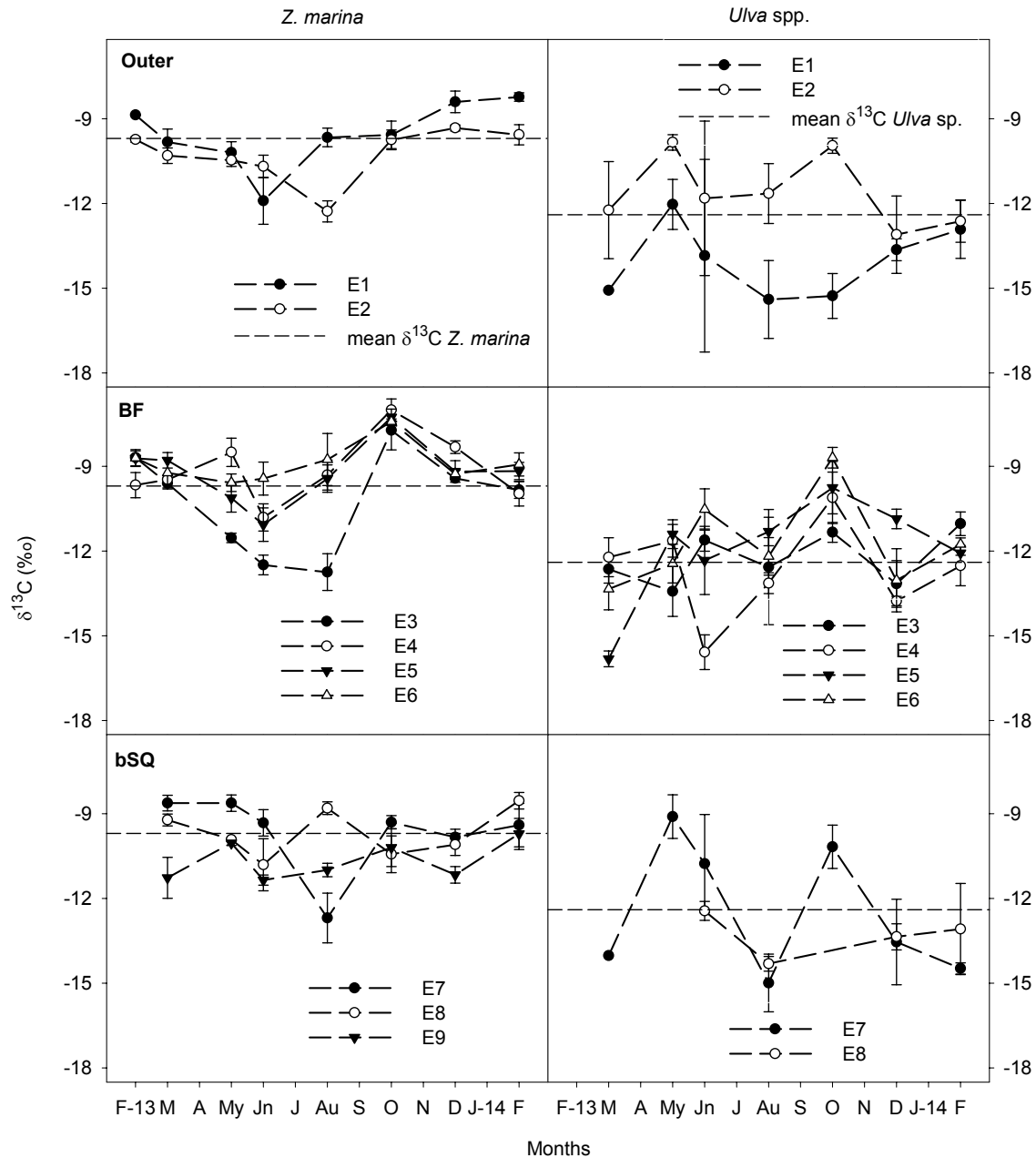


Figura I.6 Patrones temporales de la composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9) ($n=3$, $\pm$ error estándar). Las líneas puenteadas horizontales representan el promedio global del $\delta^{13}\text{C}$ para cada macrofita (-9.7‰ , $n=207$, para *Z. marina* y -12.5‰ , $n=159$, para *Ulva* spp.).

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ variaron de 7.3 a 13.9 ‰ (promedio de 11.3 ± 0.1 ‰) en los pastos marinos, mientras que el rango fue de 9.7 a 18.7 ‰ (promedio de 13.1 ± 0.1 ‰) en *Ulva* spp. Excepto para las estaciones más cercanas a la boca E1 y E2, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los pastos marinos, generalmente incrementaron del inicio del muestreo hacia el final de éste (Fig. I.7). Los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ obtenidos para cada muestreo mostraron una clara tendencia espacial (Fig. I.8), presentando un enriquecimiento del ^{15}N de las estaciones más cercanas a la boca (rango de 9.7 a 11.9 ‰) a la parte central de BF (estaciones E3 y E4; rango de 10.4 a 13.2 ‰) y del bSQ (E7 y E8; rango de 10.4 a 13.3 ‰). Los valores más bajos se encontraron en la parte más interna de ambos brazos (rango de 8.1 a 11.9 ‰ para BF y de 10.4 a 12 ‰ en el bSQ). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para *Ulva* spp. fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre meses y entre la interacción de factores (Tabla I.1), sin mostrar una tendencia espacial o temporal clara y consistente. En las estaciones E2 y E3 se observó una aparente tendencia temporal, con un incremento de los valores después de junio, con valores relativamente altos en febrero de 2014 en varias estaciones (Fig. I.7).

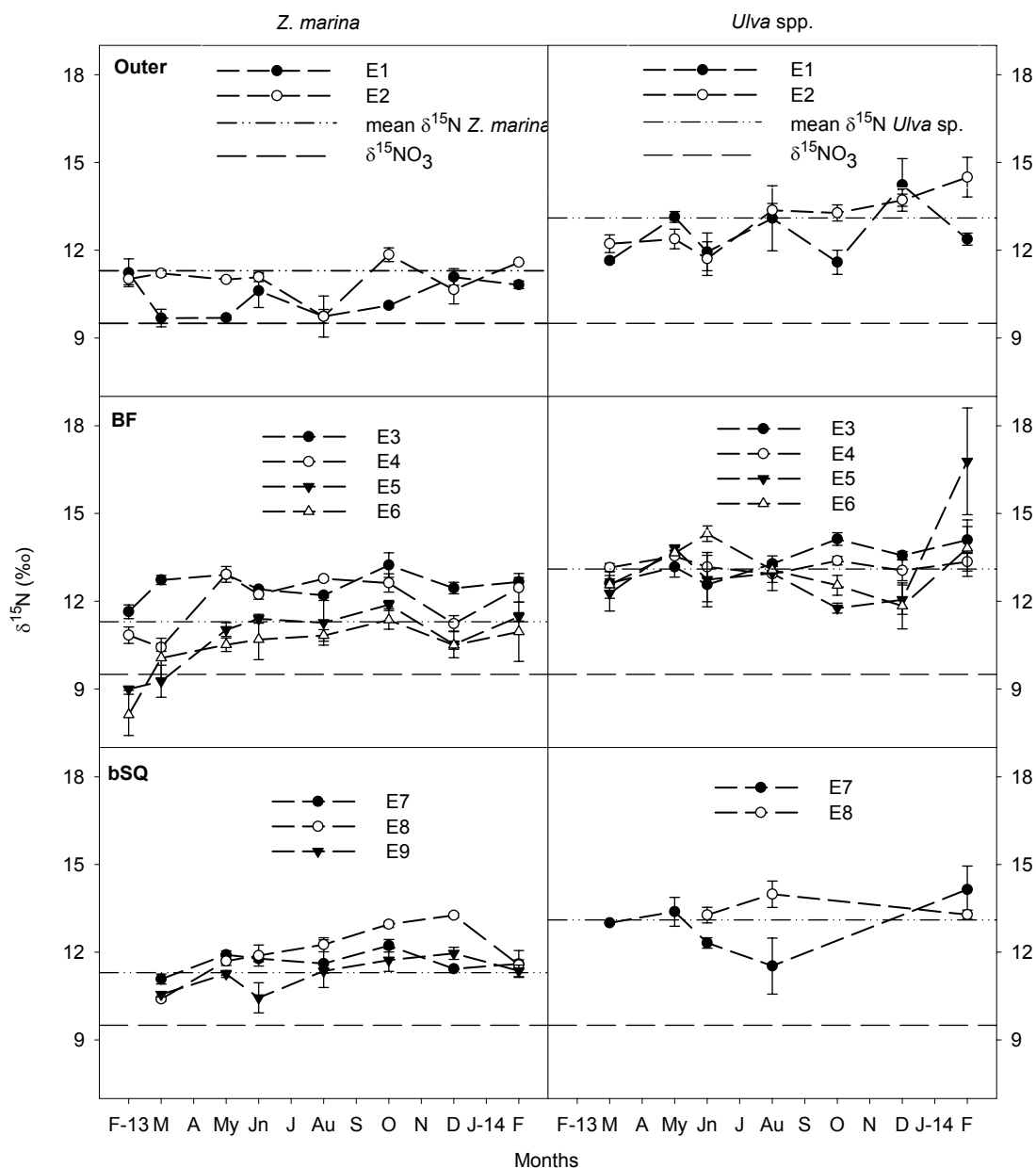


Figura I.7 Patrones temporales de la composición isotópica de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) para *Z. marina* (paneles izquierdos) y para *Ulva* spp. (paneles derechos) en las estaciones de la boca (Outer, E1 y E2), de Bahía Falsa (BF, E3-E6) y del brazo San Quintín (bSQ, E7-E9) ($n=3$, $\pm$ error estándar). Las líneas punteadas (punto-guión) horizontales representan el promedio global del $\delta^{15}\text{N}$ para cada macrófita (11.6 ‰, $n=207$, para *Z. marina* y 13.1 ‰, $n=159$, para *Ulva* spp.). Las líneas

punteadas (guiones) representan el promedio de la composición isotópica de nitrato en el agua ($\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3$) colectada cerca de la boca de BSQ (9.2 ‰ n=5)

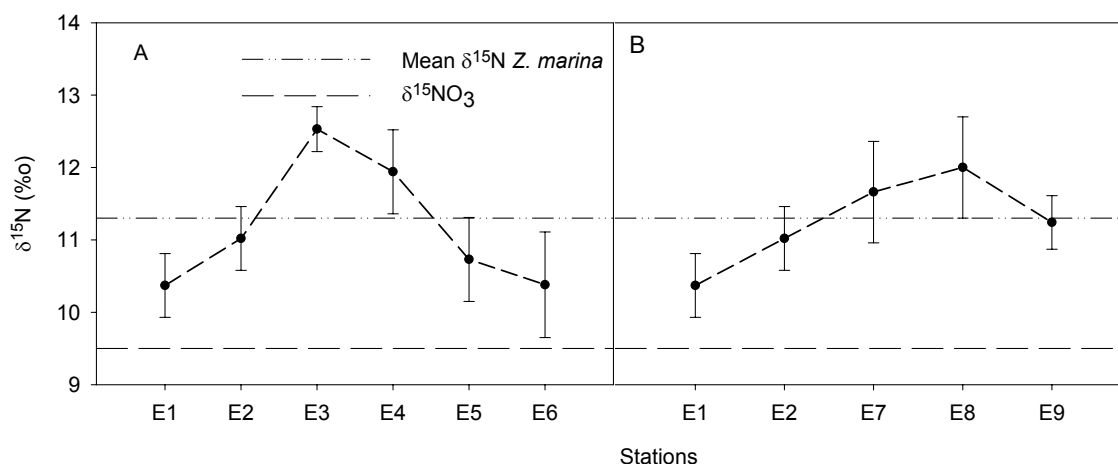


Figura 1.8 Patrones espaciales de los valores promedio de $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* en BF (A) y en el bSQ (B). Los puntos representan el promedio ($\pm$ error estándar) de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para todos los muestreos en cada estación. La línea punteada (punto-guión) horizontal representa el promedio global del $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* (11.6 ‰, n=207). La línea punteada (guiones) representa el promedio de la composición isotópica de nitrato en el agua ($\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3$) colectada cerca de la boca de BSQ (9.2 ‰ n=5)

4. Discusión

Nuestro muestreo anual abarcó un periodo que precede a la temporada de surgencias (de febrero a marzo), un periodo de surgencias intensas (de abril a julio) y un periodo de surgencias débiles (de agosto a febrero de 2014). La concentración de nitrato cerca de la boca fue alta ($>8 \mu\text{M}$) durante el periodo de

intensificación de las surgencias y mucho más baja ($\sim 1 \mu\text{M}$) durante el verano tardío y durante el otoño. Como se ha documentado previamente para BSQ, la concentración de nitrato decrece rápidamente dentro de la laguna, incluso durante eventos de surgencia intensa (Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2004), por lo que nuestros resultados necesitan ser interpretados dentro del contexto de aportes muy bajos de nitrógeno nuevo a las estaciones más internas de ambos brazos durante todo el periodo de muestreo. También, la morfología de la laguna ocasiona que el tiempo de residencia sea mayor en bSQ que en BF (Melaku Canu et al., 2016), resultando en un menor aporte de CID y NID oceánicos. Adicionalmente, la interpretación de nuestros resultados debe considerar los patrones temporales reportados que indican que ambas macrófitas incrementan su tasa de crecimiento en primavera-verano, pero *Ulva* spp. presenta su máxima biomasa dos o tres meses antes que *Z. marina* (Aveytua-Alcázar et al., 2008).

Nuestros resultados indicaron que los valores del %C y del $\delta^{13}\text{C}$ de las dos macrófitas más abundantes (*Z. marina* y *Ulva* spp.) en BSQ, una laguna costera sin aportes de ríos, reflejan fuertemente los procesos fisiológicos. En contraste, la variabilidad espaciotemporal de los valores de %N y de $\delta^{15}\text{N}$ de *Z. marina* y *Ulva* spp. refleja la variabilidad de la composición isotópica del N disponible, como el nitrato proveniente de las surgencias que es transportado hacia dentro de la laguna, así como del reservorio de N de los sedimentos que es afectado por los procesos biogeoquímicos locales (nitrificación-desnitrificación acopladas y la fijación de N). Las diferencias consistentes en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y de $\delta^{15}\text{N}$ entre las macrófitas, con *Z. marina* presentando razones más enriquecidas con ^{13}C y

más empobrecidas en ^{15}N que *Ulva* spp., principalmente reflejan diferencias interespecíficas durante el procesamiento fisiológico de estos elementos (e.g. captación y asimilación).

4.1 Composición elemental

La variabilidad espacial del %C en las hojas de los pastos marinos en BSQ fue limitada y no mostró gradientes espaciales claros. Esto también ha sido reportado en otros sistemas estuarinos (Fourqurean et al., 1997; Kim et al., 2012). El estrecho intervalo del %C en los tejidos de las macrófitas refleja la alta disponibilidad y distribución relativamente homogénea del CID en toda la laguna ($\sim 2100 \mu\text{mol kg}^{-1}$; Ribas-Ribas et al., 2011). Mientras que los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas entre estaciones en el caso de *Z. marina*, no se presentan patrones espaciales claros del %C en *Ulva* spp. La mayor variabilidad del %C en *Ulva* spp. ocurrió cerca de la boca, probablemente reflejando una mayor sensibilidad de estas macrófitas a cambios en la disponibilidad del CID oceánico, principalmente afectada por las surgencias (Ribas-Ribas et al., 2011).

En contraste, hay una variabilidad en el tiempo consistente de los datos del %C para *Z. marina* y *Ulva* spp. (excepto para *Ulva* en bSQ). La variabilidad del %C en ambas macrófitas sugiere que está controlada principalmente por factores ambientales como la irradiancia y la temperatura, como se ha descrito para éstas y otras especies (Alcoverro et al., 2001). El incremento del %C en *Z. marina* durante el verano en todas las estaciones está muy probablemente asociado con la acumulación de las reservas de carbohidratos que ocurre cuando estas plantas

presentan su máxima capacidad fotosintética, tasas de crecimiento y biomasa en respuesta a la alta irradiancia y temperatura, como se ha reportado para las praderas de BSQ y otros sitios (Cabello-Pasini et al., 2004; Touchette and Burkholder, 2002; Vermaat and Verhagen, 1996). Los valores relativamente altos del %C en *Z. marina* observados durante invierno (febrero de 2013 y febrero de 2014) pueden ser por la acumulación de los compuestos de carbono aparte de los azúcares (e.g. pigmentos fotosintéticos) y/o por la movilización de los carbohidratos no estructurales a la hoja provenientes de otras partes de la estructura clonal (e.g. haces vecinos, tejidos de la rizosfera) (Cabello-Pasini et al., 2004; Kraemer and Alberte, 1993; Touchette and Burkholder, 2002). Por otra parte, las frondas de *Ulva* spp. colectadas en las estaciones más cercanas a la boca y en BF mostraron un incremento en el %C de marzo a mayo, probablemente debido al incremento en la concentración de proteínas y carbohidratos comúnmente observados en estas especies durante el periodo de crecimiento (Haroon et al., 2000; Khairy and El-Shafay, 2013; Zertuche-González et al., 2009). El decremento del %C observado después de los meses de verano pudo ser debido al consumo de fuentes internas, debido a la reducción de la fotosíntesis y el crecimiento asociados a la disminución de la luz y la disponibilidad de nutrientes (Altamirano et al., 2000; Aveytua-Alcázar et al., 2008; Villares and Carballeira, 2003). La variabilidad temporal en el %C de *Z. marina* fue menor que la de *Ulva* spp., probablemente reflejando que las hojas de los pastos tienen mayor contenido de C asociado a componentes estructurales (i. e. celulosa, lignina), que no está influenciado por el estado nutricional de la planta (Atkinson and Smith, 1983; Duarte, 1990).

Encontramos que el contenido de N decreció en ambas macrófitas del área cercana a la boca hacia el interior de la laguna. Este patrón está probablemente determinado por el decremento de la concentración de nitrato del océano hacia el interior de la laguna durante la temporada de surgencias, el cual está bien documentado para BSQ (Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2007) y otros estuarios en la región (Brown and Ozretich, 2009). Un patrón similar en el %N en *Ulva* spp. y en *Z. marina* fue reportado para un transecto en BSQ muestreado en abril de 2001 (Carriquiry et al., 2016), y en *Z. marina* para la Bahía de Tomales, un estuario influenciado por surgencias en el norte de California, EUA (Fourqurean et al., 1997). Por lo tanto, este patrón parece ser común en los sistemas estuarinos influenciados por surgencias en el noreste del Océano Pacífico.

El %N para *Z. marina* mostró un considerable decremento (entre 0.3 y 1.5%) de febrero a mayo de 2013, mientras que permaneció menos variable de junio de 2013 a febrero de 2014. Los pastos marinos tienden a almacenar N durante los periodos de bajo crecimiento, el cual es posteriormente consumido durante el inicio del periodo de crecimiento (Kraemer and Mazzella, 1999; Pedersen and Borum, 1993; Pirc and Wollenweber, 1988). Por lo que el alto %N encontrado en los pastos previo al inicio de la temporada de crecimiento en primavera, probablemente reflejó el almacenamiento de N durante el invierno. El %N de *Ulva* spp. en las estaciones más cercanas a la boca y en BF mostró los valores máximos durante el periodo de máximo crecimiento (mayo y junio), probablemente reflejando la acumulación de aminoácidos y proteínas (Haroon et al., 2000; Khairy and El-Shafay, 2013; Rosenberg and Ramus, 1982). Las razones C/N más bajas

(9-15) se midieron en *Ulva* spp. durante el periodo de intensificación de las surgencias en BSQ, cuando se midieron concentraciones de nitrato alrededor de 10 μ M cerca de la boca de la laguna entre abril y agosto.

Después de agosto de 2013, cuando la disponibilidad de nitrato oceánico fue baja debido a la condición de surgencias débiles, el %N en *Ulva* spp. decreció en zonas con menor tiempo de residencia (E1 a E6), mientras que se mantuvo constante en *Z. marina*. Durante los periodos sin surgencias, el %N los pastos marinos a lo largo de la laguna fue mayor a 1.8% (Fig. I.5), valor sugerido como indicativo de limitación de N en pastos marinos (Duarte, 1990). La poca variabilidad y el relativamente alto contenido de N de *Z. marina*, durante el periodo de baja disponibilidad de DIN en la columna de agua, implica que los pastos marinos obtengan el N, demandado por las hojas, de los sedimentos vía captación por las raíces y rizomas. Esta observación concuerda con estudios recientes de la cinética de captación de NID para los pastos en BSQ, en el cual se observó que el NID incorporado por *Z. marina* excede la demanda de la planta para mantener el crecimiento en invierno y a inicios de verano (Sandoval-Gil et al., 2015). En contraste, el %N en *Ulva* spp. de las estaciones más cercanas a la boca y de BF decrece durante el periodo de no surgencias, reflejando su mayor dependencia de las fuentes disponibles en la columna de agua. Durante el periodo de surgencias ~22% de las muestras de *Ulva* spp. colectadas en nuestro estudio presentaron un %N mayor a 2.2, valor sugerido como la concentración necesaria para mantener su máximo crecimiento para *Ulva lactuca* (Pedersen and Borum, 1993), en contraste antes y después de los periodos de surgencia, 71% de las muestras tuvieron un %N menor a 2.2%. Dada la baja concentración de nitrato en la

columna de agua en BSQ, es probable que las macroalgas oportunistas estuvieron limitadas en N desde verano.

4.2 Composición isotópica

Los valores promedio de $\delta^{13}\text{C}$ para *Z. marina* ($-9.7 \pm 1.4 \text{ ‰}$) es este estudio y en otros realizados en BSQ (Emery et al., 2016; Sandoval-Gil et al., 2016) estuvieron dentro del rango reportado en varios sitios costeros alrededor del mundo (Tabla I.2). Sin embargo, la variabilidad espacial y temporal de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los pastos en esta laguna fue relativamente baja (valores entre -13 y -7 ‰) comparados con estuarios en los cuales el aporte de los ríos con CID empobrecido de ^{13}C ocasiona gradientes espaciales de la composición isotópica del reservorio de CID y por lo tanto una mayor variabilidad espacial y temporal (e. g. Kaldy et al., 2013; Lemons et al., 2011; Papadimitriou et al., 2005; Ruesink et al., 2015; Simenstad and Wissmar, 1985). En promedio los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *Ulva* spp. ($-12.4 \pm 2.2 \text{ ‰}$) estuvieron más enriquecidos en ^{13}C que la mayoría de los reportados en la literatura (Tabla I.2). Lo anterior, probablemente refleja su mayor dependencia en el CID de origen marino dentro de BSQ comparado con lagunas y estuarios que están fuertemente influenciadas por descargas de los ríos con CID relativamente más ligero.

Tabla I.2 Composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en *Z. marina* y en *Ulva* spp. en diferentes estudios. Los valores con asteriscos indican que el valor representa el promedio $\pm$ ES, mientras que los valores sin asteriscos representan el promedio $\pm$ DS.

	CITATION	LOCATION	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
<i>Z. marina</i>	Bode et al., 2006	Ría Anes Estuary, Spain	-9.1 $\pm$ 0.1*	5.9 $\pm$ 0.0*
	Boschker et al., 2000	Northwestern Europe	-8.9 $\pm$ 0.3	
	Carriquiry et al., 2015	San Quintín Bay (Bahía Falsa)		9.52 $\pm$ 0.18*
		San Quintín Bay (San Quintin arm)		9.03 $\pm$ 0.24*
	Cole et al., 2004	Lamprey River, New Hampshire, USA		
	Dethier et al., 2013	San Juan Island, Washington, USA	-12.90 to -8.47	3.64 to 6.62
	Emery et al., 2015	San Quintín Bay	-9.35 to -7.65	
	Filgueira and Castro, 2011	Ría de Vigo, Spain	-8.34 $\pm$ 0.69	7.22 $\pm$ 0.61
	Fourqurean et al., 1997	Tomales Bay, California, USA	-9.6 $\pm$ 0.2*	9.7 $\pm$ 0.3*
	Ha et al., 2014	Dongdae Bay, Korea	-9.3 $\pm$ 1	6.3 $\pm$ 0.6
	Hernández-Sánchez, 2015	San Quintín Bay		11.06 $\pm$ 0.08*
	Hondula and Pace, 2014	The Virginia Coast Reserve, USA	-10.07 $\pm$ 0.43	6.55 $\pm$ 0.68

Huntington and Boyer, 2008	Tomales Bay, USA		9.8±0.5*
Jaschinski et al., 2008	Kiel Fjord, Germany	-9.64±0.65	8.04±0.32
Jeong et al., 2012	Gwangyang Bay, Korea	-9.5±0.1	10.5±0.2
Kaldy et al., 2013	Yaquina Bay, Oregon, USA (February)	-11.16±0.38	
	Yaquina Bay, Oregon, USA (July)	-8.54±0.69	
Kennedy et al., 2010	17 locations around the world	-10.9±0.6*	
Kharlamenko et al., 2001	Novgorodskaya Bight, Possyet Bay, Japan	-6.7±0.1	
Kim et al., 2014	West sea of Korea	-11.2 to -7.3	
Lemons et al., 2011	San Diego Bay, EU	-11.1±1.0	10.4±1.1
Mittermayr et al., 2014	Kiel Fjord, Alemania	-13.4±3.3*	7.5±1.2*
Olsen et al., 2011	Waquoit Bay, Massachusetts, USA	-11.2 to -7.7	1.2 to 3.5
Ouisse et al., 2012	English Channel, Francia (February)	-11.2±0.5	4.4±0.3
	English Channel, Francia (August)	-11.0±0.1	5.6±0.3
Papadimitriou et al., 2005	Zealand, Denmark	-22 to -8	7 to 20
	Invergowrie Bay/Monifieth, Barnhill, Scotland,		
Raven et al., 2002	UK	-9.05	
	Brington Beach/South of Dunedin, New	-14.1	

		Zeland		
		Hampton Bay, Long Island, NY, USA	-7.95	
		Tayport, Tentsmuir, Scotland, UK	-12.07±0.37	
		Monifieth, Scotland, UK	-11.46±0.08	
		Cobblers Brook, Newfoundland, Canada	-11.87	
Ruesink et al., 2015		Willapa, Bay, USA	-15 to -11	
Schubert et al., 2013		Heiligenhafen Bay, Germany		-0.54 to 13.49
Simenstad and Wissmar, 1985		Hood Canal, Washington, USA	-12 to -8	
Stephenson et al., 1984		Margaret's Bay, Nova Scotia, Canada	-7.8±0.3	
Tanaka et al., 2008		Akkeshi Bay, Japón	-16.2 to -6.3	
Thayer et al., 1978		Newport River estuary, USA	-10.2±0.75	
Watanabe and Kuwae, 2015		Furen Lagoon, Japan	-14.0 to -9.2	
Este estudio		San Quintín Bay	-9.7±0.1*	11.3±0.1*
<i>Ulva spp.</i>	Baeta et al., 2009	Mondego Bay, Portugal	-11.4±0.3*	12.3±0.9*
	Bode et al., 2006	Ría Anes Estuary, Spain	-15.1±1*	8.3±0.3*
	Carlier et al., 2009	Salses-Leucate lagoon, France	-21.4±0.1	7.4±0.2
	Carriquiry et al., 2015	San Quintín Bay (Bahía Falsa)		10.16±0.15*

	San Quintín Bay (San Quintín arm)		9.62±0.32*
Cohen and Fong, 2005	Southern California estuaries, USA		10.13 to 34.68
Como et al., 2012	Cabras lagoon, Mediterranean Sea		10.4 to 15.6
Cook et al., 2015	Port Phillip Bay, Australia		5.2 to 21.2
Dethier et al., 2013	San Juan Island, Washington, USA	-16.75 to -12.66	6.81 to 6.96
Dudley et al., 2010	Tauranga Harbour, New Zeland	-15.4±0.4*	7.8±0.1*
Emery et al., 2015	San Quintín Bay	-13.86 to -11.68	
Filgueira and Castro, 2011	Ría de Vigo, Spain	-10.46±2.89	8.48±0.66
Hernández-Sánchez, 2015	San Quintín Bay		12.23±0.08*
Hondula and Pace, 2014	The Virginia Coast Reserve, USA	-20.76±2.67	8.71±1.81
Kanaya et al., 2007	Gamo Lagoon, Japan	-13.1±1.9	10.5±1.9
Lefebvre et al., 2009	Normandy, France	-18.75 to -16.9	6.74 to 9.9
Lemons et al., 2011	San Diego Bay, USA	-15.7±2.6	12.5±1.2
Magni et al., 2008	Santa Giusta lagoon, Italy	-18.1±0.2*	10.1±1.3*
Maberly et al., 1992	East Coast of Scotland	-20.3 to -8.86	
Marchais et al., 2013	Bay of Brest, Francia	-17.74±1.60	9.18±1.35
McClelland and Valiela, 1998	Waquoit Bay, Massachusetts, USA		4.9 to 8.4

Olsen et al., 2011	Waquoit Bay, Massachusetts, USA	-14.6 to -12.5	4.3 to 5.7
Orlandi et al., 2014	Mediterranean Sea, Italy	-22.53 to -22.26	5.71 to 5.96
Ouisse et al., 2012	English Channel, Francia (February)	-16.9±0.2	6.6±0.4
	English Channel, Francia (August)	-15.5±0.5	6.6±0.5
Raven et al., 2002	Invergowrie Bay/Monifieth/Barnhill, Scotland, UK	-15.93	
	Eden estuart, Scotland, UK	-11.05; -11.35	
	Brighton Beach/Papatowai, New Zeland	-15.5	
	Gran Canaria	-15.64	
	Hampton Bay, Long Island, NY, USA	-16.79	
	Singapore	-17.72	
	Helmsdale, Scotland, UK	-15.91	
	Brighton Beach/South of Dunedin, New Zeland	-17.65	
	Westerschelde and Oosterschelde estuaries, The Netherlands		7.3±1.3
Riera, 1998	Marennes-Oléron Bay, France		6.3±0.2
Rogers, 2003	Wellington, New Zeland	-26.5±0.1*	2.3±0.3*
Rossi et al., 2013	Mondego Bay, Portugal	-12.6±0.4	10.2±0.2

Simenstad and Wissmar, 1985	Hood Canal, Washington, USA	-16 to -10	
	Mariculture Laboratory's (University of Miami),		
Swart et al., 2014	USA		3.3±0.3
Vizzini and Mazzola, 2008	Fusaro Lagoon, Italy	-18.9 to -11.6	8.5 to 13.7
Yokoyama and Ishihi, 2010	Gokasho Bay, Japan		6 to 10
Este estudio	San Quintín Bay	-12.4±0.2*	13.1±0.1*

La aparente tendencia temporal que mostró un decremento en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en ambas macrófitas durante primavera y verano temprano en sitios más expuestos a la influencia oceánica en BSQ, es opuesta a la reportada en otros estudios en donde un enriquecimiento en ^{13}C durante el periodo de máximo crecimiento de las macrófitas ha sido asociado con la reducción de la discriminación isotópica debido a la mayor demanda de C (Papadimitriou et al., 2005; Vizzini et al., 2003). Sin embargo, ésta estacionalidad no siempre es observada (Dethier et al., 2013; Fourqurean et al., 1997), ya que la composición isotópica de los tejidos también puede ser afectada por factores medioambientales. En nuestro sitio de estudio, el periodo de máximo crecimiento coincide con el pico de la temporada de surgencias, por lo que la composición isotópica de C de las macrófitas colectadas cerca de la boca de la laguna está probablemente influenciada por la señal isotópica del CID de las surgencias durante primavera y verano. Por otro lado, el agua proveniente de las surgencias, está caracterizada con concentraciones relativamente altas de CO_2 y valores bajos de $\delta^{13}\text{C}$ -CID (Sheu et al., 1996). En BSQ se ha reportado que agua con valores tan altos como $2170 \mu\text{mol kg}^{-1}$ y con pCO_2 arriba de $700 \mu\text{atm}$ es introducida a la parte más cercana a la boca y a BF durante los eventos de surgencias (Ribas-Ribas et al., 2011). Sin embargo, es importante mencionar que las variaciones de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ -CID debido a la surgencia probablemente no exceden 1‰ (Santos et al., 2011; Sheu et al., 1996), por lo que las surgencias no podrían explicar el decremento de 2‰ en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras colectadas cerca de la boca de BSQ. Por otro lado, se ha sugerido que la remineralización de materia orgánica nueva puede ocasionar valores bajos en las macrófitas,

particularmente en pastos marinos (Fourqurean et al., 1997). En BSQ, la remineralización en la interfase sedimento-agua de la materia orgánica fitoplanctónica transportada desde el océano adyacente, con una composición isotópica empobrecida de ^{13}C ($\sim\delta^{13}\text{C}$ de -25‰ ; Emery et al., 2016), puede incrementar la disponibilidad de $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ empobrecido de ^{13}C para el consumo de las macrófitas durante la primavera y a inicios de verano. Las tasas de crecimiento en respuesta a una mayor disponibilidad de luz, también pueden contribuir con parte de la variabilidad observada (Cornelisen et al., 2007; Dudley et al., 2010). Debido a que hay pocos estudios que caractericen la composición de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los tejidos de *Ulva* spp. en regiones influenciadas por surgencias en los que los aportes terrestres estén limitados, los procesos que ocasionan variabilidad de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en las macrófitas necesitan más investigación.

El rango y el promedio global de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* ($8.1\text{-}13.3\text{‰}$, $11.3 \pm 0.1\text{‰}$) y para *Ulva* spp. ($11.5\text{-}16.8\text{‰}$, $13.1 \pm 0.1\text{‰}$) en BSQ estuvieron relativamente enriquecidos con ^{15}N comparados con los reportados en la literatura (Tabla I.2). La mayoría ($\sim 87\%$) de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los pastos en nuestro estudio estuvieron por arriba de 10‰ (Fig. I.7), mientras que, valores para *Z. marina* en otros sistemas costeros alrededor del mundo muestran valores más bajos (ver Tabla I.2). En el caso de *Ulva* spp., la mayoría de los valores en este estudio estuvieron por arriba de 12‰ , mientras que en la mayor parte de la literatura se reportan valores por debajo de 10‰ (Tabla I.2). En otros sistemas estuarinos con pocos aportes terrestres a lo largo de la costa noreste del Océano Pacífico, también se han reportado valores de $\delta^{15}\text{N}$ relativamente enriquecidos en estas macrófitas (Fourqurean et al., 1997; Lemons et al., 2011). La alta línea base

de las razones isotópicas de N de las macrófitas dentro de BSQ y de otros sistemas similares está fuertemente determinada por los valores regionales de $\delta^{15}\text{N}$ del nitrato oceánico; estos sistemas estuarinos están fuertemente influenciados por el aporte de nutrientes oceánicos, particularmente durante la temporada de surgencias. Los valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ medidos en nuestro estudio en muestras colectadas en la boca de la laguna ($9.2 \pm 0.3\text{‰}$; $N=5$) son similares a valores de muestras de agua oceánica colectada a 50 m de profundidad cerca de la laguna (Sigman et al., 2005), y también son similares a aquellos reportados en agua subsuperficial de muestras del sur de California ($9.0 \pm 0.7 \text{‰}$) (Liu and Kaplan, 1989). El nitrato en el noreste del Pacífico está enriquecido en ^{15}N comparado con valores de otras regiones oceánicas, incluyendo el Océano Atlántico y el noroeste del Pacífico, debido al intenso fraccionamiento isotópico que ocurre durante la desnitrificación dentro de la extensa zona de mínimo de oxígeno que se encuentra al este del Pacífico tropical (Liu and Kaplan, 1989; Sigman et al., 2005). Aunque se han reportado en otras regiones valores altos de $\delta^{15}\text{N}$ en macrófitas en zonas influenciadas por descargas residuales enriquecidas con ^{15}N (Papadimitriou et al., 2005; Schubert et al., 2013), los pastos marinos y *Ulva* spp. en BSQ no están afectados por aportes residuales. Esta laguna no recibe descargas terrestres que puedan aportar nutrientes debido a que la aridez de la región ocasiona que los aportes de ríos sean prácticamente nulos. Además, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las macrófitas a lo largo de toda la laguna fueron más altos que los valores de $\delta^{15}\text{N-NO}_3$ (Fig. I.7), indicando un enriquecimiento isotópico por arriba de la línea base de los nitratos regionales. Los tejidos de *Z. marina* y de *Ulva* spp. pueden estar enriquecidos en ^{15}N en comparación con el nitrato

oceánico debido a los procesos biogeoquímicos locales como la desnitrificación sedimentaria o por procesos fisiológicos como el fraccionamiento durante la asimilación (Fourqurean et al., 1997; Papadimitriou et al., 2005; Swart et al., 2014). También es importante mencionar que las surgencia durante primavera de 2013 fueron relativamente débiles, como se observó en las anomalías del índice de surgencia reportado en el periodo de abril a julio de 2013 (<http://www.pfeg.noaa.gov/products/PFELData/upwell/monthly/upanoms.mon>). Las anomalías negativas indican que la intensidad de las surgencias durante 2013 fueron más bajas que el promedio climatológico, ocasionando una mayor dependencia de las macrófitas de BSQ en el NID reciclado durante nuestro estudio.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de *Z. marina* y del *Ulva* spp. en BSQ no mostraron un patrón temporal claro, como se ha observado en otros sistemas (Fourqurean et al., 2007, 1997; Vizzini and Mazzola, 2003). Un estudio en Rosklide Fjord (Dinamarca) reportó que la falta de estacionalidad de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de hojas jóvenes de *Z. marina* (Papadimitriou et al., 2005), probablemente esté relacionada con la dependencia de los pastos al NID de la columna de agua y del agua intersticial. Adicionalmente el reciclamiento interno y la reabsorción de los compuestos de N provenientes de plantas más viejas, permite la integración de razones isotópicas recientes y de algún tiempo atrás, suavizando cualquier señal temporal que pueda esperarse asociada a la estacionalidad del NID disponible y su composición isotópica (Papadimitriou et al., 2005). Sandoval-Gil et al., 2015, basados en experimentos de cinética de captación de N con *Z. marina* en BSQ, reportaron que la captación de amonio a través de las raíces es mayor que la de nitrato a través

de las hojas. También se ha observado la traslocación de N desde las raíces hacia las hojas (Sandoval-Gil et al., 2015), la cual puede ocasionar la poca variación de la composición isotópica, como se ha sugerido previamente (Papadimitriou et al., 2005).

Se encontró un patrón espacial consistente de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ para *Z. marina* hacia el interior de ambos brazos; se presentó un enriquecimiento de ^{15}N de la boca ($<11\text{‰}$), a la parte central ($\sim 12\text{‰}$) y se presentaron los valores más bajos en las partes más internas ($<11.2\text{‰}$; Fig. 1.8). Este patrón ha sido observado para las hojas de *Z. marina* en estudios recientes (Carriquiry et al., 2016; Hernández-Sánchez, 2014; Sandoval-Gil et al., 2015). Los valores más bajos de los pastos cerca de la entrada a la laguna es probable que se deban a la alta y recurrente disponibilidad de nitrato proveniente desde el océano (Camacho-Ibar et al., 2003) que es rápidamente asimilado a través de las hojas (Sandoval-Gil et al., 2015). El enriquecimiento de ^{15}N observado en las estaciones E3, E4, E7 y E8 (localizadas a $\sim 6\text{-}10\text{ km}$ de la boca de la laguna) es similar al observado en la Bahía de Tomales, en donde esta tendencia fue explicada por el enriquecimiento con ^{15}N del NID resultado de la desnitrificación bentónica (Fourqurean et al., 1997). Esta explicación probablemente aplica a nuestros resultados, ya los procesos acoplados de remineralización-nitrificación-desnitrificación bentónicos resultan en un enriquecimiento isotópico neto ($\epsilon = 3\text{-}4\text{‰}$ en St. Lawrence Estuary) del reservorio de N reducido (amonio + N orgánico disuelto) presente en los sedimentos (Alkhatib et al., 2012) y la desnitrificación parece ser relativamente intensa dentro de BSQ como se ha inferido a partir de balances de N (Camacho-Ibar et al., 2003).

En contraste, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los pastos marinos en las zonas más internas de BF y de bSQ (E5, E6 y E9) estuvieron relativamente empobrecidos de ^{15}N . En un estudio limitado a un solo muestreo a lo largo de la laguna recientemente reportado, se observó un patrón similar pero sólo para bSQ (Carriquiry et al., 2016). El decremento de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ hacia las partes más internas después del incremento de la zona intermedia puede ser únicamente explicado por la adición de N empobrecido en ^{15}N . El aporte terrestre de N con valores bajos de $\delta^{15}\text{N}$ (e.g. de fuentes agrícolas, Bedard-Haughn et al., 2003) puede ser descartado para BSQ, debido a la falta de aportes de agua desde el continente (Aguirre-Muñoz et al., 2001). Sin embargo, la fijación de N en las praderas de pastos marinos es una fuente potencial de N empobrecido de ^{15}N (valores de $\delta^{15}\text{N}$ del N fijado de $\sim 0.7\text{‰}$, Sharp, 2007). La fijación de N puede ocurrir en la hojas, por parte de las bacterias epífitas, y las tasas de fijación de heterótrofos sedimentarios anaerobios pueden incrementarse por los exudados de los pastos en la rizosfera (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998; Welsh, 2000). Cuando la fijación de N es la fuente dominante de N dentro del sistema, las hojas de *Zostera* pueden mostrar valores de $\delta^{15}\text{N}$ tan bajos como 2.4‰ (Udy and Dennison, 1997). Sin embargo los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en hojas de *Z. marina* colectados en la zona más interna de BF fueron solamente $\sim 2\text{--}3\text{‰}$ más bajos que en las estaciones centrales de BF, indicando que la fijación de N probablemente no es la fuente que más contribuye con N a los tejidos de *Z. marina*, como se ha reportado para ésta especie en otros ecosistemas templados (Cook et al., 2015; Risgaard-Petersen et al., 1998; Welsh, 2000). Fuentes alternativas de N ligero pueden provenir de la fijación de N en las zonas de marismas en donde este proceso tiende a ser

intenso (Jones, 1974). Evaluar la fuente de N proveniente de la fijación de N en la zona más interna de la laguna requiere una caracterización de los gradientes espaciales de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las macrófitas sumergidas, así como de las plantas de marismas, haciendo mediciones in situ de la fijación de N.

A diferencia de las hojas de *Z. marina*, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de *Ulva* spp. no mostraron un patrón espacial consistente (Fig. 1.7); esto ya ha sido observado previamente en BSQ (Hernández-Sánchez, 2014). *Ulva* spp. depende únicamente del N disuelto en la columna de agua, cuya concentración puede ser bastante variable en periodos de tiempo cortos en BF, asociada al ciclo de mareas (Hernández-Ayón et al., 2004). En contraste, *Z. marina* puede obtener N también del agua intersticial. Las diferencias en los patrones espaciales de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre ambas macrófitas pueden estar relacionadas también a las tasas de recambio, lo cual determina el tiempo de integración de la composición isotópica. Mientras que *Z. marina* integra una señal en el orden de algunos días (~60 días, Risgaard-Petersen et al., 1998), *Ulva* spp. tiene un tiempo de recambio menor (<2 días; Teichberg et al., 2007) y puede reflejar rápidamente cambios en la composición isotópica del reservorio de NID que puede enmascarar la amplia escala temporal o los gradientes espaciales como se observó para los pastos marinos.

4.3 Diferencias interespecíficas en la composición isotópica entre macrófitas

La composición isotópica de C para las hojas de *Z. marina* fue en promedio 2.7 ‰ más pesada que las de las frondas de *Ulva* spp.; similar al enriquecimiento que se ha reportado en otros estudios en donde estas especies han sido colectadas

simultáneamente (Tabla I.2). Diferencias en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los tejidos de las macrofitas marinas creciendo en el mismo sitio (i.e. bajo las mismas condiciones ambientales), reflejan mecanismos diferentes de fijación y asimilación de CO_2 para la fotosíntesis (Beer and Koch, 1996; Raven et al., 2002). El sistema lacunal en los pastos marinos restringe el flujo de salida del CO_2 respirado y permite la acumulación de CO_2 isotópicamente pesado dentro de los espacios lacunales, el cual puede ser re-fijado durante la fotosíntesis (Beer et al., 1980). Lo cual permite que los pastos marinos que están más enriquecidos en ^{13}C con respecto a las macroalgas coexistentes. La mayor variabilidad espacial y temporal de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los tejidos de *Ulva* spp. (rango de -18 a -7.1 ‰) comparada con la de *Z. marina* (rango de -14 a -6.4 ‰, en donde ~87% de los datos presentaron valores entre -12 y -8 ‰), puede estar relacionada a varios factores incluyendo: la mayor variabilidad de la biomasa ocasionando mayor variabilidad en la demanda de C, mayores tasas de recambio resultando en un tiempo de integración menor de las señales isotópicas, la mayor capacidad de utilizar $\text{CO}_{2(\text{ac})}$ cuando está disponible, o a las interacciones más complejas entre la luz y la disponibilidad de nutrientes que pueden influenciar en la discriminación isotópica (Dudley et al., 2010).

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron consistentemente más altos en *Ulva* spp. con respecto a los de las hojas de *Z. marina* en nuestro estudio (~2 ‰ en promedio) y en otros estudios en BSQ (Carriquiry et al., 2016; Hernández-Sánchez, 2014); este es un patrón recurrentemente observado en varios sistemas costeros alrededor del mundo (Tabla I.1). Recientemente Cook et al. (2015) reportaron una diferencia de 2.4 ± 1.5 ‰ entre *Ulva* spp. y *Z. marina* en Port Phillip Bay, Australia. Estos

autores sugirieron que el reservorio de amonio en el sedimento está probablemente empobrecido en ^{15}N como resultado del fraccionamiento que ocurre durante la amonificación de la materia orgánica (Möbius, 2013), y por lo tanto la captación de amonio empobrecido en ^{15}N causa que los valores de *Z. marina* sean bajos. Esta explicación no aplica para nuestro sitio de estudio, ya que el reservorio de N (nitrato, amonio y N orgánico disuelto) en los sedimentos con aparentemente altas tasas de desnitrificación están isotópicamente enriquecidos, más que empobrecidos, como se ha reportado recientemente en otros estudios (Alkhatib et al., 2012; Dähnke and Thamdrup, 2013). Ambas macrófitas en nuestro estudio están expuestas a los nitratos provenientes del océano así como al NOD y el amonio proveniente de los sedimentos, y aún así *Ulva* spp. está más enriquecida en ^{15}N (como en otros sitios costeros), sugiriendo que el enriquecimiento relativo puede ser debido a diferencias fisiológicas/vegetativas entre especies más que a diferencias isotópicas de las fuentes. En el caso de *Z. marina*, una posible explicación es que la discriminación en contra del ^{15}N que ocurre durante la captación/asimilación de amonio (y NOD, Alexandre et al., 2015) a través de las raíces, ya que la concentración en el agua intersticial de los sedimentos en las praderas de BSQ es mayor a los valores de saturación de captación (Sandoval-Gil et al., 2015). Como resultado una fracción del N “ligero” asimilado puede ser traslocado de las raíces y rizomas a las hojas. Por otro lado, como el NID en la columna de agua en la mayoría de los ecosistemas costeros está por debajo de la concentración de saturación para la captación de *Ulva* spp. y las tasas de recambio isotópico del contenido de N es muy corto, se ha supuesto que el fraccionamiento isotópico en *Ulva* spp. puede ser mínimo (Teichberg et al.,

2007). Pocos estudios han evaluado experimentalmente el fraccionamiento isotópico durante la asimilación, pero en algunos se ha indicado una discriminación isotópica positiva del ^{15}N , ocasionando que un enriquecimiento de $\sim 2\text{‰}$ pueda ocurrir en los tejidos de *Ulva* spp. durante la asimilación de amonio (Cohen and Fong, 2005; Dudley et al., 2010) y de nitrato (Swart et al., 2014). Además, el enriquecimiento debido a la exudación de compuestos de N tiene que ser considerado (Evans, 2001). En un estudio reciente se reportó que la magnitud de la discriminación isotópica durante la asimilación de nitrato por *Ulva* spp. está determinada por la concentración del sustrato en el ambiente (Swart et al., 2014), y la discriminación positiva solo ocurre con bajas concentraciones ($<14\text{ }\mu\text{M}$), que están en el rango de las concentraciones de nitrato en BSQ. Claramente, se requieren estudios experimentales para determinar el papel de la discriminación de los isótopos de N durante la asimilación por macrófitas marinas, incluyendo los tejidos de las raíces y rizomas y de las hojas en el caso de los pastos e incluir no sólo el NID, sino también los sustratos de NOD.

Capítulo II. Variación espacial de las tasas de fijación de nitrógeno en la rizosfera y en la filósfera de *Zostera marina* en una laguna costera en el Pacífico NE.

Resumen

Se determinaron las tasas de fijación de nitrógeno en la filósfera y en sedimentos con presencia y ausencia de *Zostera marina* durante el invierno de 2015 en Bahía San Quintín, una laguna costera dominada por la marea e influenciada por surgencias en el Pacífico NE. Las muestras se recolectaron en cuatro sitios con diferente influencia oceánica, tiempo de residencia e impacto ostrícola y las tasas de fijación se determinaron con el método de reducción de acetileno. Las tasas con tratamientos con luz y en oscuridad fueron similares, sugiriendo que las bacterias heterótrofas fueron el grupo con mayor contribución a la fijación. La contribución de las bacterias sulfatoreductoras fue baja en la mayoría de las estaciones aportando entre el 0 y el 15 % de la fijación, únicamente en una estación contribuyeron con ~40 %. El rango de las tasas de fijación en sedimentos fue de 7 a 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$, similar a lo reportado en otros sistemas inclusive durante periodos de primavera y verano. Probablemente la condición invernal ocasionó que se presentaran pocas diferencias espaciales en las tasas de fijación de N_2 , inclusive entre los sitios con y sin vegetación y entre las diferentes profundidades de los sedimentos, debido a que durante invierno las tasas de crecimiento y la biomasa de *Z. marina* son mínimas, ocasionando que el aporte de carbono lábil, que sirve como sustrato para los diazótrofos, sea menor y menos variable. Las tasas de fijación más bajas se presentaron en un sitio en donde la

actividad ostrícola es intensa y en donde la desnitrificación es alta, por lo que probablemente los diazotrofos estén compitiendo con otros heterótrofos que no fijan N_2 . Las tasas de fijación más altas, se presentaron en la estación más interna, en donde el nitrato oceánico es escaso. El 7% de la fijación fue atribuida a las bacterias epífitas, con tasas menores a $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Potencialmente la fijación aportó entre el 5 y el 10% del N requerido por *Z. marina* y podría aportar ~30% del nitrógeno que se pierde vía desnitrificación durante el invierno.

Palabras claves: Fijación de nitrógeno, *Zostera marina*, sedimentos, filósfera, diazotrofos

1. Introducción

El nitrógeno (N) es uno de los principales factores que limitan la producción primaria en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Elser et al., 2007). En sistemas marinos el N fijado es removido por los procesos de desnitrificación, oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX, por sus siglas en inglés) y por sepultamiento (Brandes et al., 2007). La pérdida de N es compensada por los procesos de fijación de N_2 , amonificación y por aportes externos provenientes de las descargas fluviales, la depositación atmosférica, los aportes de agua subterránea y los procesos de advección y mezcla en la columna de agua (Dugdale and Goering, 1967; Sarmiento and Gruber, 2006; Sigleo et al., 2005). La fijación biológica de N_2 es una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa en la cual el N_2 es convertido en amoníaco (NH_3).

A pesar de que el 78% del aire en la atmósfera está compuesto por N_2 , la fijación de N_2 únicamente puede ser llevada a cabo por algunos grupos de bacterias y arqueas denominados diazótrofos. En los sistemas marinos es posible encontrar fijadores de N_2 que son organismos fotolitotróficos, como las cianobacterias, las cuales pueden ser filamentosas con heterocistos, filamentosas sin heterocistos y unicelulares (Zehr and Paerl, 2008); así como organismos heterótrofos que pueden ser bacterias aerobias, microaerofílicas, facultativas y anaerobias estrictas, incluyendo sulfatoreductoras que suelen ser abundantes en tapetes microbianos de sistemas estuarinos (Fulweiler et al., 2013; Steppe and Paerl, 2002). Debido a que el oxígeno inhibe irreversiblemente la actividad de la nitrogenasa, las cianobacterias han desarrollado estrategias para evadirlo (Berman-Frank et al., 2007). Los heterocistos son células especializadas que

están presentes en los filamentos, las cuales brindan condiciones anaerobias y por lo tanto es en donde se realiza el proceso de fijación de N_2 (Adams and Duggan, 1999). Algunas cianobacterias sin heterocistos, tienen la capacidad de separar temporalmente la fotosíntesis de la fijación de N (Bergman et al., 1997), mientras que algunas otras también pueden separar morfológicamente ambos procesos (Foster et al., 2011).

Hace algunas décadas, se consideraba que la cianobacteria *Trichodesmium* era el género con mayor contribución a la fijación de N y se calculó que la fijación aportaba ~5 Tg N año (Capone and Carpenter, 1982). A partir del uso de técnicas moleculares, específicamente de la secuencia el gen *nifH* presente en la nitrogenasa, se descubrió que existían una gran cantidad de procariontes capaces también de fijar N_2 (Zehr et al., 1998), incluidas cianobacterias unicelulares (Moisander et al., 2010) y bacterias heterótrofas (Bombar et al., 2016), éstas últimas consideradas actualmente con mayor dominancia que otros grupos en aguas marinas superficiales (Farnelid et al., 2011). Actualmente se estima que la fijación pelágica de N es de ~140 Tg N año⁻¹ (Fowler et al., 2013). Para los sistemas bentónicos, Capone y Carpenter (1982) calcularon que la fijación de N era de 15 Tg N año⁻¹, a diferencia de la fijación pelágica en el océano abierto, el calculo de la tasa global bentónica no sido reevaluado (Gruber, 2008). Sin embargo, la evidencia molecular sugiere que la fijación de N_2 bentónica podría ser mucho mayor de lo que se ha sugerido (Bauer et al., 2008; Newell et al., 2016). Por otra parte, también se creía que la presencia de N inorgánico inhibía la actividad de la nitrogenasa (Capone, 1988), actualmente se sabe que los

diazótrofos mantienen altas tasas de fijación de N_2 inclusive en sistemas bentónicos con elevadas concentraciones de amonio (Andersson et al., 2014; Knapp, 2012). Otro aspecto que no fue considerado en el cálculo obtenido en los años 80's, es que la fijación de N_2 en algunos sistemas como en la rizosfera de las praderas de pastos marinos puede ser inclusive mayor en sedimentos subsuperficiales que en sedimentos superficiales (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998), por lo que el cálculo de la fijación puede estar subestimado al no considerar la fijación en sedimentos subsuperficiales. En sistemas estuarinos por décadas se ha considerado que la fijación pelágica está limitada debido a que salinidades >10-15 causan que los diazótrofos crezcan lentamente y los filamentos sean más cortos, por lo que se vuelven más vulnerables al pastoreo lo que impide su óptimo desarrollo (Howarth and Marino, 2006; Marino et al., 2002). Sin embargo, Bentzon-Tilia et al. (2015) evidenciaron la presencia de diazótrofos pelágicos en dos estuarios mediante la presencia del gen *nifH* y la medición de tasas de fijación pelágicas.

En la última década, también se ha roto el paradigma en el que se sugería que los sistemas estuarinos funcionaban como un sumidero de N debido a que la desnitrificación tradicionalmente se creía era mayor que la fijación de N, en algunos estudios se ha encontrado que los sistemas estuarinos pueden funcionar como una fuente de N ya que la fijación de N_2 puede ser mayor que la desnitrificación (Fulweiler et al., 2013; Russell et al., 2016). Sin embargo, es importante considerar que existen diversos factores que pueden determinar cual de éstos dos procesos es más intenso. Fulweiler et al. (2013) encontraron que la

cantidad y la calidad de la materia orgánica (MO) es un factor muy importante que inclusive puede desacoplar en tiempo estos dos procesos, mientras que los aportes nuevos de MO promueven la desnitrificación, posteriormente, cuando la MO es más refractaria la fijación de N_2 se intensifica principalmente por la contribución de las bacterias sulfatoredutoras, las cuales son más flexibles en cuanto a la calidad de la MO que es utilizada. Al igual que el N proveniente de los aportes terrestres, en diversos estudios se ha demostrado que la desnitrificación es un proceso que mitiga el aporte excesivo de N a los sedimentos en sitios con presencia de ostricultivos (Humphries et al., 2016; Kellogg et al., 2014; Smyth et al., 2015), sin embargo también son sitios en los que se ha demostrado que la fijación de N_2 puede verse favorecida por la presencia de C lábil (Newell et al., 2002). Es necesario hacer más investigación que lleve al entendimiento de la co-ocurrencia de estos dos procesos, ya que es necesario entender como funcionan estos dos procesos debido al actual incremento de las descargas antropogénicas en zonas costeras y del uso de ecosistemas estuarinos para la acuicultura.

En cuanto a zonas con pastos marinos, Russell et al. (2016) reportaron que en praderas de *Zostera muelleri*, la fijación de N_2 es más intensa que la desnitrificación, sin embargo también se ha demostrado que la desnitrificación puede ser favorecida por la presencia de oxígeno proveniente de la fotosíntesis de las plantas (Risgaard-Petersen et al., 1994). Pero sin duda la fijación de N_2 es un proceso importante como fuente de N nuevo para los pastos marinos. Se ha reportado que la fijación de N_2 en praderas de pastos marinos puede aportar más del 50% del N requerido por éstas macrófitas para su crecimiento en zonas

tropicales (Capone, 1988; Capone et al., 1979; O'Donohue et al., 1991; Patriquin and Knowles, 1972), mientras que en zonas templadas se ha reportado que en algunos sitios entre el 5 y el 30% del N es aportado por éste proceso (Capone, 1982; Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998; Welsh et al., 1996a, 1996b). En las praderas de pastos marinos los organismos diazótrofos pueden encontrarse en la filósfera (i.e. como epífitas), en la superficie de los sedimentos y en los sedimentos más profundos asociados a las raíces y rizomas (McGlathery, 2008). En algunos sitios se ha encontrado que las bacterias heterótrofas son el grupo funcional dominante en los sedimentos y en la filósfera (Cole and McGlathery, 2012; Howarth et al., 1988), por tal motivo las tasas de fijación suelen estar acopladas a la actividad fotosintética de la planta (Capone and Taylor, 1977; Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998; O'Donohue et al., 1991). El C lábil que es exudado a través de las hojas y de las raíces y rizomas, incrementa a mayores tasas fotosintéticas y sirve como sustrato para las bacterias heterótrofas (McRoy et al., 1973; Moriarty et al., 1986; Penhale and Jr, 1977). Inclusive en algunos sitios en donde se han realizado perfiles de tasas de fijación de N₂ en la rizósfera, se han encontrado las máximas tasas asociadas a la profundidad a la cual se encuentra la mayor biomasa de raíces y rizomas (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998; Welsh et al., 1996b). La presencia de los pastos marinos también beneficia el crecimiento de los diazótrofos por la acumulación de materia orgánica (MOP) en los sedimentos, la cual no únicamente proviene del decaimiento de las hojas y de las raíces y rizomas; las praderas de pastos marinos también funcionan como trampas de MO particulada, la cual es depositada en los sedimentos (Kennedy et al., 2010).

En algunos estudios realizados en praderas de pastos marinos se ha determinado que las bacterias sulfatoreductoras pueden contribuir con más del 80% de la fijación de N_2 realizada por heterótrofos (Capone and Carpenter, 1982; Welsh et al., 1996b), aunque en algunos sitios con praderas de *Z. marina* la contribución de las sulfatoreductoras únicamente fue entre el 12 y el 25% del total de la fijación de N (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998). Las diferencias en la actividad de las sulfatoreductoras se ha asociado a la concentración de materia orgánica en la rizosfera (Cole and McGlathery, 2012; Welsh et al., 1996b).

La fijación de N en la filósfera, realizada por bacterias epífitas, ha sido escasamente estudiada y pocos estudios se han realizado en praderas de pastos marinos ubicadas en zonas templadas (Cole and McGlathery, 2012; Reynolds et al., 2015). Las tasas de fijación en la filósfera suelen ser muy variables inclusive dentro de una misma pradera. Los factores principales que contribuyen a esta variación son la cantidad de epífitas en la hoja (Agawin et al., 2016; Cole and McGlathery, 2012; Goering and Parker, 1972; Hamisi et al., 2009; Reynolds et al., 2015); la actividad metabólica de la planta, asociada a las tasas de productividad (Capone et al., 1979); la temporada del año, en general es mayor en primavera/verano que en invierno (Capone and Taylor, 1977; Hamisi et al., 2009) y la disponibilidad de luz (Agawin et al., 2016; Goering and Parker, 1972). La contribución de la fijación de N_2 por epífitas a la demanda de N de los pastos marinos puede ser importante, por ejemplo, en praderas de *Zostera marina* en las costas de Virginia, EUA, la fijación de N_2 en la filósfera contribuyó con ~90% de la fijación total de las praderas debido a la baja disponibilidad de N en la columna de

agua (Cole and McGlathery, 2012); mientras que en praderas de *Posidonia oceanica* en el Mar Mediterráneo las epífitas pueden aportar todo el N requerido por esta especie en algunas temporadas (Agawin et al., 2016).

Aplicando el modelo de LOICZ (Land Ocean Interaction in the Coastal Zone), un modelo de balance de masas para calcular los flujos no conservativos de N y de P y el balance entre la fijación de N_2 y la desnitrificación mediante relaciones estequiométricas, Camacho-Ibar et al. (2003) reportaron que en Bahía San Quintín (BSQ) las pérdidas de N reactivo por desnitrificación son mayores que las estradas por fijación de N_2 , sugiriendo inclusive que la fijación de N_2 podía ser despreciable. Sin embargo dichos autores también reportaron que en las secciones más internas de la laguna la desnitrificación y la fijación de N estuvieron más cercanas al balance, lo que sugiere que, o las tasas de desnitrificación disminuyen hacia el interior o que la fijación de N_2 se intensifica. Hasta la fecha no se han realizado mediciones directas de ninguno de los dos procesos en esta laguna costera, sin embargo, datos isotópicos en macrófitas de la laguna, también sugieren que la fijación de N_2 es más intensa en hacia los extremos internos del sistema. Por un lado, los datos de $\delta^{15}N$ en *Z. marina* en el presente estudio (Capítulo I) muestran una disminución en las estaciones más internas de ambos brazos (ver Fig. I.8), en tanto que Carriquiry et al. (2015) observaron una disminución similar aunque únicamente para el brazo San Quintín. En ambos estudios se concluye que la fijación de N_2 es la causa más probable de dicha disminución, sin embargo, lo que no es claro es si la fijación de N_2 se intensifica en los sitios de muestreo o si las plantas están registrando la señal de la fijación de N_2 que ocurre en las zonas más internas, particularmente en las zonas de

marismas. Datos isotópicos no publicados (Herzka, com. pers.) de *Z. marina*, recolectadas al borde de las marismas mostraron valores tan bajos como 3 ‰, sugiriendo que el N₂ fijado puede provenir de las marismas. Por otra parte, está bien documentado que en BSQ el N nuevo proveniente del océano adyacente se limita a las zonas más cercanas a la boca (Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2004) y los aportes continentales son considerados nulos (Aguirre-Muñoz et al., 2001), por lo que las macrófitas de las zonas más internas dependen del N proveniente de los procesos internos tales como la amonificación y la fijación de N₂. En este trabajo se midieron las tasas de fijación de N₂ en sedimentos y en la filósfera de *Z. marina* en BSQ, en sitios con diferente influencia oceánica y actividad ostrícola. En los sedimentos se midieron tasas de fijación dentro y fuera de las praderas de *Z. marina*. También se estimó la posible contribución de la fijación a la demanda de N de *Z. marina*, y se estimó la contribución de este proceso al balance de N en el sistema.

2. Hipótesis

- Las tasas de fijación de nitrógeno son mayores en las zonas con presencia de *Z. marina* que en las zonas sin vegetación.
- Los valores máximos de las tasas de fijación de N en las zonas con vegetación serán en los sedimentos subsuperficiales en donde la biomasa de raíces es mayor.
- Los picos máximos de las tasas de fijación de N en las zonas sin vegetación serán en la superficie de los sedimentos.
- Especialmente las tasas máximas de fijación de N se presentaran en las zonas con presencia de ostricultivos y en zonas con mayor tiempo de residencia del agua debido a la acumulación de materia orgánica.

3. Objetivos

- Evaluar las tasas de fijación de N en sedimentos y en la filósfera de *Z. marina* en Bahía San Quintín e inferir cuales son los procesos que controlan su variabilidad espacial.
- Inferir la contribución de las bacterias autótrofas, heterótrofas y sulfatoreductoras a las tasas de fijación de N total.
- Determinar si la presencia de las praderas de *Z. marina* estimula la actividad de los diazótrofos en los sedimentos, comparando tasas de fijación fuera y dentro de las praderas.
- Estimar la posible contribución de la fijación de N a los requerimientos de *Z. marina* en BSQ.
- Comparar la intensidad de las tasa de fijación de N con respecto a la tasa de desnitrificación y al flujo de N asociado a los procesos de advección y mezcla en BSQ.

4. Metodología

4.1 Área de estudio

Bahía San Quintín (Fig. II.1) es una laguna costera hipersalina, con ~2 m de profundidad promedio, localizada en la península de Baja California, México (30°27'N, 116°00'W). Los aportes de agua terrestre son considerados nulos y se restringen al arroyo San Simón que únicamente aporta agua durante inviernos con precipitación por arriba del promedio (Aguirre-Muñoz et al., 2001). La dinámica del sistema y la distribución de las propiedades del agua (salinidad, temperatura, nutrientes disueltos etc.) están controladas por las mareas semidiurnas (amplitud máxima de ~2.5 m y mínima de ~1 m). La laguna tiene dos brazos, el brazo este conocido como brazo San Quintín (bSQ) y el brazo oeste como Bahía Falsa (BF), los cuales tienen un tiempo de residencia de aproximadamente 15 y 5 días, respectivamente (Camacho-Ibar et al., 2003; Melaku Canu et al., 2016). Las surgencias costeras se intensifican en primavera y verano aportándose una mayor cantidad de nutrientes a BSQ desde el océano durante esta temporada. La concentración de nitrato, que supera los 10 μM durante eventos de surgencias, disminuye de la boca hacia las regiones más internas de la laguna, donde las concentraciones suelen ser menores que 1 μM (Camacho-Ibar et al., 2003; Hernández-Ayón et al., 2004), lo cual potencialmente causa limitación de N para los productores primarios en las zonas más internas. La salinidad y la temperatura incrementan de la boca al interior de BSQ, con rangos de ~33.6 a 39 y de 11 a 27 °C, respectivamente (Alvarez-Borrego and Alvarez-Borrego, 1982; Camacho-Ibar et al., 2003). Praderas densas de *Z. marina* cubren ~46 % de la superficie de la

laguna (Ibarra-Obando, 2007; Ward et al., 2004). De acuerdo con un estudio realizado entre octubre de 2013 y enero de 2014 la densidad de *Z. marina* varía entre 116 y 671 haces por m^{-2} en las praderas muestreadas en este estudio, presentando en diciembre valores entre 116 y 364 haces por m^{-2} (Sandoval-Gil, datos no publicados). La actividad ostrícola de BSQ se concentra en el brazo de BF, donde aproximadamente el 30 % del área superficial está concesionada para esta actividad (Aguirre-Muñoz et al., 2001). Delgado-González et al. (2010), encontraron que la ostricultura afecta la circulación del agua, sugiriendo que hay una mayor acumulación de MO bajo las racas.

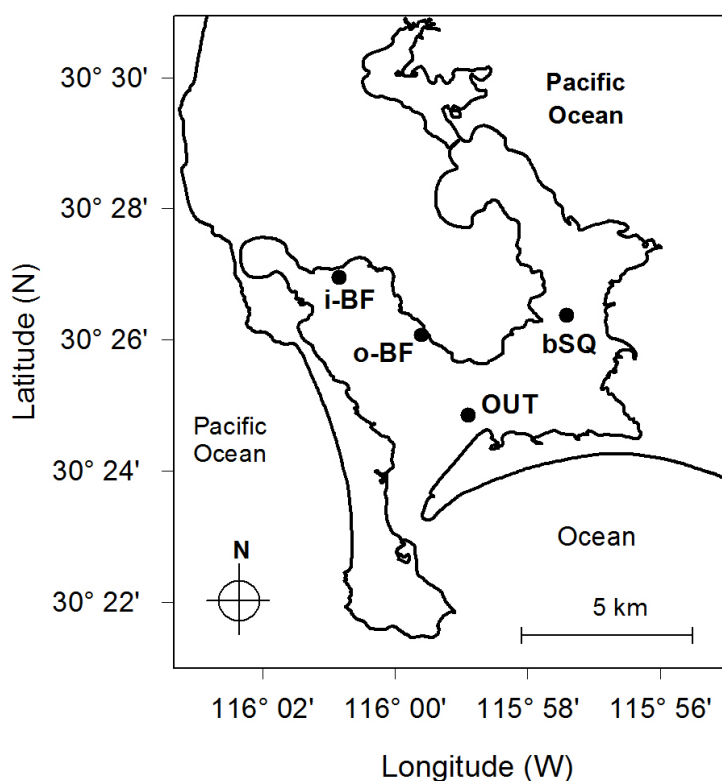


Figura II.1 Mapa de Bahía San Quintín (BSQ). Se muestran las cuatro estaciones de muestreo (OUT, o-BF, i-BF y bSQ).

4.2 Medición de tasas de fijación de nitrógeno

En diciembre de 2015 se recolectaron núcleos de sedimento y haces de *Z. marina* para medir tasas de fijación de N_2 en sedimentos y epífitas utilizando el método de reducción de acetileno (método modificado de Capone y Taylor 1977, Capone 1982; ver Cole y McGlathery 2012). Se seleccionaron las praderas de *Z. marina* a lo largo de un gradiente de influencia oceánica y en zonas con diferente grado de actividad ostrícola. La estación con mayor influencia oceánica, OUT, fue la más cercana a la boca de la laguna (~4 km); dos estaciones, o-BF e i-BF, se ubicaron en Bahía Falsa, ambas con presencia de ostricultivos pero o-BF con mayor influencia oceánica que i-BF; una cuarta estación, bSQ, se ubicó en el brazo San Quintín a una distancia de la boca similar a la de la estación o-BF, pero sin presencia de ostricultivos (Fig. II.1). Los núcleos se recolectaron buceando utilizando tubos de acrílico de ~40 cm de largo y 10 cm de diámetro. En cada estación se recolectaron tres núcleos dentro de la pradera (denominados con vegetación, CV) y tres núcleos en la zona sin vegetación adyacente a la pradera (SV). Los núcleos en los sitios con vegetación se recolectaron evitando la inclusión de vegetación sobre el sedimento, únicamente se recolectó sedimento y el agua sobreyacente. El mismo día de muestreo, los núcleos fueron transportados dentro de hieleras al laboratorio y se dejaron reposar por ~12 h; posteriormente se obtuvo un subnúcleo utilizando una jeringa de 10 ml, del cual se obtuvieron secciones de 1 cm, de los primeros 5 cm. Cada sección se partió a la mitad y se adicionó 0.7 ml de agua destilada y a una de las partes se le adicionó molibdato de sodio (+Mo) para determinar las tasas de fijación por bacterias sulfatoreductoras, las muestras

sin molibdato de sodio fueron consideradas como tasas de fijación total. Las incubaciones fueron realizadas en viales de vidrio de 40 ml a los que se le añadió el sedimento y posteriormente fueron cerrados con tapas con septum. Los viales fueron purgados con argón por ~2 min y posteriormente se les inyectaron 10 ml de acetileno para iniciar la incubación. Los viales fueron agitados durante 10 segundos y se despresurizaron para mantener la presión atmosférica al interior del vial. La incubación se realizó en oscuridad y a temperatura constante durante 7 h. También se realizaron incubaciones con luz de los sedimentos del primer centímetro, para los cuales se siguió el mismo procedimiento pero la incubación se realizó con una irradiancia de $350 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, correspondiente a la máxima irradiancia del sitio en invierno (Sandoval-Gil et al., 2015). La incubación se terminó transfiriendo el gas a viales Vacutainer® que previamente fueron purgados con argón. Para cada núcleo se realizaron dos blancos, siguiendo el mismo procedimiento pero sin adición de sedimento y uno de éstos sin adición de acetileno, a ninguno se les adicionó molibdato de sodio y las incubaciones se realizaron en oscuridad.

Los haces de *Z. marina* para la determinación de fijación en la filósfera se recolectaron manualmente y se mantuvieron en hieleras con agua del sitio hasta su tratamiento, aproximadamente 6 horas después de la recolecta. Para las incubaciones se seleccionaron 6 haces de cada sitio, tres fueron utilizados para tratamientos con luz y tres para tratamientos en oscuridad. De cada haz se obtuvieron los primeros 15 centímetros (del ápice hacia el meristemo) de las hojas 2 y 4. La selección de las hojas se realizó con las plantas sumergidas en agua del sitio. Cada hoja fue colocada en un frasco de borosilicato de 140 ml y se le

adicionaron 90 ml de agua del sitio filtrada. Para iniciar la incubación se adicionaron 10 ml de agua saturada con acetileno e inmediatamente se sellaron con un septum y un sello de aluminio. Los frascos se agitaron por 30 segundos y se mantuvieron por 5 horas a temperatura del sitio y las incubaciones con luz se hicieron con una irradiancia de $\sim 350 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para finalizar la incubación las muestras se sumergieron en hielo y se mantuvieron así, por no más de 24 h, hasta su análisis en el cromatógrafo. Las muestras de gas se obtuvieron de la parte del frasco libre de agua utilizando jeringas y fueron inyectadas directamente en el cromatógrafo.

Para las mediciones de la concentración de etileno se utilizó un cromatógrafo de gases SRI-8610C equipado con un inyector en la columna seguido de una trampa para la concentración de etileno empacada con silica gel, una columna empacada Porapak N y un detector de ionización de flama. Se utilizó N_2 como gas acarreador. El cromatógrafo se calibró con una curva de calibración de cinco subestándares (4, 5, 7, 8 y 10 ppm) obtenidos de un estándar de 100 ppm (Scotty II C2-C6 Olefines). La rampa de temperatura fue de 50 °C a 170 °C con un incremento de 40 °C por minuto, manteniendo la temperatura a 170 °C por 10 minutos. Los resultados se visualizaron con el programa PeakSimple 4.32, el tiempo de retención del etileno fue de ~ 9.25 min (Fig. II.2). Las tasas de reducción de acetileno fueron convertidas a tasas de fijación de N_2 utilizando la razón 3:1 (McGlathery et al., 1998; Welsh, 2000).

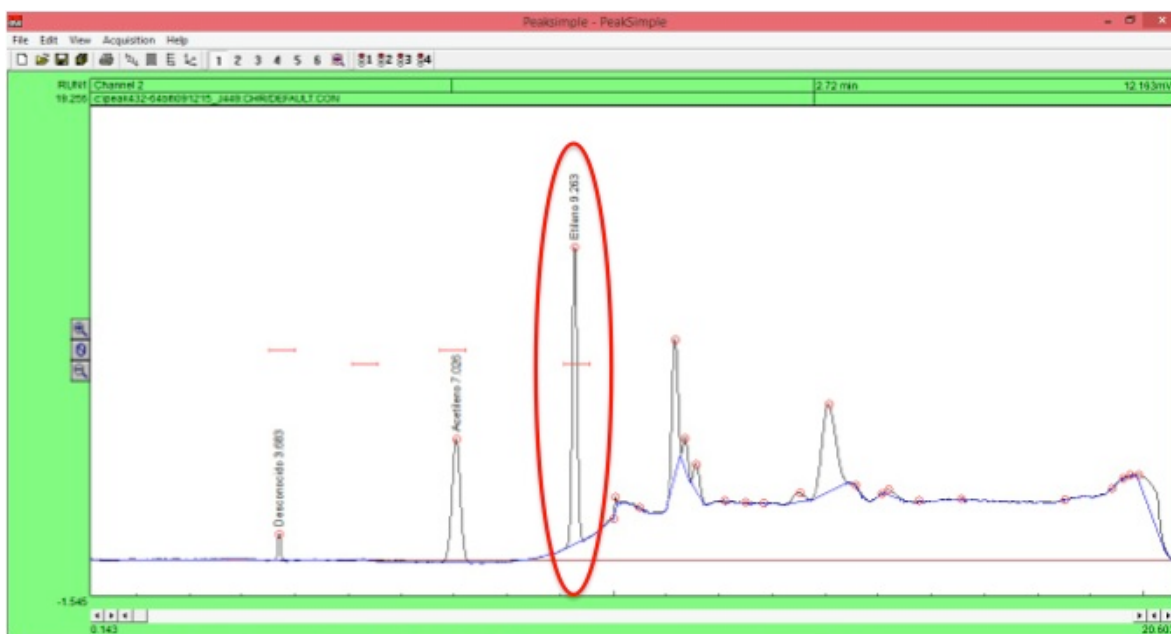


Figura II.2 Ejemplo de un cromatograma visualizado con el programa PeakSimple 4.32. En pico dentro del ovalo rojo corresponde al etileno.

4.3 Variables accesorias del sedimento

Las tasas de fijación en sedimentos se obtuvieron en unidades de $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, sin embargo, para facilitar la comparación de los datos con otros trabajos las tasas fueron extrapoladas a $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Para identificar diferencias de las tasas de fijación de N_2 en sedimentos entre los tratamientos con luz y en oscuridad y entre los núcleos SV y CV se realizaron pruebas t de Student. Para determinar las diferencias entre estaciones de muestreo se utilizó un ANOVA simple, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para los datos de tasas de fijación de N_2 en la filósfera, se utilizaron pruebas t de Student para identificar diferencias entre las hojas 2 y 4 y entre tratamientos con luz y en oscuridad. Los datos de las tasas de fijación en la filósfera, tamaño de grano, C_{org} , N, concentración de Cl-a y los valores de $\delta^{15}\text{N}$, no cumplieron con los supuestos

de normalidad y de homocedasticidad, por lo que se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre estaciones de muestreo. Los resultados que se consideraron significativos fueron aquellos en donde $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 8.0.

4.4 Análisis de datos

Las tasas de fijación en sedimentos se obtuvieron en unidades de $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, sin embargo, para facilitar la comparación de los datos con otros trabajos las tasas fueron extrapoladas a $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Para identificar diferencias de las tasas de fijación de N_2 en sedimentos entre los tratamientos con luz y en oscuridad y entre los núcleos SV y CV se realizaron pruebas t de Student. Para determinar las diferencias entre estaciones de muestreo se utilizó un ANOVA simple, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para los datos de tasas de fijación de N_2 en la filósfera, se utilizaron pruebas t de Student para identificar diferencias entre las hojas 2 y 4 y entre tratamientos con luz y en oscuridad. Los datos de las tasas de fijación en la filósfera, tamaño de grano, C_{org} , N, concentración de Cl-a y los valores de $\delta^{15}\text{N}$, no cumplieron con los supuestos de normalidad y de homocedasticidad, por lo que se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre estaciones de muestreo. Los resultados que se consideraron significativos fueron aquellos en donde $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 8.0.

5. Resultados

5.1 Tasas de fijación de N en sedimentos

Las tasas de fijación de N_2 en sedimentos superficiales en los experimentos en oscuridad en general fueron mayores que en los experimentos con luz (Fig. II.3), aunque no se encontraron diferencias significativas entre experimentos ($p>0.05$), excepto en la estación i-BF en los núcleos SV ($p=0.006$). Los perfiles de las tasas de fijación presentaron poca variación con respecto a la profundidad (coeficiente de variación $<10\%$), sin encontrarse un patrón claro o consistente (Fig. II.4). Por lo cual, se integraron los resultados de las diferentes profundidades para su análisis y discusión, sin considerar en la integración los valores extremos encontrados en un núcleo de i-BF CV. Los valores de las tasas de fijación integradas más bajos se encontraron en o-BF, 7.0 ± 0.5 y $8.9\pm3.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ para los núcleos SV y CV respectivamente, mientras que en el resto de los sitios los valores estuvieron entre 10.3 y $12.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$, aunque las diferencias únicamente fueron significativas ($p<0.05$) entre la estación o-BF y la estación OUT para los núcleos SV (Fig. II.5). En la estación OUT y bSQ los núcleos SV presentaron tasas de fijación mayores que en los núcleos CV y en o-BF e i-BF las tasas fueron mayores en los sitios CV, aunque las diferencias no fueron significativas. Las tasas de fijación con tratamientos con Mo y sin Mo no presentaron diferencias significativas (Fig. II.5) excepto en la estación bSQ en donde $\sim 40\%$ de la fijación puede ser atribuido a las bacterias sulfatoredutoras. Los valores extremos de las tasas de fijación que se encontraron en uno de los núcleos CV de i-BF, entre los centímetros 2 y 5, estuvieron entre 9.6 y $35.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$; estos valores no se detectaron en el

tratamiento con Mo, por lo que dichas tasas pueden ser atribuidas a bacterias sulfatoreductoras.

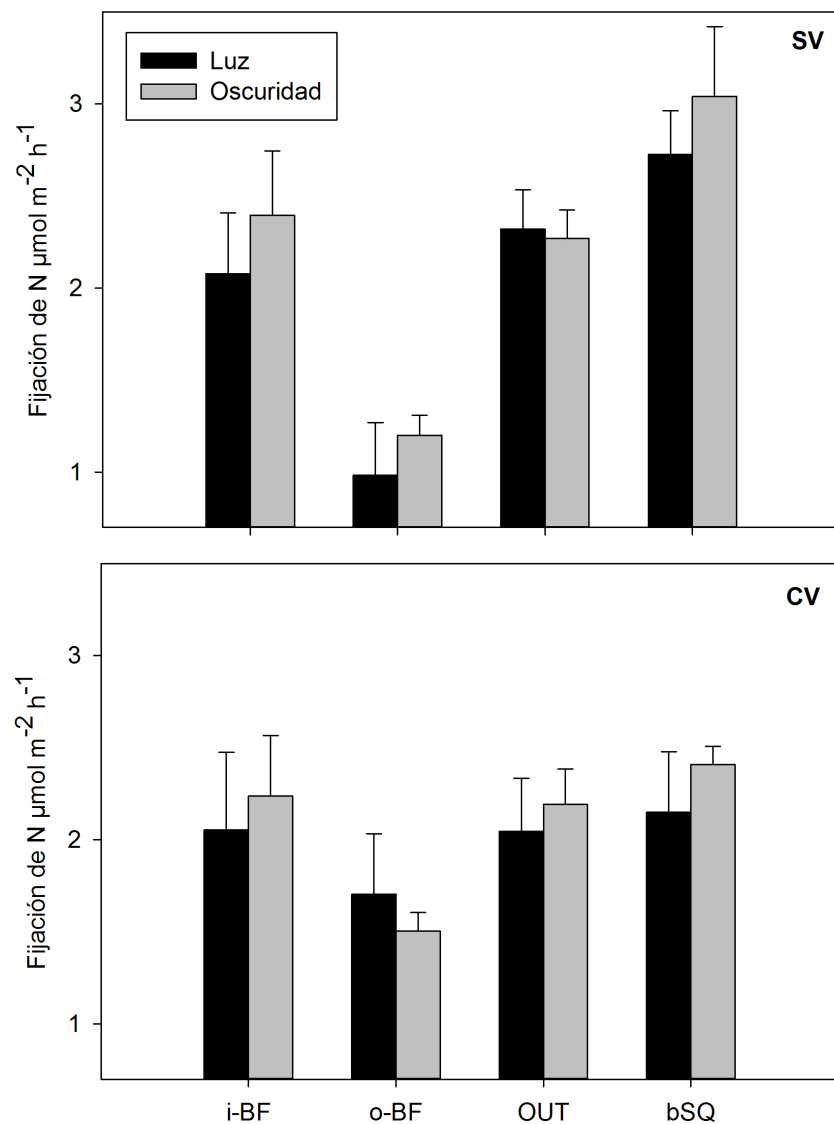


Figura II.3 Variación espacial de las tasas de fijación de N en la superficie de los sedimentos con (CV) y sin (SV) vegetación. Se muestran los tratamientos con luz y en oscuridad. Los valores representan el promedio ± 1 error estándar (n=3).

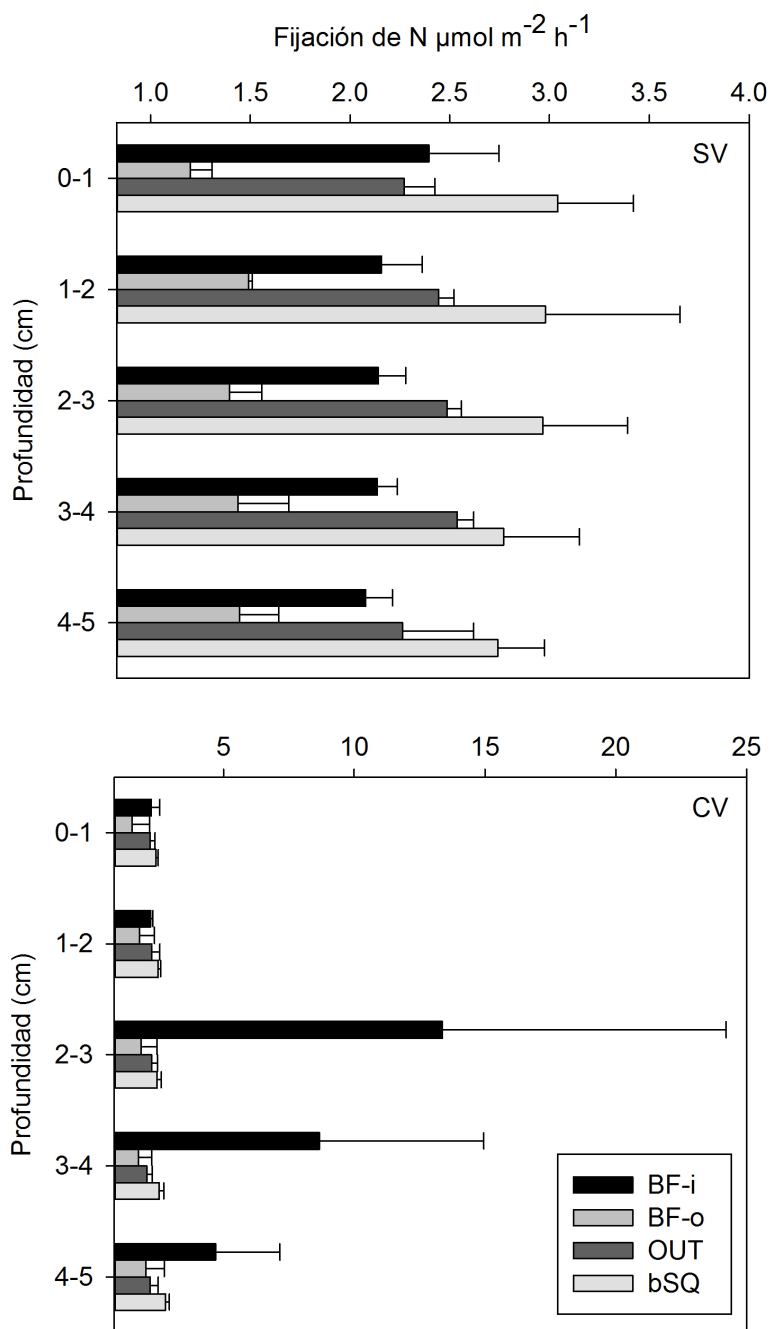


Figura II.4 Perfiles de las tasas de fijación de N en los núcleos sin (SV) y con (CV) vegetación. Los valores representan los promedios de las réplicas ± 1 error estándar (n=3)

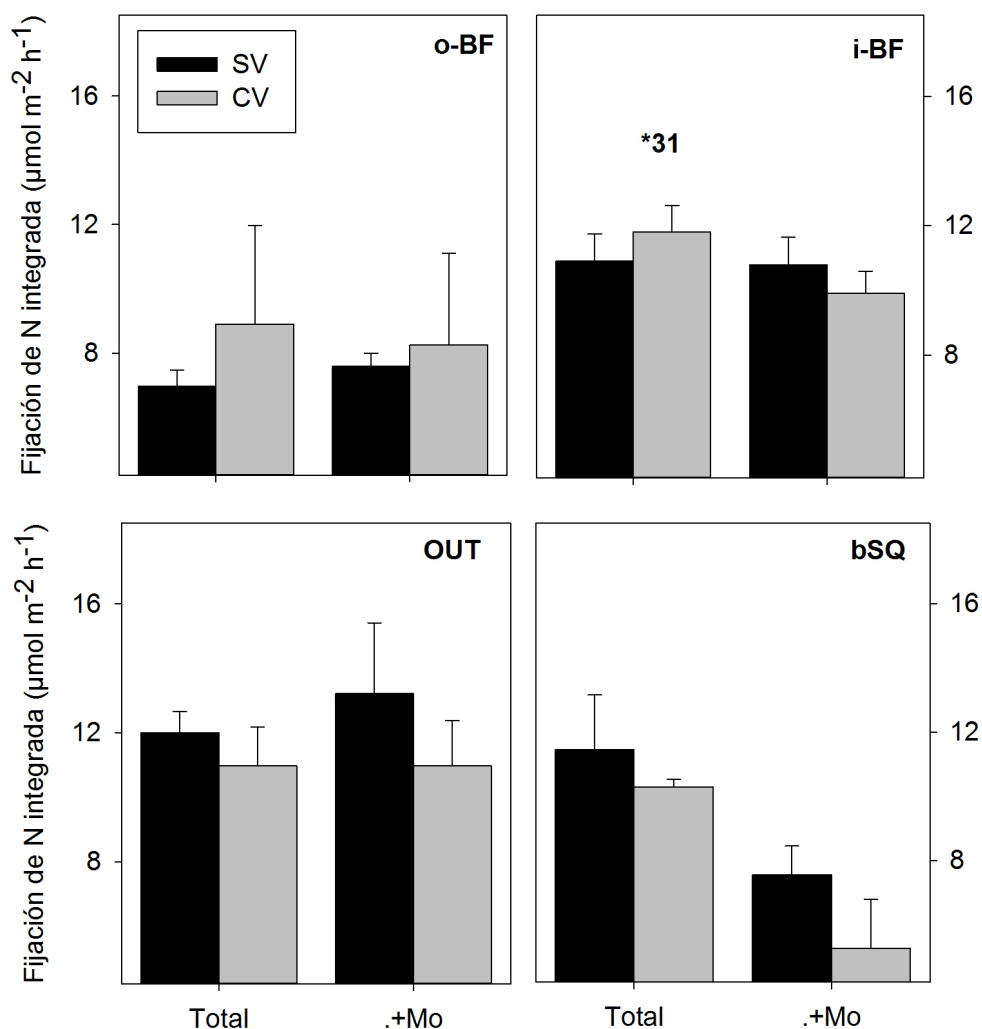


Figura II.5 Variación espacial de las tasas de fijación integrada en sedimentos con (CV) y sin (SV) vegetación. Se muestran los tratamiento con (+Mo) y sin (Total) molibdato de sodio. Los valores representan el promedio de las réplicas ± 1 error estándar ($n=3$), excepto para i-BF en donde no se incluyeron los valores extremos ($n=2$). El valor con asterisco representa el valor extremo de un núcleo en i-BF CV.

5.2 Tasas de fijación de N en la filósfera

Las tasas de fijación en la filósfera no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre la hoja 2 y la hoja 4, por lo que los resultados de ambas hojas se

consideraron como réplicas para los análisis posteriores. En la mayoría de las estaciones (excepto en i-BF) las tasas de fijación en los experimentos en oscuridad fueron mayores que en los experimentos con luz (Fig. II.6a), aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). A pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre estaciones ni entre los tratamientos con luz y en oscuridad ($H_{(3,24)} = 6.46$, $p = 1.00$ y $H_{(3,24)} = 3.07$, $p = 0.385$, respectivamente), las tasas mostraron una tendencia a incrementar en las estaciones más internas.

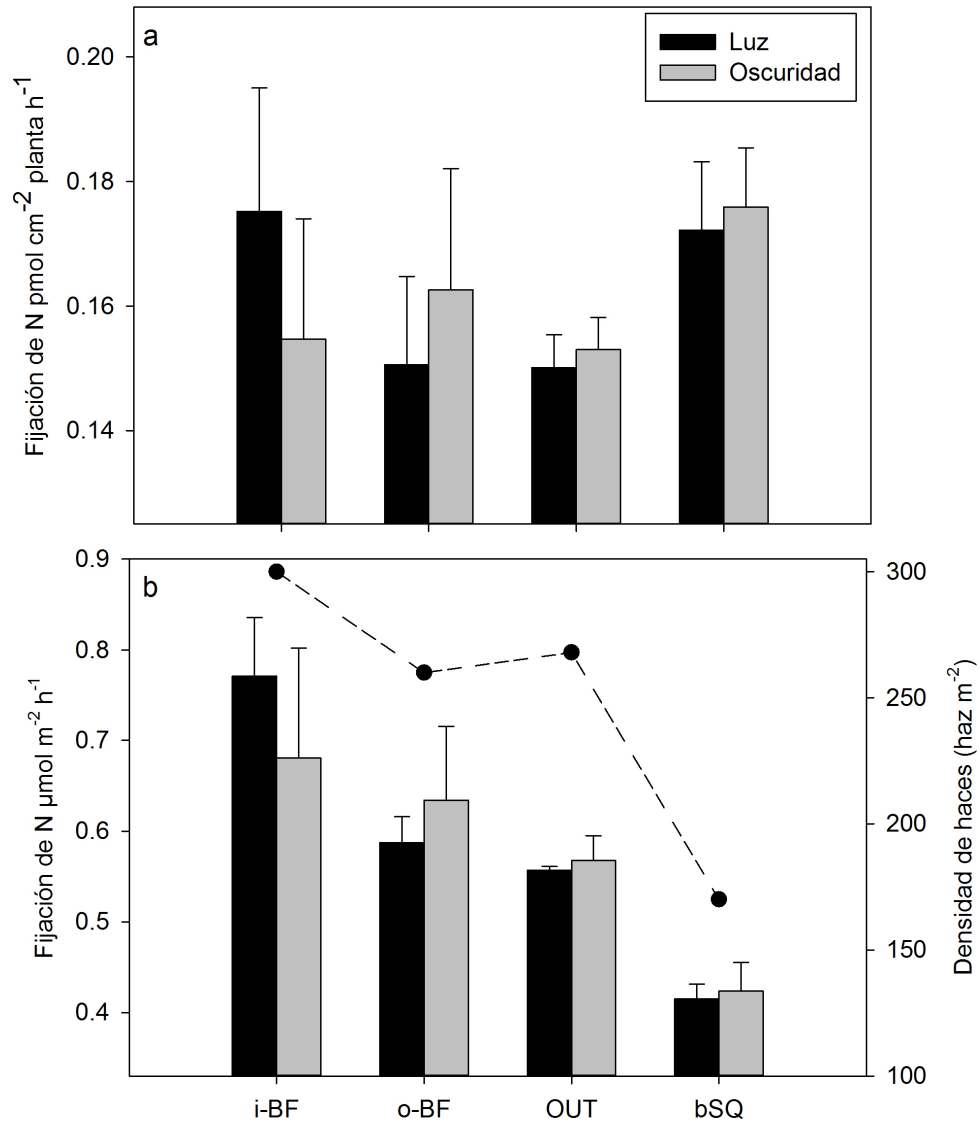


Figura II.6 Variación espacial de las tasas de fijación de N en la filósfera, (a) por centímetro de la planta y (b) por m^2 . Se muestran los tratamientos con luz y en oscuridad. Los valores representan el promedio ± 1 error estándar ($n=6$). La línea punteada en b representa la densidad de haces de *Z. marina*.

Los datos de las tasas de fijación en la filósfera fueron prorrateados por la densidad de haces obtenida en invierno de 2014 (datos no publicados). La tendencia espacial de los datos prorrateados fue similar a la distribución de los

valores de densidad de haces (Fig. II.6b), mostrando un incremento de la estación OUT hacia el interior de BF, mientras que los valores de bSQ fueron menores que los de la zona OUT. La contribución de las bacterias epífitas dentro de las praderas de *Z. marina*, considerando las tasas de fijación en la filósfera y en los sedimentos, fue de $\sim 7\%$ ($0.6 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-2}$) (Fig. II.7).

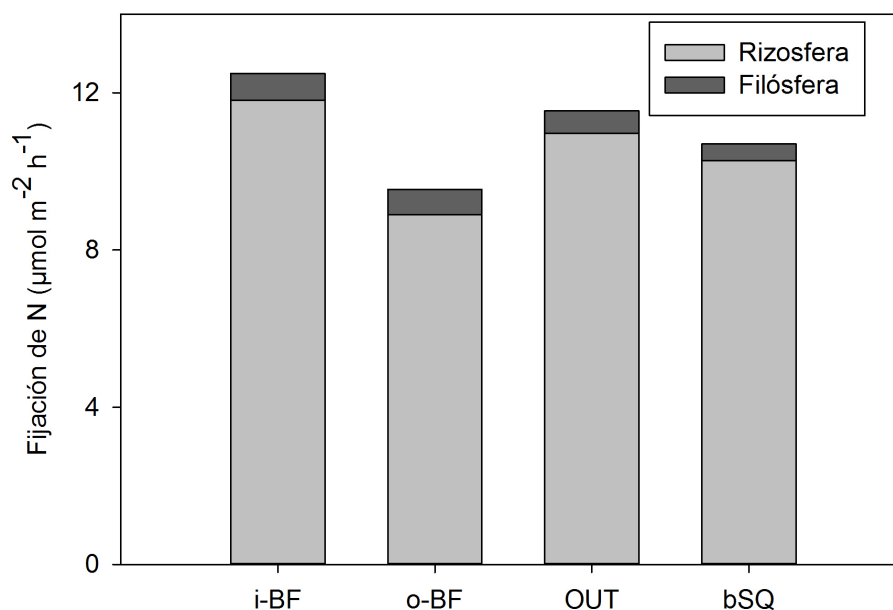


Figura II.7 Variación espacial de la suma de las tasas de fijación de nitrógeno en sedimentos y en epífitas de los sitios con vegetación.

5.3 Variables accesorias

Los resultados de la prueba Kruskal-Wallis aplicada a los datos de los contenidos de limos, C_{org} y N en los sedimentos, indicaron que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las profundidades en ninguna de las estaciones, incluyendo los núcleos CV y SV. Los sedimentos estuvieron compuestos principalmente por arenas y limos; las arcillas representaron menos del 3 % (Fig.

II.8). El contenido de limos incrementó hacia las estaciones más internas, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las estaciones más cercanas a la boca (OUT y o-BF) y las más internas (i-BF y bSQ). En la estación OUT el intervalo del contenido de limos fue de 1 a 34 %, mientras que en las estaciones más internas éstos conformaron entre 42 y 72 % de la composición de los sedimentos.

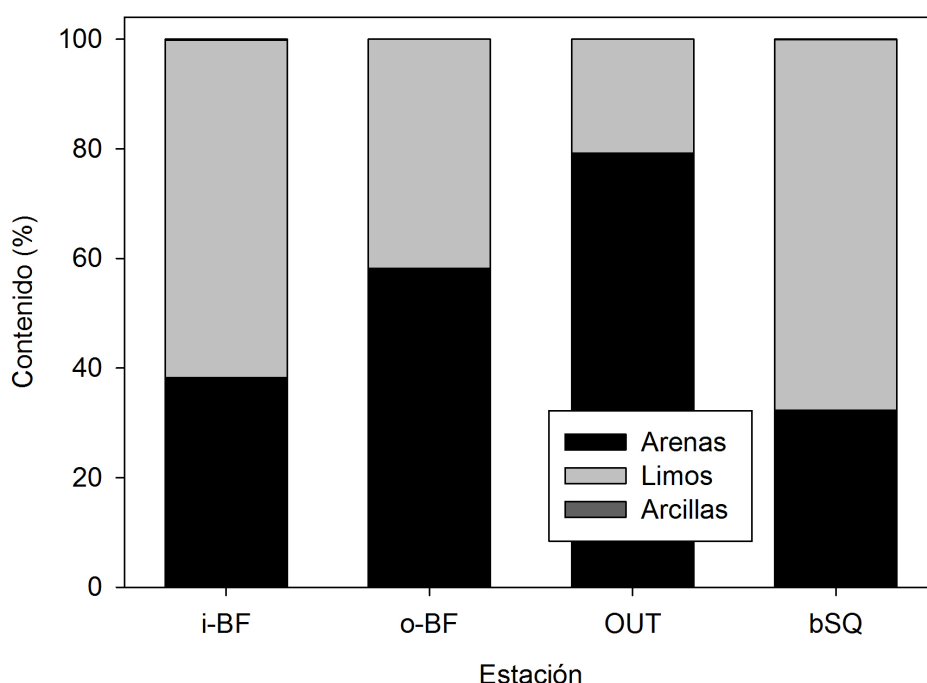


Figura II.8 Variación espacial de la composición granulométrica en sedimentos de BSQ considerando los sitios CV y SV indistintamente debido a que no se encontraron diferencias significativas.

El contenido de C_{org} y de N en los sedimentos presentó un gradiente espacial, encontrándose los valores más altos en la estación i-BF (Fig. II.9), sin encontrarse diferencias significativas entre los núcleos CV y SV ($p > 0.05$). La razón C_{org}/N en las estaciones i-BF y bSQ fue 6.9 ± 0.2 y 7.1 ± 0.2 respectivamente, en OUT fue

6.0±1.8 y en o-BF fue 4.4±0.2. El C_{org} y el N presentaron una correlación significativa ($p < 0.05$) con el contenido de limos ($r = 0.7$). También fue significativa la correlación de la fijación con el C_{org} y con el contenido de limos ($p < 0.05$, $r = 0.19$ y $.20$, respectivamente). Por otra parte, la concentración de clorofila a (Cl-a) en la superficie de los sedimentos no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estaciones, ni entre los núcleos CV y SV. Sin embargo, a pesar de que las diferencias no fueron significativas, en las estaciones i-BF, o-BF y OUT la concentración de Cl-a fue mayor en los sitios con vegetación (Fig. II.9d). En cuanto a la correlación de la Cl-a con el resto de las variables accesorias y con las tasas de fijación, solamente se presentó una correlación significativa con el contenido de limos ($r = 0.44$). Los valores más bajos de la composición isotópica de N ($\delta^{15}\text{N}$) en los tejidos de *Z. marina* se presentaron en i-BF, aunque la variabilidad entre sus réplicas fue alta (valores entre 6.9 y 12.4 ‰) por lo que no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.55$) entre estaciones (Fig. II.9e). En las otras tres estaciones los valores estuvieron entre 10.8 y 11.9 ‰.

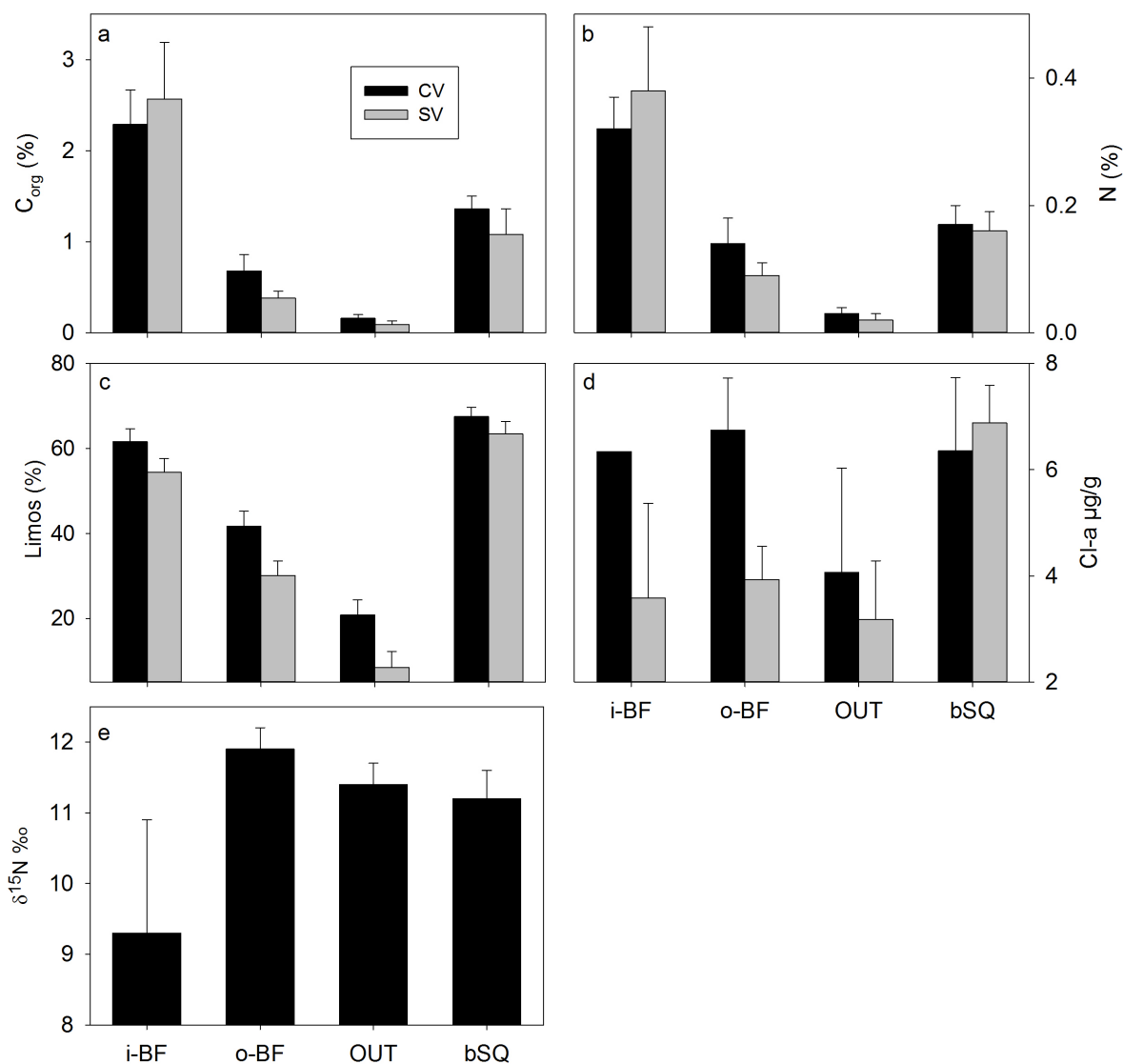


Figura II.9 Variación espacial del (a) contenido de carbono orgánico (Corg), (b) el contenido de N, (c) el contenido de limos, (d) el contenido de clorofila-a (Cl-a) en los sedimentos y (e) la composición isotópica de N ($\delta^{15}\text{N}$) en las hojas de *Z. marina*. Los valores representan el promedio $\pm$ 1 error estándar.

6. Discusión

A pesar de que la fijación de N_2 es un proceso que puede aliviar la limitación de N en las praderas de pastos marinos, existen pocos estudios en los que se han reportado tasas de fijación en los sedimentos y en la filósfera de praderas en

zonas templadas. Los resultados del presente estudio, realizado en Bahía San Quintín, sugieren que la fijación de N_2 para el periodo invernal puede ser atribuida principalmente a las bacterias heterótrofas, tanto en las partes del sedimento donde no penetra la luz como en la parte superficial e incluso en la filósfera. Si bien las tasas de fijación presentaron poca variabilidad entre las estaciones de muestreo, los sedimentos en las estaciones más internas, donde el N proveniente desde el océano adyacente es escaso, presentaron las tasas más elevadas. Las tasas de fijación más bajas se midieron en la estación donde la actividad ostrícola es mayor y donde se han observado altas tasas de desnitrificación. La contribución de las bacterias epífitas a la fijación bentónica (sedimentos+filósfera) en BSQ fue únicamente de $\sim 7\%$. A continuación discutimos sobre los posibles controles de las tasas de fijación bentónica de N_2 en BSQ durante nuestro estudio y al final hacemos una estimación de la posible contribución de este proceso al requerimiento de N de *Z. marina* y al balance de N en la laguna.

6.1 Contribución de los diferentes grupos de diazótrofos

La similitud en las tasas de fijación de N_2 entre los experimentos con luz y en oscuridad y la similitud de las tasas entre los experimentos +Mo y sin Mo, sugieren que los heterótrofos fueron el grupo funcional con mayor contribución a las tasas de fijación en Bahía San Quintín. Esto implica que, al menos para nuestro periodo de muestreo que fue en invierno, las cianobacterias fotosintéticas fijadoras de N_2 en las zonas iluminadas (sedimentos superficiales y filósfera) y las bacterias sulfatoreductoras, presentaron en general, baja o nula actividad de fijación. Si bien son pocos los estudios que han caracterizado los grupos funcionales que

contribuyen a la fijación de N_2 en praderas de pastos marinos de clima templado, algunos de estos estudios también reportan que las bacterias heterótrofas pueden ser las principales fijadoras (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998). Sin embargo, en algunos sitios se ha medido (Welsh et al., 1996a) o se ha inferido (Russell et al., 2016) que las sulfatoredutoras pueden contribuir con un alto porcentaje de la fijación sedimentaria. A pesar de su aparente importancia en la fijación de N_2 en hábitats bentónicos marinos, incluyendo las praderas de pastos, a diferencia de las cianobacterias y las bacterias sulfatoredutoras, el grupo funcional de los fijadores heterótrofos no ha sido caracterizado detalladamente. Es importante mencionar que en nuestro estudio, así como en el de Cole y McGlathery (2012), la conclusión de que son los heterótrofos el grupo funcional dominante de la fijación en los sustratos iluminados (sedimentos superficiales y las hojas de los pastos), se basa en el supuesto que las cianobacterias fijadoras fotoautótrofas únicamente contribuirían a la fijación en los tratamientos con luz. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de las cianobacterias a la fijación en los tratamientos en la oscuridad, ya que se sabe que algunas cianobacterias unicelulares y algunas filamentosas (con y sin heterocistos) tienen la capacidad de fijar N durante la noche (Bergman et al., 1997; Severin and Stal, 2008). Gracia-Escobar et al. (2014) caracterizaron la comunidad fitoplanctónica en una estación en Bahía Falsa y reportaron que las cianofitas filamentosas son dominantes durante el reflujo de la marea, lo que sugiere que éstas son resuspendidas desde los sedimentos del interior de la laguna. Es necesario determinar si estas cianobacterias son diazótrofes bentónicas y si fijan N_2 durante el día o la noche.

La contribución de las bacterias sulfatoreductoras a la fijación de N_2 fue baja en la mayoría de las estaciones (entre el 0 y el 15%). En otros sitios con presencia de *Z. marina* también se ha observado que las bacterias sulfatoreductoras contribuyen poco (<25 %) a las tasas de fijación total (Cole and McGlathery, 2012; McGlathery et al., 1998), lo cual ha sido asociado a sedimentos arenosos con baja concentración de materia orgánica (<2 %). En general, los sedimentos de BSQ presentan muy bajo contenido de arcillas (<3 %); en las zonas más dinámicas (estaciones OUT y o-BF) los sedimentos son arenosos y con bajo contenido de C (<1 %), mientras que en las estaciones internas predominan los lodos limosos (Daesslé et al., 2009) con contenidos de C_{org} sedimentario ligeramente mayores (Fig. II.9a). El tamaño de grano y la hidrodinámica parecen limitar la acumulación de carbono orgánico en los sedimentos de la laguna, lo que aparentemente limita la sulfatorreducción. Sin embargo, en la estación bSQ donde los sedimentos estuvieron compuestos principalmente por limos y donde el contenido de C_{org} fue mayor a 1 %, las bacterias sulfatoreductoras contribuyeron con ~40 % a las tasas de fijación de N_2 , similar a la contribución reportada en sitios con alto contenido de materia orgánica sedimentaria (Capone, 1982; Fulweiler et al., 2013; Welsh et al., 1996b). También en uno de los núcleos CV de la estación i-BF se midieron altas tasas de fijación asociada a bacterias sulfatoreductoras, lo que probablemente refleja que las comunidades bacterianas pueden estar distribuidas de manera heterogénea en los sedimentos, formando microzonas con altas biomasas cercanas a las raíces y rizomas con alta disponibilidad de carbono orgánico lábil (O'Donohue et al., 1991).

6.2 Tasas de fijación de N en los sedimentos

Las tasas de fijación en los sedimentos de BSQ medidas en este estudio (de 167 a 288 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) se encuentran dentro del rango reportado para los sedimentos de otros sitios templados con praderas de pastos (Capone, 1982; Cole and McGlathery, 2012; Cook et al., 2015; McGlathery et al., 1998; Welsh et al., 1996a), sin embargo, al compararlos con mediciones realizadas únicamente durante el invierno, nuestros resultados son relativamente altos. Por ejemplo, McGlathery et al. (1998) reportaron tasas entre 86 y 193 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ para sedimentos en praderas de *Z. marina* en Limfjord, Dinamarca, mientras que Welsh et al. (1996a) reportaron tasas entre 7.1 y 14.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ para praderas de *Z. noltii* en Bassin d'Archachon, Francia.

Es de notar, sin embargo, que el intervalo de valores que medimos es relativamente estrecho, indicando que hubo poca variabilidad espacial en las tasas de fijación de N_2 incluyendo en la vertical dentro de un mismo núcleo, dentro y fuera de las praderas en cada uno de los sitios, así como entre sitios a lo largo de la laguna. Es posible que la poca variabilidad espacial de las tasas de fijación esté relacionada con las bajas biomásas y el escaso crecimiento de *Z. marina* durante los meses de invierno. En BSQ, los pastos marinos presentan tasas máximas de crecimiento y máxima biomasa en primavera-verano y las mínimas en invierno (Cabello-Pasini et al., 2003; Poumian-Tapia and Ibarra-Obando, 1999). Se ha observado que la tendencia temporal de las tasas de fijación en praderas de pastos marinos está relacionada con la variabilidad en el metabolismo de los pastos en zonas templadas, con mayores tasas en la temporada de mayor

crecimiento y menores tasas en invierno (McGlathery et al., 1998; Welsh, 2000). La explicación a esta relación ha sido que en los periodos más productivos los pastos exudan mayores cantidades de C orgánico lábil a través de las raíces y rizomas, favoreciendo así la actividad de las bacterias heterótrofas (Moriarty et al., 1986; Welsh, 2000), grupo que aparentemente fue el principal contribuyente a la fijación total de N_2 en nuestro sitio de estudio.

La baja productividad y la baja biomasa de los pastos en invierno también podría explicar que no se observaran diferencias significativas entre las tasas de fijación en los sedimentos dentro y fuera de las praderas. Por ejemplo, Russell et al. (2016) observaron que las tasas de fijación de N_2 en praderas de *Z. muelleri*, un pasto tropical, fueron más bajas en el invierno, y fueron similares en sedimentos dentro y fuera de las praderas en tanto que la fijación fue mayor dentro de las praderas en los meses más productivos. Por otro lado, Cole y McGlathery (2012) observaron tasas de fijación similares dentro y fuera de praderas jóvenes (entre 2 y 3 años de haberse establecido y con densidad <100 haces m^{-2}) de *Z. marina* en tanto que en praderas maduras (7 a 8 años y densidad >400 haces m^{-2}) la fijación fue mayor dentro de las praderas. Estos autores sugieren que la densidad de haces puede jugar un papel importante en el control de las diferencias de las tasas de fijación dentro y fuera de las praderas. En BSQ, la densidad de haces en las estaciones muestreadas, reportada para la temporada invernal, varía entre 170 y 300 haces m^{-2} , una densidad probablemente baja para inducir diferencias en las tasas de fijación dentro y fuera de las praderas. Cabe mencionar que en las estaciones OUT y bSQ se presentaron tasas de fijación ligeramente mayores en los sedimentos SV; en el caso de bSQ, dichos sedimentos también tuvieron un

ligero mayor contenido de Cl-a. Ya que el contenido de Cl-a es considerado como un indicador de la biomasa de microalgas bentónicas, una mayor fijación en sedimentos sin pastos que en praderas adyacentes probablemente sugiere que cianobacterias fijadoras de N_2 están contribuyendo a la fijación en sedimentos SV (Nagel, 2004; Russell et al., 2016).

La única estación en donde las tasas de fijación fueron significativamente más bajas que en el resto de las estaciones fue en o-BF; en esta estación también se observaron los valores más altos de $\delta^{15}N$ de las hojas de los pastos (Fig. II.9e). En otros estudios (Sandoval-Gil et al., 2015 y datos no publicados) también hemos observado que los valores máximos de $\delta^{15}N$ en *Z. marina* se observan en esta estación, sugiriendo que la desnitrificación es un proceso intenso que domina sobre la fijación de N_2 . En esta estación ocurre el impacto más directo de la ostricultura en los sedimentos a través de los aportes de heces y pseudoheces (Sandoval-Gil et al., 2016), como lo reflejan las bajas razones C_{org}/N sedimentario. En diversos estudios se ha demostrado que los ostricultivos aportan una gran cantidad de materia orgánica lábil a los sedimentos, proveniente de las heces y las pseudoheces (Newell et al., 2005) y que dichos aportes intensifican el proceso de desnitrificación (Kellogg et al., 2014). Se puede suponer entonces que la desnitrificación puede ser dominante en los sedimentos de esta zona, posiblemente limitando la actividad de los diazótrofos. Sin embargo, es necesario realizar estudios para entender la interacción entre las bacterias desnitrificadoras y los diazótrofos y cuales son las posibles causas que limitan o intensifican la actividad de ambos grupos.

6.3 Tasas de fijación de N en la filósfera

Sólo una pequeña fracción (~7 %) de las tasas de fijación bentónica (sedimentos+filósfera) en BSQ puede ser atribuida a las epífitas., como se ha reportado para otros sitios con *Zostera* spp. en zonas templadas en invierno (McRoy et al., 1973; Welsh, 2000). Las tasas de fijación en la filósfera fueron bajas ($<13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) comparadas con las tasas medidas en praderas de *Z. marina* durante el verano, donde se han encontrado valores hasta dos órdenes de magnitud mayores que las tasas más altas reportadas en éste estudio (Cole and McGlathery, 2012; Reynolds et al., 2015). Similar a los sedimentos, uno de los factores que estimulan las tasas de fijación en la filósfera es el C lábil exudado por los pastos, en este caso a través de las hojas (Capone et al., 1979). Uno de los principales factores que afectan la variación de la fijación en la filósfera es la cantidad de epífitas en las hojas (Reynolds et al., 2015). Aunque en este trabajo no se midió la cantidad las epífitas, a simple vista no se notaron diferencias entre las hojas 2 y 4 de un mismo haz, ni entre las hojas de diferentes praderas.

6.4 Contribución de la fijación de N a la demanda de N de *Z. marina*

Utilizado la información de la demanda específica de N ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y de la biomasa de *Z. marina* para el periodo de invierno reportada por Sandoval-Gil et al. (2015), se calculó una demanda de N de *Z. marina* por metro cuadrado de 114 a 238 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Tabla II.1). Las tasas de fijación obtenidas en el presente estudio (filósfera+sedimento) fueron de 9.5 a 13.0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ de N, por lo que la fijación de N_2 potencialmente aportaría entre 5 y 10% del N requerido por *Z. marina* en BSQ, similar a lo reportado para otros sistemas (5-12%) (McGlathery et al., 1998;

Welsh et al., 1996a). El porcentaje de contribución fue mayor en la parte más interna de BF en concordancia con los valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$ en hojas de *Z. marina* observados en la estación i-BF en el presente estudio y en estudios previos (Sandoval-Gil et al., 2015; Hernández-López datos no publicados). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas acuáticas disminuyen con el consumo de N proveniente de la fijación de N_2 , ya que la composición de la fuente, el N_2 atmosférico, es cercana a 0 ‰ (Sharp, 2007).

Tabla II.1 Valores de la biomasa, la demanda, la tasas de fijación de N y la contribución de la fijación de N para *Z. marina*.

	Biomasa* (gPS m ⁻²)	Demanda de N* ($\mu\text{mol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Demanda de N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Fijación de N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Contribución (%)
i-BF	178	0.7	125	12.5	10.8
o-BF	229	0.5	114	9.5	8.4
OUT	199	1.2	238	11.5	4.8
bSQ	242	0.8	194	10.7	5.5

* Valores obtenidos de Sandoval-Gil et al. (2015)

6.5 Contribución de la fijación como fuente de N en BSQ

Finalmente, realizamos un cálculo para estimar el papel de la fijación de N_2 en el balance de N en BSQ para probar el supuesto de que este proceso es poco importante (Camacho-Ibar et al., 2003). De acuerdo con Ward et al. (2003) el área que cubren los pastos marinos, las planicies lodosas y los canales en BSQ es de 20.7, 8.9 y 8.5 km², respectivamente. La tasa promedio de los cuatro sitios dentro de las praderas (sedimentos+filósfera) fue de $266 \pm 34 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ y para sedimentos sin vegetación fue de $266 \pm 98 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$. Prorrateando estas tasas por el área superficial de cada hábitat resulta en aportes al sistema por fijación de N por fijación de N_2 de $5.5 \pm 0.7 \times 10^3 \text{ mol d}^{-1}$ en el área cubierta por *Z. marina*, en

las planicies lodosas fue de $2.4 \pm 0.8 \times 10^3 \text{ mol d}^{-1}$ y en los canales de $2.3 \pm 0.8 \times 10^3 \text{ mol d}^{-1}$, resultando en un aporte total de $10.1 \pm 2.4 \times 10^3 \text{ mol d}^{-1}$ ($0.26 \pm 0.06 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).

Utilizando un modelo de balance de masas (el modelo de LOICZ), Camacho-Ibar et al. (2003) calcularon un aporte de NID (nitrato+amonio) por advección desde el océano durante el invierno de $2.2 \times 10^3 \text{ mol N d}^{-1}$ y un aporte del flujo por mezcla ocasionado por la marea de $86 \times 10^3 \text{ mol N d}^{-1}$, para un aporte oceánico total de $88 \times 10^3 \text{ mol N d}^{-1}$. Nuestros resultados muestran que la fijación equivale a ~12% de los aportes de NID provenientes desde el océano (Fig. II.10). Con el mismo modelo, estos autores calcularon que la diferencia entre la fijación y la desnitrificación (Nfix-denitr en la terminología del modelo; ver detalles en Camacho-Ibar et al., 2003) en invierno fue de $-0.7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ por lo que con nuestro cálculo de fijación podemos estimar una desnitrificación de $1.0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ que corresponde a $38 \times 10^3 \text{ mol N d}^{-1}$. En resumen, nuestros cálculos indican que durante el invierno, la fijación de N_2 puede equivaler a la tercera parte de las pérdidas de N por desnitrificación.

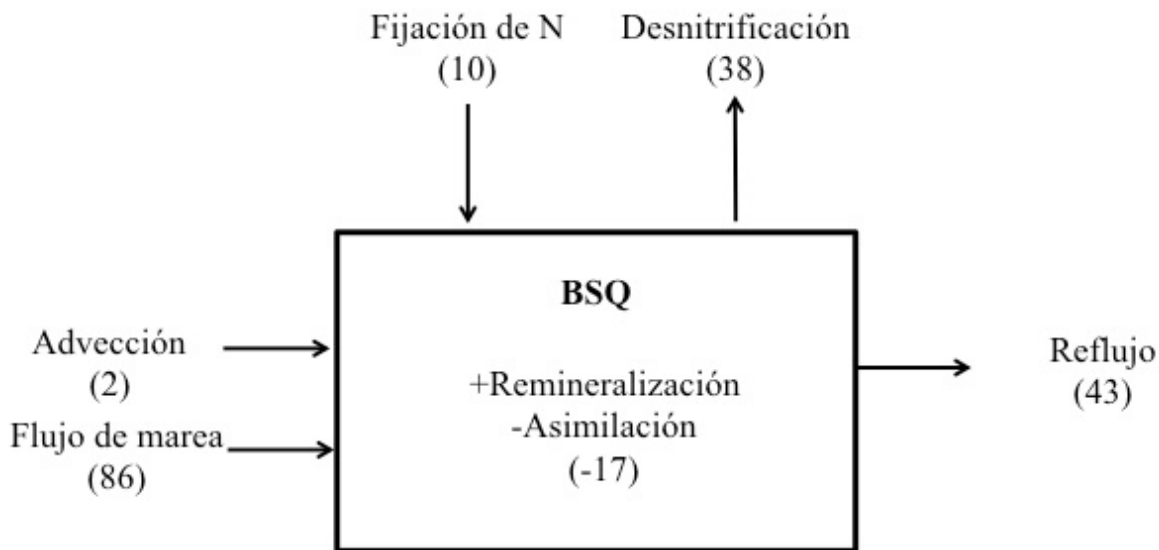


Figura II.10 Flujos que aportan o remueven NID de BSQ, los números entre paréntesis corresponden a los valores de los flujo de NID y están dados en $\times 10^3$ mol N d⁻¹, para detalles de los valores revisar el texto. Las flechas indican la dirección del flujo entre el océano/atmósfera y BSQ. El los procesos internos en símbolo + representa adición y el – remoción de NID del sistema.

Como se ha observado claramente en otros estudios (McGlathery et al., 1998; Welsh, 2000), es muy probable que durante la temporada de máximo crecimiento de *Z. marina* (primavera y verano) en BSQ, la fijación sea mayor que durante el invierno en los sitios con presencia de pastos marinos, aportando una cantidad de N notablemente mayor que la que encontramos en éste trabajo. Por lo anterior, consideramos importante realizar mediciones de las tasas de fijación de N₂ a lo largo de todo el año, incluyendo la medición simultánea de variables relacionadas con la fenología de los pastos marinos y tasas de desnitrificación, que nos permitan evaluar la contribución de éste proceso tanto en el reservorio de N en la

laguna, como su contribución para los pastos marinos y posiblemente para otros productores primarios como el microfitobentos.

Conclusiones generales

- a) Las diferencias en la composición isotópica entre *Z. marina* y *Ulva* spp. pueden estar asociadas con diferencias fisiológicas que ocasionan variaciones en el fraccionamiento del C y del N durante la captación y la asimilación.
- b) El enriquecimiento de ^{15}N encontrado en la mayoría de los tejidos de *Z. marina* y *Ulva* spp. en BSQ con respecto al nitrato oceánico, sugiere que hay un enriquecimiento del reservorio de N disponible dentro de la laguna asociado a los procesos de nitrificación-desnitrificación acoplados llevados a cabo en los sedimentos.
- c) La contribución de la fijación de N_2 para la demanda de N de *Z. marina* es mayor en la zona más interna de BF, lo cual fue corroborado tanto con las mayores tasas de fijación como con el decremento de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en los tejidos foliares.
- d) La mayor parte de la contribución a las tasas de fijación de N_2 es realizada en los sedimentos por bacterias heterótrofas.
- e) Aunque la desnitrificación es el proceso dominante al interior de BSQ, la fijación de N_2 no debe ser considerada despreciable, pues en invierno la producción de N por fijación puede representar casi una tercera parte del N que se pierde vía desnitrificación.
- f) Es probable que durante primavera-verano cuando *Z. marina* presenta las máximas tasas de crecimiento y máxima biomasa, las tasas de fijación puedan ser mayores. Por lo que se recomienda tener una mejor resolución temporal para poder determinar de manera fehaciente que tan importante

es la fijación de N en BSQ, tanto a nivel ecosistema como para los productores primarios.

Referencias

- Adams, D.G., Duggan, P.S., 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* 144, 3–33. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00505.x
- Agawin, N.S.R., Ferriol, P., Cryerm, C., Alcon, E., Busquets, A., Sintes, E., Vidal, C., Moyà, G., 2016. Significant nitrogen activity with the phyllosphere of Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: first report. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 551, 53–62. doi:10.3354/meps11755
- Aguirre-Muñoz, A., Buddemeier, R.W., Camacho-Ibar, V.F., Carriquiry, J.D., Ibarra-Obando, S.E., Massey, B.W., Smith, S. V., Wulff, F., 2001. Sustainability of coastal resource use in San Quintin, Mexico. *Ambio* 30, 142–149. doi:10.1579/0044-7447-30.3.142
- Alcoverro, T., Manzanera, M., Romero, J., 2001. Annual metabolic carbon balance of the seagrass *Posidonia oceanica*: The importance of carbohydrate reserves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 105–116. doi:10.3354/meps211105
- Alexandre, A., Hill, P.W., Jones, D.L., Santos, R., 2015. Dissolved organic nitrogen: A relevant, complementary source of nitrogen for the seagrass *Zostera marina*. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1477–1483. doi:10.1002/lno.10084
- Alkhatib, M., Lehmann, M.F., del Giorgio, P.A., 2012. The nitrogen isotope effect of benthic remineralization-nitrification-denitrification coupling in an estuarine environment. *Biogeosciences* 9, 1633–1646. doi:10.5194/bg-9-1633-2012
- Altamirano, M., Flores-Moya, A., Conde, F., Figueroa, F.L., 2000. Growth seasonality, photosynthetic pigments, and carbon and nitrogen content in relation to environmental factors: a field study of *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia* 39, 50–58. doi:10.2216/i0031-8884-39-1-50.1

- Alvarez-Borrego, J., Alvarez-Borrego, S., 1982. Temporal and spatial variability of temperature in two coastal lagoons. *CalCOFI Rep XXIII*, 188–197.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N., Clarke, K.R., 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK.
- Anderson, W., Fourqurean, J., 2003. Intra-and interannual variability in seagrass carbon and nitrogen stable isotopes from south Florida, a preliminary study. *Org. Geochem.* 34, 185–194. doi:10.1016/S0146-6380(02)00161-4
- Andersson, B., Sundbäck, K., Hellman, M., Hallin, S., Alsterberg, C., 2014. Nitrogen fixation in shallow-water sediments: Spatial distribution and controlling factors. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1932–1944. doi:10.4319/lo.2014.59.6.1932
- Atkinson, M.J., Smith, S. V, 1983. C: N: P ratios of benthic marine plants. *Limnol. Oceanogr.* 28, 568–574. doi:10.4319/lo.1983.28.3.0568
- Aveytua-Alcázar, L., Camacho-Ibar, V.F., Souza, A.J., Allen, J.I., Torres, R., 2008. Modelling *Zostera marina* and *Ulva* spp. in a coastal lagoon. *Ecol. Modell.* 218, 354–366. doi:10.1016/j.ecolmodel.2008.07.019
- Baeta, A., Pinto, R., Valiela, I., Richard, P., Niquil, N., Marques, J.C., 2009. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in the Mondego estuary food web: Seasonal variation in producers and consumers. *Mar. Environ. Res.* 67, 109–116. doi:10.1016/j.marenvres.2008.11.005
- Bauer, K., Díez, B., Lugomela, C., Seppälä, S., Borg, A.J., Bergman, B., 2008. Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 205–21. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00423.x

- Bedard-Haughn, a, van Groenigen, J.W., van Kessel, C., 2003. Tracing N-15 through landscapes: potential uses and precautions. *J. Hydrol.* 272, 175–190. doi:Pii s0022-1694(02)00263-9r10.1016/s0022-1694(02)00263-9
- Beer, S., 1996. Photosynthetic utilization of inorganic carbon in *Ulva**. *Sci Mar* 60, 125–128.
- Beer, S., Koch, E., 1996. Photosynthesis in seagrasses vs. marine algae in globally changing CO₂ environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141, 199–204. doi:10.3354/meps141199
- Beer, S., Rehnberg, J., 1997. The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *zostera marina*. *Aquat. Bot.* 56, 277–283. doi:10.1016/S0304-3770(96)01109-6
- Beer, S., Shomer-Ilan, A., Waisel, Y., 1980. Carbon metabolism in seagrasses. II. Patterns of photosynthetic CO₂ incorporation. *J. Exp. Bot.* 31, 1019–1026. doi:10.1093/jxb/31.4.1019
- Bentzon-Tilia, M., Traving, S.J., Mantikci, M., Knudsen-Leerbeck, H., Hansen, J.L., Markager, S., Riemann, L., 2015. Significant N₂ fixation by heterotrophs, photoheterotrophs and heterocystous cyanobacteria in two temperate estuaries. *ISME J.* 1–13. doi:10.1038/ismej.2014.119
- Bergman, B., Gallon, J., Rai, A.N., Stal, L., 1997. N₂ Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19, 139–185. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00296.x
- Berman-Frank, I., Quigg, A., Finkel, Z. V., Irwin, A.J., Haramaty, L., 2007. Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* 52, 2260–2269. doi:10.4319/lo.2007.52.5.2260

- Bode, A., Alvarez-Ossorio, M.T., Varela, M., 2006. Phytoplankton and macrophyte contributions to littoral food webs in the Galician upwelling estimated from stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 318, 89–102. doi:10.3354/meps318089
- Bombar, D., Paerl, R.W., Riemann, L., 2016. Marine Non-Cyanobacterial Diazotrophs: Moving beyond Molecular Detection. *Trends Microbiol.* xx, 1–12. doi:10.1016/j.tim.2016.07.002
- Boschker, H.T.S., Wielemaker, A., Schaub, B.E.M., Holmer, M., 2000. Limited coupling of macrophyte production and bacterial carbon cycling in the sediments of *Zostera* spp. meadows. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 203, 181–189. doi:10.3354/meps203181
- Brandes, J.A., Devol, A.H., Deutsch, C., 2007. New developments in the marine nitrogen cycle. *Chem. Rev.* 107, 577–589. doi:10.1021/cr050377t
- Brown, C.A., Ozretich, R.J., 2009. Coupling between the coastal ocean and Yaquina bay, Oregon: Importance of oceanic inputs relative to other nitrogen sources. *Estuaries and Coasts* 32, 219–237. doi:10.1007/s12237-008-9128-6
- Cabello-Pasini, A., Muñiz-Salazar, R., Ward, D.H., 2004. Caracterización bioquímica del pasto marino *Zostera marina* en el límite sur de su distribución en el Pacífico Norte. *Ciencias Mar.* 30, 21–34. doi:10.7773/cm.v30i11.123
- Cabello-Pasini, A., Muñiz-Salazar, R., Ward, D.H., 2003. Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* at its southern end of distribution in the North Pacific. *Aquat. Bot.* 76, 31–47. doi:10.1016/S0304-3770(03)00012-3
- Camacho-Ibar, V., Carriquiry, J., Smith, S., 2003. Non-conservative P and N fluxes and net ecosystem production in San Quintin Bay, Mexico. *Estuaries and*

- Coasts 26, 1220–1237. doi:10.1007/BF02803626
- Capone, D., 1988. Benthic nitrogen fixation, in: Blackburn, T., Sorensen, J. (Eds.), Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments. John Wiley & Sons, Inc., pp. 85–123.
- Capone, D., 1982. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by rhizosphere sediments of the eelgrass *Zostera marina*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10, 67–75. doi:10.3354/meps010067
- Capone, D., Carpenter, E., 1982. Nitrogen Fixation in the Marine Environment. Sci. (New York, NY) 217, 1140–1142.
- Capone, D.G., Taylor, F., 1977. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere *Thalassia testudinum*. Mar. Biol. 19–28. doi:10.1007/BF02197764
- Capone, G., Penhale, P.A., Taylor, F., 1979. Relationship between productivity and N₂ (C₂H₂) fixation in a *Thalassia testudinum* community. Limnol. Oceanogr. 24, 117–125. doi:10.4319/lo.1979.24.1.0117
- Carlier, A., Riera, P., Amouroux, J., Bodiou, J., Desmalades, M., Grémare, A., 2009. Spatial heterogeneity in the food web of a heavily modified Mediterranean coastal lagoon: stable isotope evidence. Aquat. Biol. 5, 167–179. doi:10.3354/ab00147
- Carpenter, E.J., Capone, D.G., 2008. Nitrogen fixation in the marine environment, in: Capone, D.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Carpenter, E.J. (Eds.), Nitrogen in the Marine Environment. Elsevier, pp. 141–198.
- Carriquiry, J.D., Jorgensen, P., Villaescusa, J.A., Ibarra-Obando, S.E., 2016. Isotopic and elemental composition of marine macrophytes as biotracers of nutrient recycling within a coastal lagoon in Baja California, Mexico. Estuaries

- and Coasts 39, 451–461. doi:10.1007/s12237-015-9992-9
- Casareto, B., Charpy, L., Langlade, M., 2008. Nitrogen fixation in coral reef environments. ... Int. Coral Reef ... 7–11.
- Charpy, L., Alliod, R., Rodier, M., Golubic, S., 2007. Benthic nitrogen fixation in the SW New Caledonia lagoon. Aquat. Microb. Ecol. 47, 73–81. doi:10.3354/ame047073
- Christiaen, B., Bernard, R.J., Mortazavi, B., Cebrian, J., Ortmann, A.C., 2014. The degree of urbanization across the globe is not reflected in the $\delta^{15}\text{N}$ of seagrass leaves. Mar. Pollut. Bull. 83, 440–445. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.024
- Cohen, R.A., Fong, P., 2006. Using opportunistic green macroalgae as indicators of nitrogen supply and sources to estuaries. Ecol. Appl. 16, 1405–1420.
- Cohen, R.A., Fong, P., 2005. Experimental Evidence Supports the Use of $\Delta^{15}\text{N}$ Content of the Opportunistic Green Macroalga *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) To Determine Nitrogen Sources To Estuaries¹. J. Phycol. 41, 287–293. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04022.x
- Cole, L., McGlathery, K., 2012. Nitrogen fixation in restored eelgrass meadows. Mar. Ecol. Prog. Ser. 448, 235–246. doi:10.3354/meps09512
- Cole, M., Valiela, I., Kroeger, K., Tomasky, G., Cebrian, J., Wigand, C., McKinney, R., Grady, S., Carvalho da Silva, M., 2004. Assessment of a $\delta^{15}\text{N}$ Isotopic Method to Indicate Anthropogenic Eutrophication in Aquatic Ecosystems. J. Environ. Qual. 33, 124–132.
- Como, S., Magni, P., Van Der Velde, G., Blok, F.S., Van De Steeg, M.F.M., 2012. Spatial variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of primary consumers in a coastal

- lagoon. Estuar. Coast. Shelf Sci. 115, 300–308.
doi:10.1016/j.ecss.2012.07.032
- Cook, P.L.M., Evrard, V., Woodland, R.J., 2015. Factors controlling nitrogen fixation in temperate seagrass beds. Mar. Ecol. Prog. Ser. 525, 41–51.
doi:10.3354/meps11247
- Cornelisen, C.D., Wing, S.R., Clark, K.L., Bowman, M.H., Frew, R.D., Hurd, C.L., 2007. Patterns in the d13C and d15N signature of *Ulva pertusa*: interaction between physical gradients and nutrient source pools. Limnol. Oceanogr. 52, 820–832. doi:10.4319/lo.2007.52.2.0820
- Daesslé, L., Rendón-Márquez, G., Camacho-Ibar, V., Gutiérrez-Galindo, E., Shumilin, E., Ortiz-Campos, E., 2009. Geochemistry of modern sediments from San Quintín coastal lagoon, Baja California: Implication for provenance. Rev. Mex. Ciencias Geológicas 26, 117–132.
- Dähnke, K., Thamdrup, B., 2013. Nitrogen isotope dynamics and fractionation during sedimentary denitrification in Boknis Eck, Baltic Sea. Biogeosciences 10, 3079–3088. doi:10.5194/bg-10-3079-2013
- Delgadillo-Hinojosa, F., Camacho-Ibar, V., Huerta-Díaz, M. a., Torres-Delgado, V., Pérez-Brunius, P., Lares, L., Marinone, S.G., Segovia, J. a., Peña-Manjarrez, J.L., García-Mendoza, E., Castro, R., 2015. Seasonal behavior of dissolved cadmium and Cd/PO₄ ratio in Todos Santos Bay: A retention site of upwelled waters in the Baja California peninsula, Mexico. Mar. Chem. 168, 37–48.
doi:10.1016/j.marchem.2014.10.010
- Delgado-González, O., Jiménez, J.A., Fermán-Almada, J.L., Marván-Gargollo, F., Mejía-Trejo, A., García-Esquivel, Z., 2010. La profundidad e hidrodinámica

- como herramientas para la selección de espacios acuícolas en la zona costera. *Ciencias Mar.* 36, 249–265.
- Dethier, M.N., Sosik, E., Galloway, A.W.E., Duggins, D.O., Simenstad, C.A., 2013. Addressing assumptions: variation in stable isotopes and fatty acids of marine macrophytes can confound conclusions of food web studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 478, 1–14. doi:10.3354/meps10310
- Duarte, C., 1990. Seagrass nutrient content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 201–207. doi:10.3354/meps067201
- Duarte, C.M., Dennison, W.C., Orth, R.J.W., Carruthers, T.J.B., 2008. The charisma of coastal ecosystems: Addressing the imbalance. *Estuaries and Coasts* 31, 233–238. doi:10.1007/s12237-008-9038-7
- Dudley, B., Barr, N., Shima, J., 2010. Influence of light intensity and nutrient source on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures in *Ulva pertusa*. *Aquat. Biol.* 9, 85–93. doi:10.3354/ab00241
- Dugdale, R., Goering, J., 1967. UPTAKE OF NEW AND REGENERATED FORMS OF NITROGEN IN PRIMARY PRODUCTION. *Limnol. Oceanogr.* 12, 196–206.
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B., Smith, J.E., 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 10, 1135–1142. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x
- Emery, K.A., Wilkinson, G.M., Camacho-Ibar, V.F., Pace, M.L., McGlathery, K.J., Sandoval-Gil, J.M., Hernández-López, J., 2016. Resource Use of an

- Aquacultured Oyster (*Crassostrea gigas*) in the Reverse Estuary Bahía San Quintín, Baja California, México. *Estuaries and Coasts* 39, 866–874. doi:10.1007/s12237-015-0021-9
- Evans, R.D., 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends Plant Sci.* 6, 121–126. doi:10.1016/S1360-1385(01)01889-1
- Farnelid, H., Andersson, A.F., Bertilsson, S., Al-Soud, W.A., Hansen, L.H., Sørensen, S., Steward, G.F., Hagström, Å., Riemann, L., 2011. Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0019223
- Filgueira, R., Castro, B.G., 2011. Study of the trophic web of San Simón Bay (Ría de Vigo) by using stable isotopes. *Cont. Shelf Res.* 31, 476–487. doi:10.1016/j.csr.2010.10.010
- Foster, R. a, Kuypers, M.M.M., Vagner, T., Paerl, R.W., Musat, N., Zehr, J.P., 2011. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *ISME J.* 5, 1484–1493. doi:10.1038/ismej.2011.26
- Fourqurean, J., Escorcia, S., Anderson, W., Zieman, J., 2005. Spatial and seasonal variability in elemental content, $\delta^{13}\text{C}$, and $\delta^{15}\text{N}$ of *Thalassia testudinum* from South Florida and its implications for ecosystem studies. *Estuaries* 28, 447–461.
- Fourqurean, J.W., Duarte, C.M., Kennedy, H., Marbà, N., Holmer, M., Mateo, M.A., Apostolaki, E.T., Kendrick, G. a., Krause-Jensen, D., McGlathery, K.J., Serrano, O., 2012. Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nat. Geosci.* 5, 505–509. doi:10.1038/ngeo1477

- Fourqurean, J.W., Marbà, N., Duarte, C.M., Diaz-Almela, E., Ruiz-Halpern, S., 2007. Spatial and temporal variation in the elemental and stable isotopic content of the seagrasses *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Illes Balears, Spain. *Mar. Biol.* 151, 219–232. doi:10.1007/s00227-006-0473-3
- Fourqurean, J.W., Moore, T.O., Fry, B., Hollibaugh, J.T., 1997. Spatial and temporal variation in C:N:P ratios, $\delta^{15}\text{N}$, and $\delta^{13}\text{C}$ of eelgrass *Zostera marina* as indicators of ecosystem processes, Tomales Bay, California, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157, 147–157. doi:10.3354/meps157147
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M., 2013. The global nitrogen cycle in the twenty- first century. *Phil Trans R Soc B* 368, 1–13. doi:http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0164
- Frankovich, T.A., Fourqurean, J.W., 1997. Seagrass epiphyte loads along a nutrient availability gradient, Florida Bay, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159, 37–50. doi:10.3354/meps159037
- Fulweiler, R.W., Brown, S.M., Nixon, S.W., Jenkins, B.D., 2013. Evidence and a conceptual model for the co-occurrence of nitrogen fixation and denitrification in heterotrophic marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 482, 57–68. doi:10.3354/meps10240
- Fulweiler, R.W., Nixon, S.W., Buckley, B. a, Granger, S.L., 2007. Reversal of the net dinitrogen gas flux in coastal marine sediments. *Nature* 448, 180–2. doi:10.1038/nature05963

- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vorosmarty, C.J., 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0
- Goering, J.J., Parker, P.L., 1972. Nitrogen fixation by epiphytes on sea grasses. *Limnol. Ocean.* 17, 320–323.
- Gracia-Escobar, M.F., Millán-Núñez, R., González-Silvera, A., Santamaría-del-Ángel, E., Camacho-ibar, V.F., Trees, C.C., 2014. Changes in the abundance and composition of phytoplankton in a coastal lagoon during neap-spring tide conditions. *Open J. Mar. Sci.* 3, 80–100. doi:10.4236/ojms.2014.42010
- Grice, A., Loneragan, N., Dennison, W., 1996. Light intensity and the interactions between physiology, morphology and stable isotope ratios in five species of seagrass. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 195, 91–110. doi:10.1016/0022-0981(95)00096-8
- Gruber, N., 2008. The Marine Nitrogen Cycle. *Nitrogen Mar. Environ.* 1–50. doi:10.1016/B978-0-12-372522-6.00001-3
- Ha, S., Min, W.-K., Kim, D.-S., Shin, K.-H., 2014. Trophic importance of meiofauna to polychaetes in a seagrass (*Zostera marina*) bed as traced by stable isotopes. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 94, 121–127. doi:10.1017/S0025315413001148
- Hamisi, M.I., Lyimo, T.J., Muruke, M.H.S., Bergman, B., 2009. Nitrogen fixation by epiphytic and epibenthic diazotrophs associated with seagrass meadows along the Tanzanian coast, Western Indian Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 57,

- Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C., 1968. The acetylene-ethylene assay for n_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185–207.
- Haroon, A.M., Szaniawska, A., Normant, M., Janas, U., 2000. The biochemical composition of *Enteromorpha* spp. from the Gulf of Gdansk coast on the southern Baltic Sea. *Oceanologia* 42, 19–28.
- Hernández-Ayón, J.M., Camacho-Ibar, V.F., Mejía-Trejo, A., Cabello-Pasini, A., 2007. Variabilidad del CO₂ total durante eventos de surgencia en Bahía San Quintín, Baja California, México, in: Hernandez de la Torre, B., Gaxiola-Castro, G. (Eds.), *Carbono En Ecosistemas Acuáticos de México*. Instituto Nacional de Ecología, pp. 187–200.
- Hernández-Ayón, J.M., Galindo-Bect, M.S., Camacho-Ibar, V., García-Esquivel, Z., González-Gómez, M.A., Ley-Lou, F., 2004. Dinámica de los nutrientes en el brazo oeste de Bahía San Quintín, Baja California, México, durante y después de El Niño 1997/1998. *Ciencias Mar.* 30, 129–142. doi:10.7773/cm.v30i11.115
- Hernández-Sánchez, O.G., 2014. Identificación de las fuentes de nitrógeno para pastos marinos y macroalgas en bahía de San Quintín bajo condiciones de surgencias y no surgencia mediante análisis de isótopos estables de nitrógeno. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Hessing-Lewis, M.L., Hacker, S.D., 2013. Upwelling-influence, macroalgal blooms, and seagrass production; temporal trends from latitudinal and local scales in northeast Pacific estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 58, 1103–1112.

doi:10.4319/lo.2013.58.3.1103

Holmquist, J.G., 1997. Disturbance and gap formation in a marine benthic mosaic:

Influence of shifting macroalgal patches on seagrass structure and mobile invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 121–130. doi:10.3354/meps158121

Hondula, K., Pace, M., 2014. Macroalgal support of cultured hard clams in a low

nitrogen coastal lagoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 498, 187–201. doi:10.3354/meps10644

Howarth, R., Marino, R., Cole, J., 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine,

and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnol. Oceanogr.* 33, 688–701.

Howarth, R.W., Marino, R., 2006. Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication

in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. *Limnol. Oceanogr.* 51, 364–376. doi:10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0364

Humphries, A.T., Ayvazian, S.G., Carey, J.C., Hancock, B.T., Grabbert, S., Cobb,

D., Strobel, C.J., Fulweiler, R.W., 2016. Directly measured denitrification reveals oyster aquaculture and restored oyster reefs remove nitrogen at comparable high rates. *Front. Mar. Sci.* 3, 1–10. doi:10.3389/fmars.2016.00074

Huntington, B.E., Boyer, K.E., 2008. Evaluating Patterns of Nitrogen Supply Using

Macroalgal Tissue Content and Stable Isotopic Signatures in Tomales Bay, CA. *Environ. Bioindic.* 3, 180–192. doi:10.1080/15555270802537510

Ibarra-Obando, S., 2007. El papel de *Zostera Marina* en el ciclo del carbono en

Bahía San Quintín , Baja California, in: Hernandez de la Torre, B., Gaxiola-Castro, G. (Eds.), *Carbono En Aguas Costeras Lacustres*. Instituto Nacional

- de Ecología, pp. 201–214.
- Ibarra-Obando, S., Smith, S., Poumian-Tapia, M., Camacho-Ibar, V., Carriquiry, J., Montes-Hugo, M., 2004. Benthic metabolism in San Quintin Bay, Baja California, Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 283, 99–112. doi:10.3354/meps283099
- Jaschinski, S., Brepohl, D.C., Sommer, U., 2008. Carbon sources and trophic structure in an eelgrass *Zostera marina* bed, based on stable isotope and fatty acid analyses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 358, 103–114. doi:10.3354/meps07327
- Jeong, S.J., Suh, H.L., Kang, C.K., 2012. Trophic diversity in amphipods within a temperate eelgrass ecosystem as determined by gut contents and C and N isotope analysis. *Mar. Biol.* 159, 1943–1954. doi:10.1007/s00227-012-1981-y
- Jones, K., 1974. Nitrogen Fixation in a Salt Marsh. *J. Ecol.* 62, 553–565.
- Jorgensen, P., Ibarra-Obando, S., Carriquiry, J., 2007. Top-down and bottom-up stabilizing mechanisms in eelgrass meadows differentially affected by coastal upwelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333, 81–93. doi:10.3354/meps333081
- Jorgensen, P., Ibarra-Obando, S.E., Carriquiry, J.D., 2009. Management of natural *Ulva* spp. blooms in San Quintin Bay, Baja California: Is it justified? *J. Appl. Phycol.* 22, 549–558. doi:10.1007/s10811-009-9491-0
- Kaldy, J.E., Brown, C. a., Andersen, C.P., 2013. In situ ¹³C tracer experiments elucidate carbon translocation rates and allocation patterns in eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 487, 27–39. doi:10.3354/meps10354
- Kanaya, G., Takagi, S., Nobata, E., Kikuchi, E., 2007. Spatial dietary shift of macrozoobenthos in a brackish lagoon revealed by carbon and nitrogen stable isotope ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 345, 117–127. doi:10.3354/meps07025

- Kellogg, M.L., Smyth, A.R., Luckenbach, M.W., Carmichael, R.H., Brown, B.L., Cornwell, J.C., Piehler, M.F., Owens, M.S., Dalrymple, D.J., Higgins, C.B., 2014. Use of oysters to mitigate eutrophication in coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 151, 156–168. doi:10.1016/j.ecss.2014.09.025
- Kennedy, H., Beggins, J., Duarte, C.M., Fourqurean, J.W., Holmer, M., Marbá, N., Middelburg, J.J., 2010. Seagrass sediments as a global carbon sink: Isotopic constraints. *Global Biogeochem. Cycles* 24, 1–8. doi:10.1029/2010GB003848
- Khairy, H.M., El-Shafay, S.M., 2013. Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia* 55, 435–452. doi:10.5697/oc.55-2.435
- Kharlamenko, V.I., Kiyashko, S.I., Imbs, A.B., Vyshkvartzev, D.I., 2001. Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220, 103–117. doi:10.3354/meps220103
- Kim, M., Lee, S.-M.S.S., Kim, H.-J., Yoon, S.-H., Shin, K.-H., 2014. Carbon stable isotope ratios of new leaves of *Zostera marina* in the mid-latitude region: Implications of seasonal variation in productivity. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 461, 286–296. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2014.08.015
- Kim, Y., Kim, J., Kim, S., Kim, J., Park, S., Lee, K., 2012. Growth dynamics of the seagrass, *Zostera marina* in Jindong Bay on the southern coast of Korea. *Algae* 27, 215–224. doi:http://dx.doi.org/10.4490/algae.2012.27.3.215
- Knapp, A.N., 2012. The sensitivity of marine N₂ fixation to dissolved inorganic nitrogen. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00374
- Kraemer, G.P., Alberte, R.S., 1993. Age-related patterns of metabolism and

- biomass in subterranean tissues of *Zostera marina* (eelgrass). Mar. Ecol. Prog. Ser. 95, 193–203. doi:10.3354/meps095193
- Kraemer, G.P., Mazzella, L., 1999. Nitrogen acquisition, storage, and use by the co-occurring Mediterranean seagrasses *Cymodocea nodosa* and *Zostera noltii*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 183, 95–102. doi:10.3354/meps183095
- Kroopnick, P., 1985. The distribution of C-13 of SIGMA-CO₂ in the world oceans. Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap. 32, 57–84. doi:10.1016/0198-0149(85)90017-2
- Lefebvre, S., Marín Leal, J.C., Dubois, S., Orvain, F., Blin, J.-L., Bataillé, M.-P., Ourry, A., Galois, R., 2009. Seasonal dynamics of trophic relationships among co-occurring suspension-feeders in two shellfish culture dominated ecosystems. Estuar. Coast. Shelf Sci. 82, 415–425. doi:10.1016/j.ecss.2009.02.002
- Lemons, G., Lewison, R., Komoroske, L., Gaos, A., Lai, C.T., Dutton, P., Eguchi, T., LeRoux, R., Seminoff, J. a., 2011. Trophic ecology of green sea turtles in a highly urbanized bay: Insights from stable isotopes and mixing models. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 405, 25–32. doi:10.1016/j.jembe.2011.05.012
- Liu, K.-K., Kaplan, I.R., 1989. The eastern tropical Pacific as a source of ¹⁵N-enriched nitrate in seawater off southern California. Limnol. Oceanogr. 34, 820–830. doi:10.4319/lo.1989.34.5.0820
- Maberly, S.C., Raven, J. a, Johnston, a M., 1992. Discrimination between super(12)C and super(13)C by marine plants. Oecologia 91, 481–492.
- Magni, P., Rajagopal, S., van der Velde, G., Fenzi, G., Kassenberg, J., Vizzini, S., Mazzola, A., Giordani, G., 2008. Sediment features, macrozoobenthic

- assemblages and trophic relationships ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis) following a dystrophic event with anoxia and sulphide development in the Santa Giusta lagoon (western Sardinia, Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 57, 125–136. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.10.015
- Marchais, V., Schaal, G., Grall, J., Lorrain, A., Nerot, C., Richard, P., Chauvaud, L., 2013. Spatial Variability of Stable Isotope Ratios in Oysters (*Crassostrea gigas*) and Primary Producers Along an Estuarine Gradient (Bay of Brest, France). *Estuaries and Coasts* 36, 808–819. doi:10.1007/s12237-012-9584-x
- Marino, R., Chan, F., Howarth, R.W., Pace, M., Likens, G.E., 2002. Ecological and biogeochemical interactions constrain planktonic nitrogen fixation in estuaries. *Ecosystems* 5, 719–725. doi:10.1007/s10021-002-0176-7
- Mazarrasa, I., Marbà, N., Lovelock, C.E., Serrano, O., Lavery, P.S., Fourqurean, J.W., Kennedy, H., Mateo, M.A., Krause-Jensen, D., Steven, A.D.L., Duarte, C.M., 2015. Seagrass meadows as a globally significant carbonate reservoir. *Biogeosciences* 12, 4993–5003. doi:10.5194/bg-12-4993-2015
- McClelland, J.W., Valiela, I., 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnol. Oceanogr.* doi:10.4319/lo.1998.43.4.0577
- McClelland, J.W., Valiela, I., Michener, R.H., 1997. Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: A record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnol.* 42, 930–937. doi:10.4319/lo.1997.42.5.0930
- McGlathery, K., Risgard-Petersen, N., Bondo-Christensen, P., 1998. Temporal and spatial variation in nitrogen fixation activity in the eelgrass *Zostera marina* rhizosphere. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168, 245–258. doi:10.3354/meps168245
- McGlathery, K.J., 2008. Nitrogen cycling in seagrass meadows, in: *Nitrogen*

- Cycling in the Marine Environment. pp. 1037–1071.
- McRoy, C.P., Goering, J.J., Chaney, B., 1973. Nitrogen fixation associated with seagrasses. *Limnol. Oceanogr.* 18, 998–1002. doi:10.4319/lo.1973.18.6.0998
- Melaku Canu, D., Aveytua-Alcázar, L., Camacho-Ibar, V.F., Querin, S., Solidoro, C., 2016. Hydrodynamic properties of San Quintin Bay, Baja California: Merging models and observations. *Mar. Pollut. Bull.* 108, 203–214. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.030
- Mittermayr, A., Fox, S.E., Sommer, U., 2014. Temporal variation in stable isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{34}\text{S}$) of a temperate *Zostera marina* food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 505, 95–105. doi:10.3354/meps10797
- Möbius, J., 2013. Isotope fractionation during nitrogen remineralization (ammonification): Implications for nitrogen isotope biogeochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 105, 422–432. doi:10.1016/j.gca.2012.11.048
- Moisander, P.H., Beinart, R. a, Hewson, I., White, A.E., Johnson, K.S., Carlson, C. a, Montoya, J.P., Zehr, J.P., 2010. Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N_2 fixation domain. *Science* 327, 1512–4. doi:10.1126/science.1185468
- Moriarty, D.J.W., Iverson, R.L., Pollard, P.C., 1986. Exudation of organic carbon by the seagrass *Halodule wrightii* Aschers. And its effect on bacterial growth in the sediment. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 96, 115–126. doi:10.1016/0022-0981(86)90237-6
- Nagel, E., 2004. Nitrogen fixation in benthic microalgal mats: an important, internal source of “new” nitrogen to benthic communities in Florida Bay. Master’s thesis. University of Maryland. 103 pp.

- Nelson, T.A., Lee, A., 2001. A manipulative experiment demonstrates that blooms of the macroalga *Ulvaria obscura* can reduce eelgrass shoot density. *Aquat. Bot.* 71, 149–154. doi:10.1016/S0304-3770(01)00183-8
- Newell, R.I.E., Cornwell, J.C., Owens, M.S., 2002. Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on sediment nitrogen dynamics: A laboratory study. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1367–1379. doi:10.4319/lo.2002.47.5.1367
- Newell, R.I.E., Fisher, T.R., Holyoke, R.R., Cornwell, J.C., 2005. Influence of Eastern Oysters on Nitrogen and Phosphorus Regeneration in Chesapeake Bay, USA, in: Dame, R., Olenin, S. (Eds.), *The Comparative Roles of Suspension Feeders in Ecosystems*. Springer, Netherlands, pp. 93–120. doi:10.1007/s12237-009-9189-1
- Newell, S., Pritchard, K., Foster, S., Fulweiler, R., 2016. Molecular evidence for sediment nitrogen fixation in a temperate New England estuary. *PeerJ* 4, e1615. doi:10.7717/peerj.1615
- O'Donohue, M.J., Moriarty, D.J.W., Rae, I.C. Mac, 1991. Nitrogen fixation in sediments and the rhizosphere of the seagrass *Zostera capricorni*. *Microb. Ecol.* 22, 53–64. doi:10.1007/BF02540212
- Olsen, Y.S., Fox, S.E., Teichberg, M., Otter, M., Valiela, I., 2011. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ reveal differences in carbon flow through estuarine benthic food webs in response to the relative availability of macroalgae and eelgrass. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 421, 83–96. doi:10.3354/meps08900
- Orlandi, L., Bentivoglio, F., Carlino, P., Calizza, E., Rossi, D., Costantini, M.L., Rossi, L., 2014. $\delta^{15}\text{N}$ variation in *Ulva lactuca* as a proxy for anthropogenic

- nitrogen inputs in coastal areas of Gulf of Gaeta (Mediterranean Sea) Lucia. Mar. Pollut. Bull. 84, 76–82. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.05.036
- Orth, R.J., Carruthers, T.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., Fourqurean, J.W., Heck Jr, K.L., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., SUZANNE OLYARNIK, FREDERICK T. SHORT, MICHELLE WAYCOTT, S.L.W., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., W. JUDSON KENWORTHY, SUZANNE OLYARNIK, FREDERICK T. SHORT, MICHELLE WAYCOTT, S.L.W., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. Bioscience 56, 987–996. doi:10.1641/0006-3568(2006)56[987:AGCFSE]2.0.CO;2
- Ouisse, V., Riera, P., Migné, A., Leroux, C., Davoult, D., 2012. Food web analysis in intertidal *Zostera marina* and *Zostera noltii* communities in winter and summer. Mar. Biol. 159, 165–175. doi:10.1007/s00227-011-1796-2
- Owens, N.J.P., 1988. Natural Variations in ^{15}N in the Marine Environment. Adv. Mar. Biol. 24, 389–451. doi:10.1016/S0065-2881(08)60077-2
- Papadimitriou, S., Kennedy, H., Kennedy, D.P., Borum, J., 2005. Seasonal and spatial variation in the organic carbon and nitrogen concentration and their stable isotopic composition in *Zostera marina* (Denmark). Limnol. Oceanogr. 50, 1084–1095. doi:10.4319/lo.2005.50.4.1084
- Patriquin, D., Knowles, R., 1972. Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperms. Mar. Biol. 16, 49–58. doi:10.1007/BF00347847
- Pedersen, M.F., Borum, J., 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and

- nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142, 261–272. doi:10.3354/meps142261
- Pedersen, M.F., Borum, J., 1993. An annual nitrogen budget for seagrass *Zostera marina* population. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 101, 169–177. doi:10.3354/meps101169
- Penhale, P., Jr, W.S., 1977. Excretion of dissolved organic carbon by eelgrass (*Zostera marina*) and its epiphytes. *Limnol. Oceanogr.* 22, 400–407.
- Pirc, H., Wollenweber, B., 1988. Seasonal Changes in Nitrogen, Free Amino Acids and C/N Ratio in Mediterranean Seagrasses. *Mar. Ecol.* 9, 167–179. doi:10.1111/j.1439-0485.1988.tb00206.x
- Poumian-Tapia, M., Ibarra-Obando, S.E., 1999. Demography and biomass of the seagrass *Zostera marina* in a mexican coastal lagoon. *Estuaries* 22, 837. doi:10.2307/1353065
- Raven, J.A., Johnston, A.M., Kübler, J.E., Korb, R., McInroy, S.G., Handley, L.L., Scrimgeour, C.M., Walker, D.I., 2002. Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses. *Funct. Plant Biol.* 29, 335–378. doi:10.1071/PP01201
- Reynolds, L.K., Marino, R., Muth, M.F., McLenaghan, N., Hayn, M., Tyler, A.C., McGlathery, K.J., Howarth, R.W., 2015. Evidence of grazer control on nitrogen fixation by eelgrass epiphytes in a temperate coastal bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 526, 11–19. doi:10.3354/meps11234
- Ribas-Ribas, M., Hernández-Ayón, J.M., Camacho-Ibar, V.F., Cabello-Pasini, A., Mejia-Trejo, A., Durazo, R., Galindo-Bect, S., Souza, A.J., Forja, J.M., Siqueiros-Valencia, A., 2011. Effects of upwelling, tides and biological

- processes on the inorganic carbon system of a coastal lagoon in Baja California. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 95, 367–376. doi:10.1016/j.ecss.2011.09.017
- Riera, P., 1998. $\delta^{15}\text{N}$ of organic matter sources and benthic invertebrates along an estuarine gradient in Marennes-Oléron Bay (France): implications for the study of trophic structure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 166, 143–150. doi:10.3354/meps166143
- Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J., 2000. Heavy $\delta^{15}\text{N}$ in intertidal benthic algae and invertebrates in the Scheldt estuary (The Netherlands): Effect of river nitrogen inputs. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 365–372. doi:10.1006/ecss.2000.0684
- Risgaard-Petersen, N., Dalsgaard, T., Rysgaard, S., Christensen, P.B., Borum, J., McGlathery, K., Nielsen, L.P., 1998. Nitrogen Balance of a Temperate Eelgrass *Zostera Marina* Bed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 174, 281–291. doi:doi:10.3354/meps174281
- Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., Nielsen, L.P., Revsbech, N.P., 1994. Diurnal variation of denitrification and nitrification in sediments colonized by benthic microphytes. *Limnol. Oceanogr.* 39, 573–579. doi:10.4319/lo.1994.39.3.0573
- Rogers, K.M., 2003. Stable carbon and nitrogen isotope signatures indicate recovery of marine biota from sewage pollution at Moa Point, New Zealand. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 821–7. doi:10.1016/S0025-326X(03)00097-3
- Rooze, J., Meile, C., 2016. The effect of redox conditions and bioirrigation on nitrogen isotope fractionation in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 184, 227–239. doi:10.1016/j.gca.2016.04.040

- Rosenberg, G., Ramus, J., 1982. Ecological Growth Strategies in the Seaweeds *Gracilaria-Foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* Sp (Chlorophyceae) - the Rate and Timing of Growth. *Bot. Mar.* 66, 251–259. doi:10.1515/botm.1981.24.11.583
- Rossi, F., Baeta, A., Marques, J.C., 2013. Stable isotopes reveal habitat-related diet shifts in facultative deposit-feeders. *J. Sea Res.* 95, 172–179. doi:10.1016/j.seares.2014.07.004
- Ruesink, J.L., Yang, S., Trimble, A.C., 2015. Variability in Carbon Availability and Eelgrass (*Zostera marina*) Biometrics Along an Estuarine Gradient in Willapa Bay, WA, USA. *Estuaries and Coasts*. doi:10.1007/s12237-014-9933-z
- Russell, D.G., Warry, F.Y., Cook, P.L.M., 2016. The balance between nitrogen fixation and denitrification on vegetated and non-vegetated intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* doi:10.1002/lno.10353
- Sandoval-Gil, J., Alexandre, A., Santos, R., Camacho-Ibar, V.F., 2016. Nitrogen Uptake and Internal Recycling in *Zostera marina* Exposed to Oyster Farming: Eelgrass Potential as a Natural Biofilter. *Estuaries and Coasts*. doi:10.1007/s12237-016-0102-4
- Sandoval-Gil, J.M., Camacho-Ibar, V.F., Ávila-López, M. del C., Hernández-López, J., Zertuche-González, J.A., Cabello-Pasini, A., 2015. Dissolved inorganic nitrogen uptake kinetics and $\delta^{15}\text{N}$ of *Zostera marina* L. (eelgrass) in a coastal lagoon with oyster aquaculture and upwelling influence. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 472, 1–13. doi:10.1016/j.jembe.2015.06.018
- Santos, G.M., Ferguson, J., Acaylar, K., Johnson, K.R., Griffin, S., Druffel, E., 2011. $\Delta^{14}\text{C}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of seawater DIC as tracers of coastal upwelling: a 5-

- year time series from Southern California. *Radiocarbon* 53, 669–677.
doi:http://dx.doi.org/10.2458/azu_js_rc.53.13066
- Sarmiento, J., Gruber, N., 2006. *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press.
- Schubert, P.R., Karez, R., Reusch, T.B.H., Dierking, J., 2013. Isotopic signatures of eelgrass (*Zostera marina* L.) as bioindicator of anthropogenic nutrient input in the western Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 72, 64–70.
doi:10.1016/j.marpolbul.2013.04.029
- Severin, I., Stal, L.J., 2008. Light dependency of nitrogen fixation in a coastal cyanobacterial mat. *ISME J.* 2, 1077–88. doi:10.1038/ismej.2008.63
- Sharp, Z., 2007. *Principles of Stable Isotope Geochemistry*, 1st ed. ed. Pearson Prentice Hall, USA.
- Sheu, D.D., Lee, W.Y., Wang, C.H., Wei, C.L., Chen, C.T.A., Cherng, C., Huang, M.H., 1996. Depth distribution of $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved ECO_2 in seawater off eastern Taiwan: effects of the Kuroshio current and its associated upwelling phenomenon. *Cont. Shelf Res.* 16, 1609–1619. doi:10.1016/0278-4343(95)00085-2
- Sigleo, A.C., Mordy, C.W., Stabeno, P., Frick, W.E., 2005. Nitrate variability along the Oregon coast: Estuarine-coastal exchange. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* doi:10.1016/j.ecss.2005.02.018
- Sigman, D.M., Granger, J., DiFiore, P.J., Lehmann, M.M., Ho, R., Cane, G., van Geen, A., 2005. Coupled nitrogen and oxygen isotope measurements of nitrate along the eastern North Pacific margin. *Global Biogeochem. Cycles* 19, 1–14. doi:10.1029/2005GB002458

- Simenstad, C.A., Wissmar, R.C., 1985. Carbon in Estuarine and Nearshore Food Webs *. *Mar. Ecol.* 22, 141–152.
- Smyth, A.R., Piehler, M.F., Grabowski, J.H., 2015. Habitat context influences nitrogen removal by restored oyster reefs. *J. Appl. Ecol.* 52, 716–725. doi:10.1111/1365-2664.12435
- Songsangjinda, P., Matsuda, O., Yamamoto, T., Rajendran, N., Maeda, H., 2000. The role of suspended oyster culture on nitrogen cycle in Hiroshima Bay. *J. Oceanogr.* 56, 223–231. doi:10.1023/A:1011143414897
- Stal, L.J., Severin, I., Bolhuis, H., 2010. Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 675, 31–45. doi:10.1007/978-1-4419-1528-3
- Stephenson, R.L., Tan, F.C., Mann, K.H., 1984. Stable carbon isotope variability in marine macrophytes and its implications for food web studies. *Mar. Biol.* 81, 223–230. doi:10.1007/BF00393216
- Steppe, T., Paerl, H., 2002. Potential N₂ fixation by sulfate-reducing bacteria in a marine intertidal microbial mat. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 1–12. doi:10.3354/ame028001
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *A Pract. Handb. seawater Anal.* 167, 185. doi:10.1002/iroh.19700550118
- Swart, P.K., Evans, S., Capo, T., Altabet, M.A., 2014. The fractionation of nitrogen and oxygen isotopes in macroalgae during the assimilation of nitrate. *Biogeosciences Discuss.* 11, 6909–6943. doi:10.5194/bgd-11-6909-2014
- Tanaka, Y., Miyajima, T., Yamada, K., Hori, M., Hasegawa, N., Umezawa, Y.,

- Koike, I., 2008. Specific growth rate as a determinant of the carbon isotope composition of the temperate seagrass *Zostera marina*. *Aquat. Bot.* 89, 331–336. doi:10.1016/j.aquabot.2008.04.002
- Teichberg, M., Heffner, L.R., Fox, S., Valiela, I., 2007. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: Responses to long and short-term N supply. *Mar. Biol.* 151, 1249–1259. doi:10.1007/s00227-006-0561-4
- Thayer, W., Parker, P.L., Lacroix, M.W., Fry, B., 1978. The Stable Carbon Isotope Ratio of Some Components of an Eelgrass, *Zostera marina*, Bed*. *Oecologia* 12, 1–12.
- Touchette, B.W., Burkholder, J.M., 2002. Seasonal variations in carbon and nitrogen constituents in eelgrass (*Zostera marina* L.) as influenced by increased temperature and water-column nitrate. *Bot. Mar.* 45, 23–34. doi:10.1515/BOT.2002.004
- Udy, J.W., Dennison, W.C., 1997. Growth and physiological responses of three seagrass species to elevated sediment nutrients in Moreton Bay, Australia. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 217, 253–277. doi:10.1016/S0022-0981(97)00060-9
- Valiela, I., Owens, C., Elmstrom, E., Lloret, J., 2016. Eutrophication of Cape Cod estuaries : Effect of decadal changes in global-driven atmospheric and local-scale wastewater nutrient loads. *Mar. Pollut. Bull.* 10, 309–315. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.06.047
- Vermaat, J.E., Verhagen, F.C.A., 1996. Seasonal variation in the intertidal seagrass *Zostera noltii* Hornem.: coupling demographic and physiological patterns. *Aquat. Bot.* 52, 259–281. doi:10.1016/0304-3770(95)00510-2

- Villares, R., Carballeira, a., 2003. Seasonal variation in the concentrations of nutrients in two green macroalgae and nutrient levels in sediments in the R??as Baixas (NW Spain). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 58, 887–900. doi:10.1016/j.ecss.2003.07.004
- Vizzini, S., Mazzola, A., 2003. Seasonal variations in the stable carbon and nitrogen isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of primary producers and consumers in a western Mediterranean coastal. *Mar. Biol.* 1009–1018. doi:10.1007/s00227-003-1027-6
- Vizzini, S., Mazzola, a., 2008. The fate of organic matter sources in coastal environments: A comparison of three Mediterranean lagoons. *Hydrobiologia* 611, 67–79. doi:10.1007/s10750-008-9458-1
- Vizzini, S., Sarà, G., Mateo, M. a., Mazzola, A., 2003. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ variability in *Posidonia oceanica* associated with seasonality and plant fraction. *Aquat. Bot.* 76, 195–202. doi:10.1016/S0304-3770(03)00052-4
- Ward, D., Morton, A., Tibbitts, T., 2003. Long-term change in eelgrass distribution at Bahía San Quintín Baja California, Mexico, using satellite imagery. *Estuaries* 26, 1529–1539. doi:10.1007/BF02803661
- Ward, D.H., Tibbitts, T.L., Morton, A., Carrera-González, E., Kempka, R., 2004. Uso de videografía multiespectral digital para evaluar la distribución del pasto marino en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Mar.* 30, 47–60.
- Watanabe, K., Kuwae, T., 2015. Radiocarbon isotopic evidence for assimilation of atmospheric CO_2 by the seagrass *Zostera marina*. *Biogeosciences Discuss.* 12, 7599–7611. doi:10.5194/bgd-12-7599-2015

- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106
- Welsh, D.T., 2000. Nitrogen fixation in seagrass meadows: Regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecol. Lett.* 3, 58–71. doi:10.1046/j.1461-0248.2000.00111.x
- Welsh, D.T., Bourgues, S., Wit, R., Herbert, R.A., 1996a. Seasonal variations in nitrogen-fixation (acetylene reduction) and sulphate-reduction rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*: nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Mar. Biol.* 619–628.
- Welsh, D.T., Wellsbury, P., Bourgues, S., Wit, R., Herbert, R.A., 1996b. Relationship between porewater organic carbon content, sulphate reduction and nitrogen fixation (acetylene reduction) in the rhizosphere of *Zostera noltii*. *Hydrobiologia* 329, 175–183. doi:10.1007/BF00034556
- Yokoyama, H., Ishihi, Y., 2010. Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm - potential role in integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 310, 74–83. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.10.018
- Zehr, J.P., Mellon, M.T., Zani, S., York, N., 1998. New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes 64, 3444–3450.
- Zehr, J.P., Paerl, H.W., 2008. Molecular Ecological Aspects of Nitrogen Fixation in

the Marine Environment, in: *Microbial Ecology of the Oceans: Second Edition*.
John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 481–525.
doi:10.1002/9780470281840.ch13

Zertuche-González, J.A., Camacho-Ibar, V.F., Pacheco-Ruíz, I., Cabello-Pasini, A.,
Galindo-Bect, L.A., Guzmán-Calderón, J.M., Macias-Carranza, V., Espinoza-
Avalos, J., 2009. The role of *Ulva* spp. as a temporary nutrient sink in a
coastal lagoon with oyster cultivation and upwelling influence. *J. Appl. Phycol.*
21, 729–736. doi:10.1007/s10811-009-9408-y

Anexo I

Pair-wise test for %C for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
F-13,M	1.354	0.244	1.413	0.237	6.016	0.004	0.930	0.404	4.745	0.009	2.427	0.075						
F-13,My	3.060	0.036	4.809	0.009	13.068	0.000	1.186	0.301	10.515	0.001	5.306	0.006						
F-13,Jn	2.271	0.086	5.133	0.007	1.872	0.136	0.785	0.466	4.029	0.016	0.924	0.405						
F-13,Au	0.416	0.702	1.693	0.171	0.159	0.878	0.110	0.916	3.492	0.026	0.135	0.903						
F-13,O	2.231	0.091	1.401	0.230	0.077	0.941	0.323	0.767	2.045	0.104	1.861	0.131						
F-13,D	2.699	0.057	2.697	0.055	2.467	0.070	0.390	0.716	2.442	0.074	1.001	0.375						
F-13,F-14	0.061	0.952	4.530	0.009	1.691	0.162	2.380	0.076	3.891	0.018	2.805	0.053						
M,My	3.594	0.022	2.860	0.043	11.668	0.001	0.079	0.944	3.305	0.030	1.446	0.232	1.117	0.331	1.449	0.224	2.094	0.100
M,Jn	1.746	0.159	1.939	0.126	0.746	0.497	2.420	0.072	2.736	0.054	1.796	0.147	1.615	0.179	0.285	0.796	0.038	0.971
M,Au	3.272	0.028	0.302	0.771	3.833	0.018	1.473	0.217	1.791	0.149	2.669	0.055	2.411	0.075	3.927	0.019	1.335	0.252
M,O	2.057	0.106	0.138	0.894	1.966	0.121	1.595	0.192	2.521	0.063	1.750	0.159	0.208	0.850	4.379	0.014	0.833	0.457
M,D	3.757	0.018	0.381	0.716	0.073	0.944	0.940	0.401	1.797	0.145	2.013	0.115	1.348	0.255	9.387	0.001	0.530	0.620

M,F-14	4.757	0.008	4.901	0.008	3.031	0.041	4.310	0.013	7.078	0.002	4.298	0.011	4.748	0.010	8.580	0.001	1.444	0.226
My,Jn	0.341	0.752	2.051	0.110	2.634	0.055	4.995	0.007	29.460	0.000	4.443	0.012	2.660	0.055	0.988	0.384	2.633	0.057
My,Au	6.223	0.003	4.092	0.014	10.787	0.001	2.623	0.060	7.101	0.002	6.705	0.003	3.137	0.034	4.382	0.012	5.641	0.004
My,O	1.652	0.174	2.444	0.073	7.188	0.002	2.436	0.067	6.687	0.002	5.362	0.005	0.977	0.384	4.703	0.011	11.311	0.001
My,D	1.193	0.298	3.477	0.025	6.880	0.003	1.997	0.123	5.144	0.007	5.273	0.007	2.590	0.063	7.235	0.002	6.629	0.003
My,F-14	7.170	0.001	9.286	0.001	6.587	0.003	7.841	0.001	10.168	0.001	7.315	0.002	5.450	0.006	7.893	0.002	7.463	0.002
Jn,Au	2.495	0.066	4.914	0.006	1.873	0.129	1.458	0.218	0.627	0.567	1.139	0.321	1.435	0.222	2.435	0.071	1.647	0.179
Jn,O	1.039	0.361	1.452	0.223	1.619	0.182	0.693	0.525	0.847	0.440	0.542	0.610	0.784	0.480	2.024	0.115	1.147	0.309
Jn,D	0.794	0.469	3.863	0.017	0.717	0.510	3.338	0.029	0.031	0.979	0.116	0.919	0.897	0.414	2.620	0.057	0.727	0.511
Jn,F-14	2.838	0.047	33.092	0.000	2.575	0.062	3.996	0.019	6.601	0.003	3.598	0.023	3.501	0.027	3.743	0.018	1.844	0.141
Au,O	5.052	0.008	0.428	0.689	0.162	0.879	0.360	0.736	1.056	0.355	8.128	0.002	1.683	0.166	0.905	0.408	1.162	0.312
Au,D	9.889	0.000	1.289	0.269	2.272	0.086	1.079	0.340	0.369	0.726	1.591	0.185	2.003	0.114	0.617	0.580	1.441	0.224
Au,F-14	3.244	0.032	10.172	0.000	1.567	0.193	4.496	0.009	6.271	0.003	3.614	0.023	0.177	0.874	0.935	0.396	0.013	0.991
O,D	0.866	0.445	0.153	0.887	1.543	0.195	1.219	0.294	0.533	0.627	1.108	0.340	0.479	0.657	0.667	0.544	0.788	0.466
O,F-14	6.206	0.004	4.292	0.013	1.504	0.210	3.177	0.035	5.199	0.007	5.002	0.007	2.368	0.078	2.619	0.061	1.616	0.181
D,F-14	11.528	0.000	13.782	0.000	2.717	0.055	6.651	0.003	5.392	0.006	4.028	0.016	11.542	0.001	3.028	0.038	1.842	0.140

Pair-wise test for %N for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)

F-13,M	1.251	0.281	1.017	0.365	6.813	0.002	0.295	0.786	2.839	0.046	1.045	0.350						
F-13,My	4.505	0.012	7.492	0.001	17.522	0.000	2.245	0.094	18.596	0.000	6.286	0.003						
F-13,Jn	2.501	0.071	8.266	0.002	4.831	0.009	1.698	0.166	4.925	0.008	3.539	0.022						
F-13,Au	3.426	0.027	8.614	0.001	10.621	0.000	0.198	0.851	3.570	0.024	10.026	0.001						
F-13,O	6.203	0.003	5.115	0.007	11.858	0.000	1.995	0.112	22.517	0.000	13.083	0.000						
F-13,D	5.792	0.005	4.206	0.011	13.509	0.000	1.218	0.294	6.935	0.003	4.397	0.011						
F-13,F-14	4.296	0.012	2.422	0.070	11.667	0.001	0.067	0.952	12.962	0.000	1.310	0.260						
M,My	5.985	0.004	5.648	0.005	20.658	0.000	4.401	0.010	4.068	0.018	1.793	0.151	2.571	0.063	5.217	0.007	4.548	0.010
M,Jn	2.157	0.097	5.764	0.004	2.510	0.072	3.143	0.038	0.453	0.674	0.628	0.572	0.838	0.450	1.933	0.127	1.367	0.241
M,Au	3.841	0.018	6.305	0.004	7.142	0.003	0.050	0.959	0.049	0.963	1.659	0.166	2.096	0.106	0.650	0.554	1.263	0.275
M,O	18.292	0.000	3.815	0.018	8.902	0.001	2.638	0.058	3.720	0.019	1.909	0.131	1.823	0.140	1.977	0.118	1.443	0.222
M,D	8.951	0.001	2.940	0.042	14.778	0.000	1.283	0.269	1.018	0.368	0.172	0.877	1.806	0.143	1.617	0.178	0.756	0.494
M,F-14	9.816	0.001	1.587	0.189	8.700	0.001	0.274	0.799	3.090	0.039	0.256	0.811	2.557	0.061	1.578	0.190	1.153	0.315
My,Jn	0.096	0.929	1.437	0.238	1.621	0.187	6.371	0.003	5.014	0.006	2.015	0.117	1.710	0.164	1.524	0.207	6.661	0.002
My,Au	1.012	0.367	0.011	0.992	8.336	0.001	2.173	0.096	4.857	0.008	0.566	0.603	1.097	0.333	3.887	0.017	8.292	0.001
My,O	1.234	0.283	1.152	0.314	0.714	0.517	0.184	0.861	1.202	0.295	0.080	0.938	0.972	0.389	3.732	0.020	4.644	0.011
My,D	1.386	0.242	2.306	0.079	10.747	0.000	0.443	0.673	4.876	0.007	3.720	0.021	1.774	0.151	14.434	0.000	12.627	0.000
My,F-14	1.314	0.257	2.351	0.081	5.533	0.006	1.543	0.202	1.653	0.170	3.186	0.035	0.449	0.671	5.236	0.007	7.788	0.002
Jn,Au	0.437	0.690	2.311	0.088	0.620	0.563	2.056	0.111	0.461	0.667	2.040	0.113	1.097	0.332	1.319	0.256	0.265	0.804
Jn,O	0.585	0.586	0.403	0.710	1.226	0.293	4.680	0.010	4.637	0.009	2.647	0.055	0.915	0.410	0.592	0.584	0.259	0.809
Jn,D	0.747	0.497	1.772	0.151	0.193	0.858	3.010	0.040	0.713	0.516	1.040	0.362	0.734	0.499	3.421	0.027	1.395	0.241

Jn,F-14	0.426	0.693	1.916	0.128	0.006	0.996	1.121	0.330	3.536	0.026	1.371	0.242	1.594	0.187	1.024	0.370	0.420	0.695
Au,O	2.348	0.076	1.279	0.275	4.169	0.016	1.890	0.129	4.495	0.011	1.087	0.346	0.077	0.945	1.086	0.335	0.489	0.659
Au,D	2.333	0.079	2.585	0.061	1.827	0.142	1.082	0.345	1.128	0.329	5.584	0.004	0.918	0.421	2.276	0.078	1.263	0.278
Au,F-14	0.096	0.930	2.479	0.066	1.835	0.143	0.217	0.832	3.614	0.023	3.384	0.027	0.897	0.426	0.654	0.557	0.184	0.863
O,D	0.557	0.611	0.947	0.391	3.620	0.024	0.486	0.661	4.478	0.013	7.803	0.002	0.499	0.643	5.387	0.006	1.372	0.243
O,F-14	4.842	0.008	1.381	0.240	2.745	0.053	1.501	0.206	0.882	0.434	3.917	0.017	0.729	0.500	0.682	0.536	0.610	0.574
D,F-14	3.369	0.027	0.665	0.535	0.695	0.527	1.014	0.370	3.147	0.034	0.795	0.471	1.994	0.117	5.804	0.004	0.965	0.391

Pair-wise test for $\delta^{13}\text{C}$ for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
F-13,M	2.077	0.105	1.982	0.118	4.573	0.010	0.406	0.707	0.568	0.603	0.870	0.428						
F-13,My	3.451	0.023	2.989	0.039	16.965	0.000	1.737	0.159	2.600	0.055	2.018	0.107						
F-13,Jn	3.654	0.023	2.319	0.084	10.849	0.001	1.748	0.153	6.301	0.004	1.110	0.325						
F-13,Au	2.419	0.072	6.563	0.002	6.210	0.003	0.510	0.631	0.678	0.536	0.058	0.956						
F-13,O	1.444	0.227	0.028	0.977	1.394	0.237	4.484	0.012	3.783	0.021	4.138	0.013						
F-13,D	1.215	0.290	2.900	0.043	32.585	0.000	2.701	0.054	1.696	0.167	1.734	0.159						
F-13,F-14	4.163	0.016	0.459	0.672	3.848	0.021	0.487	0.653	1.303	0.269	0.446	0.691						
M,My	0.610	0.577	0.446	0.674	7.426	0.002	1.862	0.136	2.186	0.091	0.560	0.606	0.008	0.993	3.178	0.035	1.686	0.166
M,Jn	2.184	0.097	0.788	0.472	7.169	0.002	2.643	0.059	5.914	0.004	0.254	0.802	1.287	0.261	1.682	0.169	0.103	0.922

M,Au	0.288	0.781	4.255	0.013	4.602	0.011	0.296	0.777	1.058	0.356	0.443	0.680	4.415	0.013	1.347	0.255	0.368	0.733
M,O	0.382	0.721	1.264	0.265	2.606	0.062	5.868	0.004	4.236	0.014	3.393	0.029	1.850	0.144	1.779	0.141	1.086	0.346
M,D	2.377	0.079	3.376	0.029	0.884	0.428	4.278	0.011	1.206	0.296	0.067	0.951	3.020	0.039	2.015	0.114	0.137	0.898
M,F-14	3.277	0.030	1.647	0.178	0.643	0.561	1.069	0.351	0.747	0.496	0.448	0.682	0.948	0.395	1.884	0.135	1.707	0.162
My,Jn	1.868	0.136	0.489	0.651	2.467	0.064	3.319	0.030	3.409	0.026	0.217	0.839	1.273	0.276	0.966	0.385	6.659	0.002
My,Au	1.048	0.358	4.152	0.014	1.796	0.148	1.106	0.340	2.643	0.059	0.836	0.458	4.395	0.011	4.805	0.010	3.802	0.018
My,O	1.005	0.372	1.725	0.166	5.343	0.006	2.358	0.078	5.126	0.006	6.643	0.003	1.798	0.144	0.793	0.481	0.232	0.827
My,D	3.308	0.028	4.607	0.010	12.550	0.000	0.335	0.762	1.076	0.338	0.908	0.414	2.946	0.041	0.467	0.665	3.672	0.020
My,F-14	4.744	0.008	2.124	0.101	4.992	0.008	2.204	0.096	1.605	0.184	1.246	0.276	0.946	0.400	4.603	0.010	0.585	0.597
Jn,Au	2.506	0.065	2.906	0.042	0.342	0.763	2.088	0.103	5.824	0.004	0.614	0.579	3.384	0.029	2.114	0.102	1.203	0.290
Jn,O	2.423	0.072	1.772	0.149	6.138	0.002	6.104	0.002	8.439	0.001	3.417	0.026	0.051	0.962	0.332	0.759	1.655	0.169
Jn,D	3.828	0.016	3.307	0.029	8.743	0.001	4.668	0.011	4.688	0.010	0.273	0.799	0.928	0.412	0.714	0.518	0.531	0.617
Jn,F-14	4.344	0.012	2.091	0.111	5.790	0.005	1.294	0.265	5.347	0.006	0.701	0.516	0.085	0.938	2.349	0.080	2.806	0.046
Au,O	0.159	0.878	4.930	0.008	5.272	0.006	3.487	0.025	1.957	0.123	1.454	0.227	3.733	0.024	2.372	0.076	1.113	0.327
Au,D	2.502	0.066	7.577	0.002	5.081	0.007	1.715	0.162	1.879	0.128	0.544	0.617	3.090	0.036	2.924	0.042	0.459	0.669
Au,F-14	3.946	0.020	5.227	0.007	4.059	0.015	0.954	0.391	1.569	0.195	0.168	0.877	2.816	0.050	0.724	0.508	2.119	0.104
O,D	1.887	0.128	1.157	0.310	2.456	0.071	2.901	0.043	4.736	0.008	11.626	0.000	1.442	0.221	0.448	0.674	1.317	0.255
O,F-14	2.622	0.059	0.359	0.747	2.798	0.049	5.035	0.006	4.773	0.009	3.594	0.021	0.128	0.908	2.661	0.057	0.557	0.607
D,F-14	0.414	0.695	0.652	0.548	1.368	0.244	3.348	0.030	0.534	0.618	0.780	0.487	0.527	0.632	3.241	0.032	2.310	0.082

Pair-wise test for $\delta^{15}\text{N}$ for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8		E9	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
F-13,M	2.762	0.050	0.905	0.414	3.867	0.017	1.339	0.251	0.012	0.992	1.989	0.116						
F-13,My	3.207	0.032	0.064	0.953	5.382	0.006	5.342	0.005	8.224	0.002	3.226	0.031						
F-13,Jn	0.826	0.457	0.281	0.794	3.262	0.029	4.292	0.013	9.323	0.001	2.606	0.058						
F-13,Au	2.817	0.047	1.747	0.154	2.283	0.082	6.657	0.003	1.818	0.145	3.703	0.020						
F-13,O	2.336	0.077	2.754	0.052	3.310	0.028	4.258	0.015	14.600	0.000	4.185	0.014						
F-13,D	0.254	0.812	0.694	0.525	2.635	0.058	0.991	0.377	2.226	0.088	3.304	0.030						
F-13,F-14	0.835	0.461	2.914	0.047	3.694	0.022	2.887	0.045	14.091	0.000	2.299	0.083						
M,My	0.032	0.975	1.679	0.172	1.152	0.316	8.320	0.002	3.275	0.029	0.632	0.557	3.839	0.019	7.632	0.002	4.654	0.009
M,Jn	1.436	0.226	0.697	0.532	1.949	0.119	8.650	0.001	2.566	0.060	0.656	0.554	3.493	0.025	4.038	0.015	0.228	0.826
M,Au	0.157	0.882	2.075	0.103	2.942	0.045	15.499	0.000	1.483	0.211	1.096	0.333	0.634	0.557	7.356	0.002	6.780	0.003
M,O	1.390	0.236	2.494	0.064	1.129	0.323	6.503	0.003	3.814	0.018	1.742	0.161	4.209	0.016	19.519	0.000	2.967	0.041
M,D	3.416	0.028	1.138	0.320	1.113	0.321	2.640	0.056	1.437	0.230	0.633	0.564	2.076	0.109	26.403	0.000	6.238	0.003
M,F-14	3.488	0.026	3.485	0.024	0.294	0.777	4.047	0.016	3.652	0.023	0.737	0.501	1.060	0.352	6.214	0.003	3.697	0.019
My,Jn	1.587	0.189	0.486	0.656	9.825	0.001	2.187	0.091	1.779	0.152	0.252	0.815	0.799	0.469	0.495	0.649	1.544	0.190
My,Au	0.202	0.851	1.785	0.153	7.891	0.001	0.514	0.633	0.707	0.512	1.061	0.344	0.368	0.731	1.991	0.116	0.718	0.508
My,O	3.911	0.018	3.473	0.024	0.766	0.481	0.704	0.513	0.770	0.493	2.161	0.094	1.233	0.280	6.797	0.002	1.171	0.315

My,D	4.770	0.009	0.713	0.517	2.315	0.077	4.392	0.012	1.816	0.144	0.049	0.963	3.548	0.026	9.214	0.001	2.970	0.043
My,F-14	7.511	0.002	7.560	0.002	1.623	0.175	0.829	0.451	0.429	0.690	0.430	0.687	0.657	0.550	0.554	0.599	0.450	0.680
Jn,Au	1.403	0.235	1.868	0.138	2.245	0.079	3.059	0.039	0.090	0.934	0.190	0.853	0.203	0.849	0.862	0.444	1.760	0.146
Jn,O	0.866	0.436	2.738	0.051	1.940	0.117	1.128	0.318	3.410	0.030	0.874	0.429	1.889	0.138	2.843	0.046	2.003	0.116
Jn,D	0.742	0.506	0.851	0.436	0.165	0.876	3.144	0.035	0.909	0.408	0.278	0.797	3.277	0.029	3.741	0.021	2.736	0.053
Jn,F-14	0.350	0.751	3.202	0.033	1.627	0.184	0.443	0.684	2.971	0.041	0.215	0.840	0.377	0.725	0.803	0.464	1.667	0.168
Au,O	1.501	0.205	2.854	0.048	2.393	0.076	0.457	0.675	0.998	0.368	1.409	0.231	0.729	0.502	2.630	0.059	0.948	0.397
Au,D	3.670	0.023	1.073	0.348	1.119	0.321	5.431	0.006	0.413	0.702	1.366	0.248	0.217	0.837	3.961	0.016	2.772	0.050
Au,F-14	4.030	0.015	2.628	0.061	2.681	0.053	0.645	0.547	0.878	0.421	0.123	0.912	0.011	0.993	2.344	0.077	0.016	0.988
O,D	3.352	0.029	2.243	0.086	1.692	0.173	3.364	0.027	2.387	0.074	2.459	0.071	3.727	0.020	2.341	0.079	0.537	0.620
O,F-14	4.790	0.009	1.130	0.324	1.277	0.272	0.295	0.779	0.469	0.665	0.380	0.722	1.237	0.287	6.861	0.002	0.851	0.439
D,F-14	0.869	0.428	1.938	0.123	0.876	0.429	2.205	0.096	2.194	0.098	0.450	0.680	0.364	0.730	9.004	0.001	2.113	0.103

Pair-wise test for %C for Time x Location (level Location)

	F-13		M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	0.375	0.725	0.643	0.558	0.592	0.592	1.075	0.338	0.632	0.562	1.358	0.243	4.429	0.011	19.072	0.000
E1, E3	0.211	0.851	0.177	0.864	3.228	0.031	0.924	0.409	0.749	0.496	2.964	0.045	2.696	0.054	1.430	0.225
E1, E4	1.243	0.283	2.099	0.102	0.775	0.476	2.013	0.109	2.712	0.061	0.862	0.448	0.143	0.895	2.643	0.061

E1, E5	0.336	0.751	2.085	0.105	0.186	0.865	1.752	0.156	4.729	0.008	2.450	0.074	3.179	0.032	3.524	0.021
E1, E6	0.989	0.374	2.399	0.073	2.898	0.045	1.348	0.246	5.256	0.006	0.576	0.598	2.402	0.072	1.861	0.138
E2, E3	1.124	0.321	0.754	0.495	1.669	0.175	0.114	0.915	1.015	0.367	0.717	0.518	0.442	0.686	1.493	0.209
E2, E4	1.713	0.160	2.175	0.091			3.733	0.020	2.039	0.113	0.465	0.663	3.237	0.033	2.969	0.041
E2, E5	1.295	0.263	1.700	0.164	0.822	0.454	7.201	0.002	2.382	0.074	0.148	0.890	0.547	0.617	1.913	0.127
E2, E6	2.024	0.114	2.410	0.070	1.878	0.136	0.901	0.416	1.632	0.176	1.230	0.296	1.336	0.247	2.029	0.105
E3, E4	1.359	0.251	2.124	0.103	2.346	0.081	1.113	0.321	2.756	0.051	1.335	0.254	2.196	0.092	0.044	0.967
E3, E5	0.387	0.714	2.717	0.054	5.865	0.004	0.752	0.482	3.510	0.024	1.359	0.242	0.026	0.982	0.416	0.698
E3, E6	1.544	0.197	2.442	0.072	0.709	0.522	0.327	0.766	2.931	0.041	3.131	0.036	0.639	0.550	0.024	0.982
E4, E5	1.255	0.278	1.330	0.261	1.281	0.268	1.290	0.272	0.613	0.574	0.490	0.642	2.452	0.071	0.706	0.512
E4, E6	0.668	0.540	0.114	0.915	2.278	0.086	1.299	0.257	1.321	0.265	0.682	0.543	1.806	0.145	0.021	0.986
E5, E6	1.265	0.281	1.578	0.200	3.657	0.021	0.730	0.513	1.502	0.208	3.165	0.035	0.699	0.532	0.547	0.604
E1, E7			1.780	0.156	0.587	0.584	1.699	0.163	0.011	0.992	0.326	0.760	4.676	0.008	2.079	0.106
E1, E8			6.816	0.002	2.038	0.109	0.112	0.917	0.466	0.667	1.276	0.271	5.565	0.006	0.070	0.944
E1, E9			0.969	0.396	4.804	0.008	0.490	0.648	0.107	0.922	1.786	0.152	1.262	0.282	0.829	0.462
E2, E7			1.629	0.175	1.040	0.362	2.717	0.056	0.302	0.774	0.896	0.425	1.974	0.111	20.093	0.000
E2, E8			3.851	0.017	0.950	0.402	1.422	0.229	0.173	0.873	0.540	0.622	0.226	0.834	6.925	0.003
E2, E9			1.189	0.301	2.875	0.046	0.517	0.634	0.116	0.918	0.630	0.551	1.490	0.221	4.963	0.008
E7, E8			3.576	0.023	2.610	0.062	2.309	0.082	0.363	0.740	0.562	0.606	3.027	0.042	0.772	0.482

E7, E9		0.398 0.715	5.383 0.007	1.260 0.278	0.094 0.924	0.610 0.567	0.618 0.572	0.313 0.773
E8, E9		0.674 0.529	2.639 0.060	0.474 0.659	0.215 0.841	0.056 0.955	1.486 0.214	0.686 0.535

Pair-wise test for %N for Time x Location (level Location)

	F-13		M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	0.371	0.721	0.751	0.494	0.797	0.474	0.050	0.962	2.036	0.109	1.564	0.195	2.804	0.047	1.166	0.307
E1, E3	0.376	0.727	9.068	0.001	2.083	0.104	0.037	0.972	0.416	0.699	0.560	0.610	2.595	0.062	2.234	0.089
E1, E4	4.731	0.009	15.960	0.000	2.678	0.055	0.482	0.655	1.515	0.202	1.971	0.123	0.298	0.787	1.060	0.349
E1, E5	2.785	0.053	5.000	0.007	3.333	0.024	0.015	0.990	0.520	0.636	4.047	0.015	1.470	0.224	6.401	0.004
E1, E6	2.196	0.095	1.625	0.178	2.541	0.066	0.245	0.816	3.776	0.021	5.591	0.004	2.749	0.053	0.542	0.613
E2, E3	1.092	0.328	2.752	0.053	1.367	0.234	0.016	0.988	3.624	0.022	1.760	0.151	1.524	0.205	1.869	0.131
E2, E4	6.298	0.003	6.237	0.003	2.113	0.102	2.227	0.093	0.302	0.780	2.544	0.058	2.784	0.048	1.628	0.190
E2, E5	4.583	0.010	3.911	0.017	2.921	0.042	0.252	0.808	1.914	0.127	3.037	0.039	1.962	0.123	3.343	0.028
E2, E6	3.506	0.026	1.795	0.146	2.063	0.109	0.461	0.666	3.224	0.029	3.734	0.022	0.931	0.406	0.533	0.615
E3, E4	6.883	0.003	10.312	0.000	1.955	0.127	0.941	0.396	1.795	0.143	1.309	0.254	2.403	0.070	0.290	0.789
E3, E5	6.456	0.003	2.708	0.057	3.499	0.024	0.100	0.928	0.271	0.801	2.168	0.098	1.301	0.257	4.783	0.008
E3, E6	3.736	0.020	0.782	0.469	1.523	0.212	0.325	0.771	7.047	0.002	3.451	0.025	0.991	0.373	1.336	0.256
E4, E5	4.141	0.014	1.477	0.208	1.825	0.142	1.376	0.243	1.219	0.298	0.177	0.862	1.555	0.198	1.397	0.238

E4, E6	4.241	0.013	0.784	0.477	1.014	0.359	1.443	0.221	2.440	0.073	1.325	0.260	2.613	0.057	1.177	0.306
E5, E6	1.072	0.345	0.205	0.845	0.401	0.714	0.532	0.624	4.179	0.014	2.407	0.079	1.655	0.176	3.008	0.043
E1, E7			0.354	0.740	0.202	0.853	0.958	0.387	0.195	0.857	2.112	0.101	4.095	0.016	1.245	0.280
E1, E8			4.505	0.009	5.051	0.010	1.060	0.343	1.041	0.363	0.706	0.515	5.190	0.006	3.348	0.029
E1, E9			0.807	0.468	8.095	0.001	0.178	0.865	0.907	0.406	0.307	0.776	3.157	0.036	0.837	0.446
E2, E7			0.710	0.510	0.458	0.668	1.854	0.133	2.648	0.058	0.455	0.680	0.111	0.919	1.666	0.165
E2, E8			3.727	0.021	4.936	0.008	1.899	0.130	0.529	0.626	1.773	0.149	0.485	0.652	2.520	0.060
E2, E9			1.043	0.350	8.694	0.001	0.319	0.767	1.064	0.352	0.687	0.526	0.344	0.746	1.494	0.204
E7, E8			2.109	0.102	3.920	0.017	2.665	0.054	1.039	0.355	2.243	0.087	1.679	0.169	1.553	0.198
E7, E9			0.475	0.658	6.286	0.003	1.706	0.158	0.911	0.413	1.051	0.348	0.406	0.704	0.072	0.946
E8, E9			1.006	0.375	4.180	0.013	1.364	0.246	0.264	0.807	0.629	0.560	1.393	0.238	1.291	0.272

Pair-wise test for $\delta^{13}\text{C}$ for Time x Location (level Location)

	F-13		M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	9.054	0.000	0.896	0.421	0.607	0.570	1.320	0.260	5.237	0.006	0.295	0.778	2.326	0.080	3.430	0.099
E1, E3	9.519	0.001	0.444	0.679	3.198	0.031	0.651	0.555	4.214	0.014	2.180	0.090	2.683	0.057	4.801	0.095
E1, E4	1.796	0.144	0.728	0.513	2.682	0.057	1.137	0.315	0.565	0.601	4.099	0.014	0.188	0.861	3.745	0.101
E1, E5	0.469	0.661	1.610	0.192	0.005	0.996	0.902	0.409	2.209	0.091	4.070	0.015	2.087	0.099	3.044	0.102

E1, E6	0.537	0.628	0.846	0.447	1.246	0.284	2.433	0.072	0.919	0.417	4.346	0.012	2.153	0.096	1.595	0.295
E2, E3	10.847	0.000	2.089	0.103	3.834	0.020	3.401	0.027	0.620	0.566	2.605	0.062	0.963	0.388	0.574	0.605
E2, E4	0.162	0.881	2.696	0.052	3.582	0.023	0.197	0.853	4.560	0.010	5.205	0.009	4.031	0.017	0.708	0.505
E2, E5	3.554	0.024	3.476	0.026	0.492	0.647	2.995	0.040	6.379	0.003	5.465	0.006	0.515	0.632	0.639	0.599
E2, E6	3.295	0.030	1.810	0.142	2.311	0.078	1.775	0.149	3.530	0.024	6.434	0.003	0.318	0.765	1.161	0.302
E3, E4	2.194	0.088	0.524	0.629	5.754	0.005	2.815	0.051	4.079	0.016	0.903	0.423	4.898	0.010	0.252	0.903
E3, E5	0.203	0.849	1.888	0.126	2.566	0.065	0.485	0.653	5.382	0.006	0.608	0.572	0.263	0.807	1.335	0.298
E3, E6	0.056	0.957	0.656	0.542	5.533	0.005	4.495	0.010	3.524	0.031	0.438	0.686	1.195	0.291	1.773	0.310
E4, E5	1.785	0.153	1.636	0.175	2.412	0.074	2.635	0.057	1.308	0.267	0.539	0.631	2.732	0.052	1.315	0.201
E4, E6	1.791	0.151	0.438	0.678	1.823	0.135	1.818	0.140	0.514	0.639	1.022	0.359	3.653	0.024	1.720	0.200
E5, E6	0.092	0.933	0.459	0.671	1.062	0.346	4.081	0.013	0.378	0.721	0.495	0.646	0.639	0.555	0.652	0.501
E1, E7			2.226	0.092	3.245	0.030	2.702	0.054	3.231	0.029	0.499	0.648	2.998	0.037	1.490	0.212
E1, E8			1.195	0.301	0.711	0.514	0.885	0.414	2.155	0.097	1.065	0.335	3.144	0.035	0.930	0.408
E1, E9			1.682	0.170	0.382	0.718	0.655	0.549	3.274	0.030	0.761	0.485	5.729	0.005	2.589	0.061
E2, E7			4.326	0.014	4.983	0.007	2.214	0.093	0.436	0.679	1.059	0.344	1.670	0.166	0.192	0.864
E2, E8			3.163	0.033	2.360	0.076	0.120	0.911	7.952	0.001	0.932	0.400	1.957	0.131	2.220	0.094
E2, E9			1.247	0.275	1.772	0.152	1.511	0.206	2.903	0.044	0.600	0.580	5.875	0.004	0.228	0.831
E7, E8			1.701	0.166	4.312	0.012	1.435	0.223	4.290	0.013	1.643	0.175	0.544	0.620	1.047	0.358
E7, E9			3.411	0.024	4.668	0.007	4.033	0.015	1.873	0.133	1.269	0.269	3.216	0.029	0.330	0.753

E8, E9		2.721 0.052	1.279 0.278	0.577 0.589	6.721 0.002	0.250 0.819	2.215 0.092	1.882 0.129
--------	--	-------------	-------------	-------------	--------------------	-------------	-------------	-------------

Pair-wise test for $\delta^{15}\text{N}$ for Time x Location (level Location)

	F-13		M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	0.429	0.694	4.812	0.008	12.214	0.000	0.782	0.481	0.005	0.996	7.076	0.003	0.789	0.471	5.819	0.005
E1, E3	0.782	0.478	9.010	0.001	38.224	0.000	3.121	0.040	9.901	0.001	7.319	0.002	3.941	0.018	9.398	0.001
E1, E4	0.708	0.526	2.263	0.084	11.528	0.000	2.706	0.058	12.324	0.000	7.855	0.002	0.355	0.739	3.266	0.033
E1, E5	3.187	0.033	0.043	0.967	8.026	0.001	0.934	0.413	1.706	0.160	11.054	0.001	0.665	0.545	5.048	0.008
E1, E6	3.658	0.021	0.519	0.627	3.415	0.028	0.093	0.927	3.563	0.022	3.812	0.017	1.860	0.137	0.137	0.899
E2, E3	2.080	0.104	8.113	0.001	24.042	0.000	8.358	0.001	3.498	0.028	2.878	0.049	3.462	0.024	7.182	0.002
E2, E4	0.496	0.645	4.664	0.008	6.898	0.002	5.149	0.007	4.305	0.013	1.997	0.117	1.047	0.357	1.804	0.151
E2, E5	6.491	0.003	2.685	0.052	2.729	0.052	0.417	0.700	1.316	0.266	0.085	0.935	0.126	0.903	1.380	0.240
E2, E6	3.947	0.020	1.681	0.171	2.018	0.110	0.541	0.622	1.504	0.212	1.226	0.281	0.299	0.785	0.615	0.578
E3, E4	2.195	0.093	11.263	0.000	0.025	0.979	1.102	0.326	5.100	0.007	1.158	0.303	3.602	0.022	0.407	0.699
E3, E5	8.116	0.001	5.287	0.006	5.313	0.006	8.034	0.001	1.449	0.215	3.071	0.037	3.454	0.028	4.341	0.015
E3, E6	4.740	0.008	3.854	0.017	10.423	0.000	2.482	0.063	6.432	0.002	3.542	0.022	7.983	0.002	1.667	0.168
E4, E5	3.956	0.017	1.266	0.272	3.530	0.027	4.820	0.009	2.191	0.095	2.207	0.094	0.932	0.406	1.346	0.247
E4, E6	3.579	0.026	0.524	0.634	6.823	0.002	2.163	0.102	9.234	0.001	2.831	0.048	2.352	0.077	1.335	0.256

E5, E6	2.252	0.090	0.410	0.700	3.526	0.025	0.669	0.529	0.339	0.758		0.488	0.650			
E1, E7			4.063	0.017	14.212	0.000	1.980	0.121	2.204	0.092	9.402	0.001	1.202	0.289	1.635	0.184
E1, E8			2.325	0.079	11.738	0.001	1.869	0.131	7.474	0.002	21.868	0.000	7.394	0.001	3.468	0.026
E1, E9			2.788	0.050	11.038	0.000	0.228	0.822	6.565	0.002	4.141	0.015	2.490	0.063	2.299	0.085
E2, E7			0.656	0.551	5.940	0.004	3.705	0.019	1.740	0.157	1.170	0.306	1.622	0.177	0.029	0.977
E2, E8			6.319	0.003	4.123	0.016	2.051	0.107	3.394	0.026	4.267	0.013	5.358	0.005	0.115	0.915
E2, E9			4.693	0.009	1.867	0.136	1.191	0.302	2.295	0.087	0.274	0.796	2.506	0.065	1.126	0.333
E7, E8			3.684	0.020	1.083	0.337	0.294	0.784	0.766	0.478	3.075	0.042	23.431	0.000	0.068	0.948
E7, E9			2.720	0.056	3.633	0.022	2.531	0.064	0.306	0.773	1.126	0.323	2.585	0.058	0.475	0.660
E8, E9			1.314	0.258	2.254	0.085	2.295	0.087	3.574	0.022	3.074	0.036			0.779	0.483

Anexo II

Pair-wise test for %C for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
M,My	0.023	0.983	7.286	0.002	4.187	0.013	10.365	0.001	2.797	0.065	8.464	0.001	3.464	0.023		
M,Jn	1.262	0.297	3.260	0.029	3.172	0.033	12.879	0.001	7.613	0.006	2.262	0.084	2.873	0.044		
M,Au	0.903	0.433	2.391	0.075	3.891	0.017	30.363	0.000	6.371	0.008	4.284	0.011	4.568	0.011		
M,O	0.578	0.606	4.582	0.011	3.004	0.043	6.993	0.002	2.274	0.108	3.240	0.032	4.226	0.014		
M,D	0.092	0.931	1.209	0.298	2.713	0.051	5.280	0.006	0.296	0.786	0.286	0.788	3.639	0.022		
M,F-14	0.610	0.585	7.574	0.002	3.369	0.028	12.985	0.001	13.164	0.001	3.325	0.030	6.633	0.002		
My,Jn	2.103	0.098	0.487	0.652	0.347	0.741	0.370	0.733	0.833	0.457	7.438	0.002	0.940	0.401		
My,Au	2.914	0.044	0.139	0.900	0.618	0.565	0.141	0.890	1.064	0.348	2.337	0.080	0.087	0.932		
My,O	2.291	0.081	4.966	0.008	3.793	0.021	1.118	0.331	0.133	0.899	4.036	0.014	1.462	0.228		
My,D	0.727	0.506	3.682	0.021	2.796	0.047	1.240	0.283	1.236	0.283	1.583	0.186	0.077	0.939		
My,F-14	1.137	0.322	0.023	0.982	1.482	0.211	0.158	0.882	2.191	0.094	7.266	0.002	0.466	0.666		
Jn,Au	1.025	0.368	0.206	0.845	0.018	0.986	0.745	0.494	0.522	0.623	2.801	0.053	1.064	0.347	3.897	0.018
Jn,O	1.451	0.222	2.013	0.119	1.265	0.282	0.904	0.418	0.477	0.662	1.549	0.198	0.380	0.721		
Jn,D	2.257	0.088	3.175	0.036	1.266	0.286	1.055	0.341	1.740	0.159	0.226	0.827	0.910	0.416	3.158	0.035

Jn,F-14	0.997	0.374	0.498	0.649	0.505	0.641	0.601	0.578	3.924	0.016	1.098	0.334	1.894	0.137	3.526	0.025
Au,O	1.043	0.362	1.357	0.246	2.851	0.045	1.511	0.203	0.680	0.534	1.174	0.308	1.987	0.122		
Au,D	3.610	0.021	2.651	0.060	2.195	0.091	1.542	0.198	1.854	0.139	0.955	0.394	0.001	1.000	1.541	0.197
Au,F-14	0.212	0.843	0.146	0.891	0.902	0.417	0.064	0.953	1.991	0.117	2.220	0.090	0.775	0.482	1.992	0.115
O,D	3.280	0.031	2.435	0.078	0.240	0.817	0.256	0.804	1.247	0.276	0.600	0.581	1.491	0.208		
O,F-14	0.299	0.780	5.302	0.007	1.363	0.245	1.341	0.251	1.479	0.208	0.848	0.450	3.973	0.018		
D,F-14	1.331	0.250	3.692	0.021	1.208	0.290	1.425	0.229	2.361	0.073	0.413	0.695	0.607	0.582	0.396	0.712

Pair-wise test for %N for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	T	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
M,My	1.714	0.182	1.999	0.117	12.960	0.000	7.097	0.002	22.304	0.000	5.070	0.007	0.274	0.798		
M,Jn	0.128	0.904	1.536	0.203	17.819	0.000	17.700	0.000	5.110	0.015	0.326	0.760	0.702	0.530		
M,Au	0.952	0.413	0.531	0.617	9.445	0.001	4.925	0.007	29.623	0.000	2.654	0.060	2.039	0.117		
M,O	1.054	0.373	2.398	0.075	0.925	0.406	1.757	0.149	2.705	0.070	0.695	0.528	0.569	0.599		
M,D	2.159	0.120	1.881	0.137	6.324	0.005	2.976	0.039	1.673	0.198	1.023	0.365	0.783	0.484		
M,F-14	2.174	0.118	4.436	0.014	8.265	0.002	4.099	0.014	11.759	0.001	7.956	0.002	0.548	0.608		
My,Jn	1.489	0.210	0.984	0.378	2.896	0.045	0.565	0.605	0.808	0.460	4.219	0.014	0.510	0.638		

My,Au	0.498	0.646	0.464	0.668	2.343	0.079	1.672	0.163	1.548	0.192	2.862	0.045	2.204	0.096		
My,O	1.385	0.243	5.718	0.004	3.781	0.018	3.686	0.023	0.458	0.675	3.078	0.035	0.308	0.780		
My,D	2.909	0.044	3.372	0.029	7.567	0.002	2.737	0.051	2.917	0.047	3.099	0.036	0.610	0.566		
My,F-14	1.645	0.178	9.858	0.001	10.078	0.001	5.080	0.007	7.385	0.003	2.991	0.041	1.183	0.299		
Jn,Au	1.040	0.353	1.100	0.330	0.127	0.903	2.841	0.047	0.495	0.643	1.741	0.153	1.527	0.203	8.293	0.001
Jn,O	1.032	0.363	2.339	0.081	2.802	0.051	5.319	0.007	0.028	0.979	0.437	0.692	0.411	0.711		
Jn,D	1.818	0.141	2.341	0.079	7.123	0.002	4.079	0.013	2.756	0.052	0.679	0.527	0.132	0.908	3.706	0.023
Jn,F-14	2.012	0.118	2.885	0.045	13.103	0.000	12.307	0.000	2.818	0.048	2.877	0.043	1.850	0.136	1.070	0.349
Au,O	0.197	0.853	1.894	0.134	2.613	0.059	2.114	0.098	0.291	0.783	0.832	0.447	4.043	0.016		
Au,D	1.059	0.348	1.822	0.137	4.627	0.010	1.162	0.306	3.215	0.034	0.707	0.514	1.222	0.301	0.316	0.777
Au,F-14	1.367	0.243	2.868	0.045	6.583	0.005	2.914	0.044	9.493	0.001	0.470	0.668	6.407	0.004	0.671	0.532
O,D	2.534	0.065	0.360	0.739	0.710	0.523	0.904	0.429	1.901	0.129	0.160	0.881	0.539	0.619		
O,F-14	2.228	0.087	2.156	0.099	0.243	0.814	0.035	0.975	1.529	0.198	1.262	0.280	7.284	0.002		
D,F-14	0.857	0.432	0.754	0.493	1.930	0.127	1.174	0.303	1.110	0.333	1.180	0.305	1.814	0.146	0.746	0.499

Pair-wise test for $\delta^{13}\text{C}$ (level Time)

	BF		bSQ	
Groups	t	p(perm)	t	p(perm)
M,My	3.684	0.002	4.186	0.002

M,Jn	1.017	0.326	0.963	0.352
M,Au	1.337	0.189	0.249	0.803
M,O	5.680	0.000	2.439	0.033
M,D	1.198	0.245	0.367	0.724
M,F-14	3.013	0.006	0.467	0.656
My,Jn	1.000	0.334	1.211	0.248
My,Au	1.668	0.111	5.054	0.000
My,O	2.443	0.023	2.666	0.020
My,D	2.601	0.014	4.109	0.001
My,F-14	0.952	0.343	4.088	0.001
Jn,Au	0.098	0.924	1.456	0.171
Jn,O	2.148	0.037	0.231	0.819
Jn,D	0.366	0.729	0.922	0.370
Jn,F-14	0.570	0.582	0.822	0.427
Au,O	3.402	0.002	3.079	0.009
Au,D	0.380	0.707	0.920	0.368
Au,F-14	1.031	0.314	1.121	0.267
O,D	4.786	0.000	2.188	0.047
O,F-14	3.485	0.002	2.120	0.051

D,F-14	1.827	0.076	0.182	0.860
--------	-------	-------	-------	-------

Pair-wise test for $\delta^{15}\text{N}$ for Time x Location (level Time)

	E1		E2		E3		E4		E5		E6		E7		E8	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
M,My	5.833	0.009	1.349	0.253	1.656	0.176	1.892	0.132	3.493	0.041	2.408	0.069	1.469	0.219		
M,Jn	0.364	0.732	0.251	0.815	0.007	0.995	0.525	0.634	0.448	0.686	3.264	0.030	0.352	0.745		
M,Au	1.009	0.395	4.999	0.008	5.019	0.007	0.098	0.925	0.419	0.702	1.323	0.252	0.908	0.413		
M,O	0.096	0.930	4.191	0.013	6.424	0.003	2.768	0.049	6.131	0.009	0.339	0.744	1.886	0.132		
M,D	2.230	0.111	6.582	0.002	5.745	0.005	0.256	0.817	1.862	0.157	0.513	0.627				
M,F-14	2.624	0.081	3.741	0.022	3.228	0.028	1.202	0.294	1.486	0.234	1.341	0.247				
My,Jn	1.780	0.149	1.009	0.376	0.893	0.419	0.741	0.503	1.162	0.310	2.395	0.075	2.028	0.110		
My,Au	0.040	0.972	2.405	0.074	0.311	0.772	1.440	0.222	1.454	0.225	4.031	0.016	1.721	0.164		
My,O	3.433	0.027	2.047	0.110	2.342	0.076	0.457	0.671	10.858	0.001	3.190	0.034				
My,D	1.194	0.287	3.370	0.028	1.063	0.347	1.051	0.355	3.478	0.026	2.303	0.080				
My,F-14	2.721	0.053	2.795	0.048	1.604	0.184	0.445	0.682	1.620	0.176	0.167	0.875	0.804	0.461		
Jn,Au	0.893	0.423	2.662	0.055	1.215	0.295	0.483	0.665	0.196	0.852	4.204	0.013	0.809	0.468	1.368	0.241
Jn,O	0.466	0.672	2.445	0.067	2.510	0.070	0.511	0.639	1.033	0.368	4.085	0.012				
Jn,D	2.071	0.103	3.267	0.033	1.671	0.170	0.224	0.831	0.647	0.557	2.983	0.038				

Jn,F-14	0.642	0.548	3.132	0.037	2.059	0.106	0.345	0.748	1.975	0.120	0.495	0.649	2.219	0.090	0.044	0.968
Au,O	1.268	0.279	0.249	0.818	3.618	0.021	1.382	0.237	1.938	0.133	1.441	0.221				
Au,D	0.797	0.478	1.110	0.323	1.764	0.153	0.261	0.798	1.161	0.305	1.549	0.188				
Au,F-14	0.631	0.561	1.580	0.181	1.735	0.166	0.956	0.395	1.996	0.113	0.766	0.488	2.091	0.102	1.471	0.211
O,D	2.678	0.056	1.258	0.271	2.212	0.097	0.878	0.429	0.552	0.618	0.828	0.455				
O,F-14	1.718	0.159	1.669	0.167	0.066	0.951	0.119	0.909	2.741	0.055	1.240	0.280				
D,F-14	2.012	0.108	1.110	0.332	1.104	0.332	0.620	0.575	2.500	0.066	1.589	0.190				

Pair-wise test for %C for Time x Location (level Location)

	M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	1.379	0.272	2.604	0.061	0.742	0.508	0.146	0.885	4.694	0.009	2.844	0.044	0.175	0.865
E1, E3	1.077	0.358	3.881	0.021	1.248	0.277	0.753	0.496	1.839	0.139	1.160	0.313	0.460	0.663
E1, E4	1.600	0.206	2.943	0.043	1.318	0.258	0.324	0.764	0.504	0.639	1.088	0.342	0.103	0.925
E1, E5	1.180	0.364	0.238	0.829	1.530	0.202	0.759	0.493	0.555	0.611	1.127	0.323	0.502	0.641
E1, E6	0.552	0.620	7.598	0.002	2.104	0.103	0.210	0.846	0.435	0.691	0.129	0.904	0.837	0.452
E2, E3	0.297	0.783	0.621	0.564	0.428	0.684	0.116	0.913	5.550	0.006	3.055	0.039	0.730	0.509
E2, E4	0.869	0.439	0.451	0.680	0.448	0.685	0.048	0.964	2.842	0.047	3.055	0.039	0.723	0.504
E2, E5	0.581	0.606	1.098	0.339	0.697	0.523	0.146	0.895	1.081	0.340	0.942	0.400	2.357	0.081

E2, E6	2.919	0.045	3.522	0.025	1.388	0.237	0.061	0.954	3.513	0.026	1.568	0.187	1.987	0.122
E3, E4	0.688	0.533	0.074	0.943	0.042	0.971	0.854	0.447	0.744	0.497	0.376	0.715	1.460	0.214
E3, E5	0.529	0.628	1.478	0.213	0.395	0.724	0.108	0.917	0.064	0.953	1.343	0.255	3.347	0.029
E3, E6	1.321	0.255	3.482	0.024	1.624	0.177	0.533	0.626	1.041	0.365	0.335	0.754	1.096	0.335
E4, E5	0.068	0.946	1.351	0.251	0.795	0.469	0.760	0.482	0.268	0.803	1.434	0.226	1.402	0.226
E4, E6	4.792	0.009	2.763	0.049	3.001	0.042	0.049	0.964	0.109	0.919	0.453	0.667	2.905	0.044
E5, E6	3.055	0.057	3.009	0.038	2.406	0.075	0.560	0.611	0.337	0.750	0.648	0.554	7.368	0.002
E1, E7	1.327	0.278	1.157	0.308	1.925	0.129	0.775	0.483	3.020	0.042	1.437	0.223	0.184	0.869
E1, E8					2.658	0.057	2.602	0.059			2.288	0.088	0.208	0.853
E2, E7	0.068	0.950	0.044	0.965	1.224	0.284	0.215	0.837	1.767	0.150	3.192	0.032	0.835	0.446
E2, E8					2.051	0.110	0.706	0.512			3.546	0.024	0.656	0.545
E7, E8					1.125	0.326	1.198	0.298			0.241	0.817	0.067	0.949

Pair-wise test for %N for Time x Location (level Location)

	M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	1.936	0.146	1.573	0.189	0.395	0.708	0.380	0.726	3.890	0.017	1.908	0.127	1.473	0.214
E1, E3	3.200	0.049	5.491	0.006	0.992	0.366	0.306	0.779	2.201	0.092	0.645	0.548	0.147	0.889
E1, E4	3.134	0.048	2.221	0.090	0.853	0.434	0.445	0.677	2.869	0.049	0.080	0.944	0.082	0.936

E1, E5	2.653	0.118	0.412	0.702	1.218	0.282	0.297	0.775	0.300	0.779	1.584	0.184	0.519	0.628
E1, E6	3.076	0.051	2.761	0.051	2.342	0.085	0.845	0.448	2.082	0.101	0.677	0.533	1.365	0.243
E2, E3	4.124	0.014	4.127	0.015	0.635	0.560	0.995	0.377	0.321	0.771	1.649	0.178	5.800	0.005
E2, E4	3.821	0.020	1.228	0.288	0.455	0.669	0.002	0.999	0.771	0.493	1.559	0.198	4.738	0.008
E2, E5	4.244	0.024	1.595	0.185	0.926	0.406	0.238	0.815	2.266	0.084	0.499	0.649	6.701	0.002
E2, E6	3.692	0.020	2.256	0.089	2.344	0.081	0.521	0.626	0.333	0.754	0.743	0.497	7.704	0.002
E3, E4	0.483	0.648	1.852	0.136	1.389	0.233	1.744	0.160	0.144	0.896	0.220	0.836	0.289	0.790
E3, E5	3.725	0.034	5.963	0.004	1.014	0.370	2.187	0.093	1.534	0.200	1.265	0.272	2.263	0.087
E3, E6	1.451	0.218	0.545	0.622	5.203	0.005	2.245	0.087	0.023	0.982	0.482	0.658	4.485	0.012
E4, E5	3.164	0.050	2.193	0.092	1.583	0.186	0.486	0.654	1.726	0.155	1.186	0.298	1.799	0.147
E4, E6	0.649	0.553	1.506	0.201	5.770	0.005	0.771	0.487	0.110	0.918	0.551	0.613	3.976	0.017
E5, E6	5.429	0.011	2.716	0.055	3.258	0.031	1.313	0.256	1.468	0.220	0.354	0.745	2.968	0.042
E1, E7	1.862	0.163	1.127	0.321	1.527	0.205	0.521	0.633	2.795	0.051	0.421	0.691	1.038	0.364
E1, E8					2.644	0.058	1.024	0.367			0.402	0.710	0.057	0.959
E2, E7	0.770	0.496	1.598	0.188	1.308	0.263	1.210	0.294	2.980	0.040	1.404	0.237	1.265	0.276
E2, E8					2.755	0.053	0.736	0.503			1.836	0.137	1.279	0.281
E7, E8					2.003	0.111	3.666	0.024			0.223	0.840	0.920	0.409

Pair-wise test for $\delta^{13}\text{C}$

(level Location)

Groups	t	p(MC)
E1, E2	2.975	0.007
E1, E3	2.525	0.018
E1, E4	2.049	0.052
E1, E5	3.117	0.004
E1, E6	3.534	0.001
E2, E3	1.009	0.327
E2, E4	1.891	0.065
E2, E5	0.543	0.594
E2, E6	0.184	0.859
E3, E4	1.064	0.303
E3, E5	0.707	0.483
E3, E6	1.215	0.233
E4, E5	2.202	0.038
E4, E6	2.828	0.008
E5, E6	0.595	0.551
E1, E7	2.164	0.039

E1, E8	0.684	0.514
E2, E7	1.237	0.227
E2, E8	1.133	0.273
E7, E8	0.206	0.836

Pair-wise test for $\delta^{15}\text{N}$ for Time x Location (level Location)

	M		My		Jn		Au		O		D		F-14	
Groups	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)	t	p(MC)
E1, E2	0.862	0.448	1.965	0.122	0.269	0.806	0.240	0.822	3.401	0.027	0.567	0.597	2.989	0.044
E1, E3	5.542	0.012	0.086	0.935	0.715	0.513	0.170	0.871	5.472	0.006	0.734	0.497	3.406	0.027
E1, E4	12.345	0.001	1.140	0.314	1.626	0.187	0.137	0.898	4.132	0.015	1.221	0.285	2.568	0.061
E1, E5	8.553	0.013	3.359	0.028	0.704	0.531	0.108	0.916	0.396	0.725	2.115	0.098	2.400	0.076
E1, E6	0.972	0.407	2.594	0.062	3.396	0.027	0.019	0.985	1.799	0.144	2.007	0.116	1.457	0.215
E2, E3	3.209	0.031	1.635	0.179	1.042	0.359	0.329	0.760	2.424	0.076	0.586	0.582	0.491	0.645
E2, E4	5.619	0.005	2.569	0.060	2.092	0.103	1.145	0.315	0.367	0.743	1.605	0.187	1.536	0.199
E2, E5	5.248	0.015	4.174	0.015	0.941	0.390	0.642	0.560	4.634	0.009	3.048	0.039	1.176	0.307
E2, E6	0.805	0.469	3.714	0.018	4.099	0.017	1.109	0.339	1.656	0.174	2.305	0.082	0.578	0.588
E3, E4	3.275	0.033	0.808	0.459	0.863	0.431	1.129	0.322	2.832	0.047	1.357	0.243	1.338	0.261

E3, E5	3.904	0.029	1.836	0.143	0.159	0.880	0.545	0.619	8.594	0.001	2.907	0.046	1.430	0.227
E3, E6	0.431	0.684	1.366	0.252	2.722	0.053	1.362	0.247	3.923	0.018	2.169	0.094	0.261	0.812
E4, E5	2.459	0.092	0.902	0.411	0.428	0.693	0.033	0.975	7.243	0.003	1.630	0.181	1.856	0.129
E4, E6	1.159	0.318	0.358	0.743	2.384	0.078	0.422	0.690	2.276	0.086	1.414	0.236	0.461	0.677
E5, E6	1.333	0.280	1.596	0.187	1.623	0.181	0.188	0.856	2.059	0.108	0.233	0.829	1.439	0.223
E1, E7	1.638	0.209	0.459	0.672	0.551	0.609	1.068	0.340					2.122	0.101
E1, E8					1.899	0.128	0.740	0.500					3.470	0.028
E2, E7	1.398	0.237	1.667	0.173	0.997	0.374	1.866	0.131					0.338	0.752
E2, E8					2.453	0.069	1.217	0.284					1.749	0.157
E7, E8					2.985	0.041	2.321	0.082					1.050	0.359

Anexo III

Tabla 1. Resumen de los resultados de las pruebas t de Student para las diferencias de los datos de fijación de N entre los tratamientos con luz y con oscuridad en sedimentos sin vegetación (SV) y con vegetación (CV)

Estación	Vegetación	T	df	p
i-BF	SV	-12.5364	2	0.006
	CV	-0.3458	2	0.762
o-BF	SV	-0.8799	2	0.472
	CV	2.5400	2	0.126
OUT	SV	0.2211	2	0.846
	CV	-1.3373	2	0.313
bSQ	SV	-1.1585	2	0.366
	CV	-1.0955	2	0.388

Tabla 2. Resumen de los resultados de las ANOVA 1 vía y Tukey para las diferencias entre las estaciones de los datos de fijación de N en sedimentos.

Vegetación	SS	df	MS	F	p
SV	27119.1	3	9039.7	4.915	0.032
CV	7843.2	3	2614.4	0.537	0.670

Tukey SV

	i-BF	OUT	bSQ
o-BF	0.101	0.035	0.060
i-BF		0.876	0.981
OUT			0.981

Tukey CV			
	i-BF	OUT	bSQ
o-BF	0.630	0.820	0.936
i-BF		0.984	0.913
OUT			0.991

Tabla 3. Resumen de los resultados de las pruebas t de Student para las diferencias de los datos de fijación de N entre las muestras de los núcleos SV y CV de las tasas totales y de los experimentos con molibdato (+Mo)

Estación	Tratamiento	T	df	p
i-BF	Total	-0.6220	4	0.568
	+Mo	-0.2370	4	0.824
o-BF	Total	-0.8855	4	0.426
	+Mo	0.8093	4	0.464
OUT	Total	0.7516	4	0.494
	+Mo	0.8609	4	0.438
bSQ	Total	0.6895	4	0.528
	+Mo	1.2908	4	0.266

Tabla 4. Resumen de los resultados de las pruebas t de Student para las diferencias de los datos de fijación de N entre la Hoja 2 y la Hoja 4 experimentos con luz y con oscuridad

Estación	Tratamiento	T	df	p
i-BF	Luz	0.9950	4	0.376
	Osc	0.3788	4	0.724
o-BF	Luz	0.0647	4	0.952
	Osc	0.5393	4	0.618
OUT	Luz	0.8178	4	0.459

	Osc	-1.6827	4	0.168
bSQ	Luz	0.4313	4	0.688
	Osc	0.1750	4	0.870

Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas t de Student para las diferencias de los datos de fijación de N entre los tratamientos con luz y con oscuridad en la filósfera

Estación	t	Df	p
i-BF	1.1298	10	0.285
o-BF	-0.7600	10	0.465
OUT	-0.7604	10	0.465
bSQ	-0.2728	10	0.791

Tabla 6. Resumen de los resultados de las pruebas Kruskal-Wallis para diferencias entre profundidades de las variables accesorias

Estación	Vegetación	Variable	H	p
i-BF	SV	Arena	3.7	0.448
		Corg	6.0	0.197
		N	11.4	0.023
	CV	Arena	4.2	0.380
		Corg	10.6	0.019
		N	10.9	0.280
o-BF	SV	Arena	2.8	0.598
		Corg	3.0	0.561
		N	2.0	0.550
	CV	Arena	5.1	0.274
		Corg	3.5	0.447
		N	6.1	0.195

OUT	SV	Arena	2.1	0.717
		Corg	4.8	0.308
		N	2.0	0.737
	CV	Arena	6.9	0.141
		Corg	3.9	0.422
		N	0.3	0.991
bSQ	SV	Arena	10.5	0.032
		Corg	12.4	0.015
		N	13.4	0.010
	CV	Arena	5.1	0.277
		Corg	5.0	0.283
		N	1.0	0.916

Tabla 7. Resumen de los resultados de las pruebas Kruskal-Wallis para diferencias entre estaciones de las variables accesorias

Arenas (SV)		H (3, N= 60) =52.93113 p =.0000		
		o-BF	OUT	bSQ
i-BF		0.061	0.000	0.386
o-BF			0.106	0.000
OUT				0.000
Arenas (CV)		H (3, N= 60) =52.18907 p =.0000		
		o-BF	OUT	bSQ
i-BF		0.036	0.000	0.687
o-BF			0.118	0.000
OUT				0.000
Corg (SV)		H (3, N= 60) =55.23148 p =.0000		
		o-BF	OUT	bSQ

i-BF	0.000	0.000	0.109
o-BF		0.109	0.118
OUT	0.109		0.000
Corg (CV)	H (3, N= 60) =55.23301 p =.0000		
	o-BF	OUT	bSQ
i-BF	0.000	0.000	0.118
o-BF		0.112	0.109
OUT			0.000
N (SV)	H (3, N= 60) =55.05355 p =.0000		
	o-BF	OUT	bSQ
i-BF	0.000	0.000	0.103
o-BF		0.103	0.132
OUT			0.000
N (CV)	H (3, N= 60) =51.56641 p =.0000		
	o-BF	OUT	bSQ
i-BF	0.000	0.000	0.025
o-BF		0.025	1.000
OUT			0.000
Cl-a (SV)	H (3, N= 12) =5.461538 p =.1410		
	o-BF	OUT	bSQ
i-BF	0.340	0.113	2.038
o-BF		0.226	1.698
OUT			1.925
Cl-a (CV)	H (3, N= 12) =1.761566 p =.6233		
	o-BF	OUT	bSQ
i-BF	0.679	0.510	0.510
o-BF		1.189	0.170
OUT			1.019

