

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



$\delta^{15}\text{N}$ DE PASTOS MARINOS COMO INDICADOR DE FUENTES DE NUTRIENTES
ANTROPOGÉNICAS EN ECOSISTEMAS DE ARRECIFES DE CORAL EN ÁREAS NATURALES
PROTEGIDAS DEL CARIBE MEXICANO.

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

MARÍA TERESA TAVERA ORTIZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. ENERO 2019

Resumen

$\delta^{15}\text{N}$ DE PASTOS MARINOS COMO INDICADOR DE FUENTES DE NUTRIENTES ANTROPOGÉNICAS EN ECOSISTEMAS DE ARRECIFES DE CORAL EN ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL CARIBE MEXICANO

Aún con el establecimiento de áreas de protección marinas en Quintana Roo no se ha hecho un esfuerzo concluyente para restringir la entrada de nutrientes antropogénicos a las costas, una de las principales amenazas de contaminación es la presencia de sistemas de eliminación de aguas residuales in situ. El propósito de este estudio fue investigar el impacto del aporte de nutrientes provenientes de aguas residuales que ingresan a los ecosistemas de pastos marinos y arrecifes de coral dentro de un parque nacional marino y una laguna costera, mediante la evaluación de las concentraciones de nitrógeno y carbono elemental, y los valores del $\delta^{15}\text{N}$ en el pasto marino *Thalassia testudinum* así como las concentraciones de nutrientes en la columna de agua desde noviembre del 2006 a octubre del 2014. Durante la temporada seca se encontraron evidencias de amonio de aguas residuales sin tratamiento y parcialmente tratadas en toda la laguna donde las hojas de los pastos marinos mostraron valores medios del $\delta^{15}\text{N}$ de 3.5 a 7.3 ‰; en la temporada lluviosa el agua de escorrentía de los manglares encubre el efecto de las aguas residuales en la cuenca sur de la laguna donde las hojas presentaron medias del $\delta^{15}\text{N}$ de -2 a 3 ‰, mientras que la cuenca centro y norte continua presente el impacto con amonio de aguas residuales (medias del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 5.3 a 8.5 ‰). En las zonas arrecifales durante la temporada seca no hay señales de aguas residuales (medias del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 2.2 y 2.9 ‰) sin embargo en los meses lluviosos se detectó la presencia de nitrógeno de aguas residuales con un valor medio del $\delta^{15}\text{N}$ de 4.9 ‰ en las hojas. Del análisis de la variación espacial y temporal se determinó un valor umbral del $\delta^{15}\text{N}$ de 3‰ en las hojas de los pastos marinos para utilizarse como indicador de contaminación con aguas residuales, comparable con valores establecidos en macroalgas. Estos resultados sugieren que las entradas de aguas residuales difusas y puntuales son una fuente importante de nitrógeno que sostiene la eutrofización. La escorrentía superficial y subterránea impulsada por las lluvias es el principal mecanismo que regula el impacto relativo del nitrógeno antropogénico en la laguna costera debido al largo tiempo de residencia del agua, mientras que en la laguna arrecifal influyen otros procesos como las corrientes regionales en la temporada seca.

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

$\delta^{15}\text{N}$ DE PASTOS MARINOS COMO INDICADOR DE FUENTES DE
NUTRIENTES ANTROPOGÉNICAS EN ECOSISTEMAS DE ARRECIFES DE
CORAL EN ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL CARIBE MEXICANO

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARÍA TERESA TAVERA ORTIZ

Aprobada por:



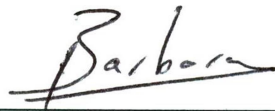
Dr. José Domingo Carriquiry Beltrán

Director de tesis



Dr. Julio Alberto Villaescusa Celaya

Sinodal



Dr. Loïc Jean Baptiste Barbara

Sinodal

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de posgrado.

A la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el financiamiento para la colección de muestras.

A todos los ciudadanos mexicanos que con su aportación se hace posible la creación de becas para estudiantes.

A los miembros del comité de tesis Dr. José Domingo Carriquiry Beltrán, Dr. Julio Alberto Villaescusa Celaya, Dr. Loïc Jean Baptiste Barbara por su confianza y apoyo constante.

Al M.C. Pedro Germán Castro Castro por su apoyo y atención en el trabajo de laboratorio.

A los profesores del posgrado en Oceanografía Costera por el conocimiento y entrega brindados durante los cursos.

A los amigos compañeros de generación la colaboración y apoyo conjunto.

A mis amigos que fuera de la escuela han estado conmigo, especial agradecimiento a César Noyola por el soporte incondicional.

A cada uno de los miembros de mi familia por todo el cariño y apoyo incondicional.

Índice de figuras

Fig. 1. Área de estudio.	5
Fig. 2. Precipitación media mensual 1996-2015 y precipitación mensual del 2014.	6
Fig. 3. Concentraciones medias de nutrientes en la columna de agua en los meses secos y meses lluviosos.	11
Fig. 4. a) contenido porcentual de nitrógeno, b) carbono y c) proporción de carbono: nitrógeno en todas las rametas de hojas de pastos marinos para junio y octubre del 2014 en las tres áreas.	15
Fig. 5. Contenido medio de N y proporción de C:N en hojas para las estaciones de muestreo en meses secos y meses lluviosos.	16
Fig. 6. Valores $\delta^{15}\text{N}$ para meses secos y meses lluviosos en las tres áreas.	17
Fig. 7. Distribución espacial de la clasificación cualitativa del $\delta^{15}\text{N}$, N, NID y salinidad para meses secos y meses lluviosos.	20
Fig. 8. Comparación de valores $\delta^{15}\text{N}$ en hojas y rizomas. a). junio 2014, b) octubre 2014.	22
Fig. 9. Valores del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de los pastos marinos en cada estación de muestro, para meses secos y meses lluviosos.	30

Índice de tablas

Tabla 1. Temperatura, salinidad y oxígeno superficial en meses secos y lluviosos en Isla Mujeres, Punta Cancún-Punta Nizuc y Sistema Lagunar Nichupté.	10
Tabla 2. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre nutrientes y salinidad de la columna de agua.	13
Tabla 3. Análisis de Componente Principal (ACP) para las variables en hojas de pastos marinos y columna de agua.	18
Tabla 4. Intervalo de valores medios por categoría y variable ($\delta^{15}\text{N}$, N, NID y Salinidad) para ambos periodos.	19

Tabla de contenido

Resumen	i
1. Introducción	2
2. Materiales y Métodos.....	3
2.1 Área de estudio	3
2.2 Disposición y tratamiento de aguas residuales en la zona	5
2.3 Clasificación de los meses en base a la precipitación.....	6
2.4 Características de la columna de agua.....	6
2.5 Recolección y análisis de muestras de pastos marinos	7
2.6 Análisis estadístico	8
3. Resultados.....	10
3.1 Variaciones temporales en la columna de agua.....	10
3.2 Nutrientes en la columna de agua	12
3.3 Relación de la salinidad y los nutrientes.	13
3.4 Contenido elemental en hojas de pastos marinos.....	13
3.5 Composición de isótopos estables de nitrógeno en hojas de pastos marinos	17
3.6 Composición de isótopos estables de nitrógeno en rizomas.....	20
4. Discusiones	22
4.1 Nutrientes en la columna de agua	22
4.1.1 El Sistema Lagunar Nichupté	22
4.1.2 Las zonas arrecifales.....	25
4.2 Variaciones temporales del contenido elemental y el $\delta^{15}\text{N}$	28
4.3 Variaciones espaciales del $\delta^{15}\text{N}$	29
4.3.1 Composición isotópica de las fuentes de nitrógeno	30
4.3.2 Caracterización espacial.....	33
4.4 Composición de isótopos estables de nitrógeno en rizomas.....	39
5. Conclusiones	39
Referencias	41

1. Introducción

Los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas más amenazados y diversos del planeta por lo que su conservación tiene la mayor importancia mundial (HRFHP 2015). Aunque los arrecifes de coral proporcionan un valor comercial, recreativo y turístico muy importante para las comunidades costeras, las praderas de pastos marinos también brindan numerosos servicios ecológicos importantes. Los pastos marinos se consideran como "ingenieros de ecosistemas" debido a su capacidad para cambiar significativamente numerosos aspectos de su entorno (Larkum 2006). Además, las praderas de pastos marinos dominadas por *Thalassia* se encuentran entre los sistemas marinos más productivos de La Tierra (van Tussenbroek et al. 2006).

La Península de Yucatán, México, es una plataforma carbonatada donde se desarrolla un sistema altamente kárstico (Beddows et al. 2002). La permeabilidad de la roca es extremadamente alta y la morfología relativamente uniforme lo que permite la rápida infiltración de la lluvia e impide la formación de ríos (Merino et al. 1990). El acuífero costero es un sistema con redes de cuevas subterráneas inundadas que funcionan hidrológicamente como sistemas de conductos a gran escala (Beddows et al. 2007). El agua del acuífero puede descargarse como manantiales submarinos en mar abierto (Null et al. 2014) y dentro de lagunas costeras (Merino et al. 1990). Las descargas submarinas de aguas subterráneas (SGD; por sus siglas en inglés submarine groundwater discharge) se han identificado como una fuente importante de nutrientes en los ecosistemas costeros de la región (Hernández-Terrones et al. 2011; Null et al. 2014).

La infraestructura para la disposición y tratamiento de aguas residuales en la parte norte de Quintana Roo, en la Península de Yucatán, representa una amenaza inminente de contaminación al agua subterránea y superficial. La presencia de sistemas de eliminación de aguas residuales in situ (OSDS, por sus siglas On-site Sewage Disposal Systems), las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs) y las descargas directas ilegales de aguas residuales proveniente de los desarrollos urbanos y turísticos son las principales amenazas. El gobierno federal ha creado Áreas Naturales Protegidas (ANP) costeras en el estado de Quintana Roo con el objetivo de conservar, proteger y recuperar los ecosistemas de arrecifes de coral, pastos marinos y manglares de los cuales dependen las actividades turísticas; el turismo es la principal actividad económica en el estado (HRFHP 2015). Sin embargo, no se ha restringido de manera concluyente la entrada de nutrientes antrópicos a los cuerpos de agua costeros.

La “eutrofización cultural” o el sobre-enriquecimiento de nutrientes, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P), es ampliamente reconocida como una grave amenaza para los diversos ecosistemas costeros del mundo. La búsqueda de indicadores tempranos confiables del sobre-enriquecimiento es esencial para evaluar el grado de afectación de los ecosistemas y, en su caso, la efectividad de las medidas restauradoras. Los pastos marinos se fijan en su lugar y continuamente registran cambios del ambiente que los rodea por lo que su composición química es en gran parte determinada por las condiciones ambientales (Fourqurean et al. 2005). La larga vida de los tejidos de los pastos marinos (Hemminga et al. 1999), en relación con la escala temporal de la variabilidad ambiental los convierte en integradores esencialmente de los atributos relevantes de calidad del agua, por esto los pastos marinos se consideran como centinelas biológicos o "canarios costeros" (Orth et al. 2006). Los isótopos estables y el contenido elemental de N en los tejidos del pasto marino *Thalassia testudinum* (Banks ex König), han sido utilizados como indicadores de fuentes de nutrientes antropogénicas en los sistemas costeros de la región (Carruthers et al. 2005; Mutchler et al. 2007; Sánchez et al. 2013). La premisa se basa en que los efluentes de aguas residuales están típicamente enriquecidos con el isótopo estable de nitrógeno 15 (^{15}N) en comparación con las fuentes naturales de N (Heaton 1986).

El propósito de este estudio fue identificar y evaluar el impacto potencial del aporte de nutrientes provenientes de las aguas residuales tratadas y parcialmente tratadas en los ecosistemas de pastos marinos y arrecifes de coral dentro de dos Áreas Naturales Protegidas (ANPs), mediante el análisis de las variaciones espaciales y temporales en el contenido elemental de C y N, y relación de isótopos estables de N ($^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$, $\delta^{15}\text{N}$) en tejidos de *T. testudinum*, así como la concentración de nutrientes en la columna de agua.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

T. testudinum domina en praderas que se extienden por decenas o centenares de kilómetros cuadrados en el Gran Caribe desde la zona intermareal superior hasta una profundidad de 10-15 m en estuarios y en lagunas arrecifales (Van Tussenbroek et al. 2010). El área de estudio se localiza al norte del Caribe mexicano en el estado de Quintana Roo, México. Se estudiaron los ecosistemas de arrecife de coral y pastos marinos dentro del ANP “Parque Nacional Costa Occidental de Islas Mujeres, Punta

Cancún y Punta Nizuc (PNIMCN)” y el ecosistema de manglar y pastos marinos de la Laguna Nichupté en la que se encuentra el ANP “Manglares de Nichupté” (Fig. 1).

El PNIMCN es un Parque Marino que abarca un área de 8,673 ha dividida en 3 polígonos; la costa poniente de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc donde se encuentran varios parches arrecifales, aquí las praderas de *T. testudinum* son abundantes en las zonas poco profundas (<5 m; Herrera-Silveira et al. 2009). Las zonas arrecifales de Punta Cancún y Punta Nizuc se ubican en la costa de la ciudad de Cancún que es conocida mundialmente como el centro turístico más importante del país (Fig. 1). En la costa oeste de Isla Mujeres y en Punta Nizuc hay presencia de manglares mientras que en Punta Cancún existe únicamente desarrollo turístico. La Laguna Nichupté o Sistema Lagunar Nichupté (SLN) es un sitio RAMSAR (CONANP 2016), que además es un Sitio Prioritario Marino para la Conservación de la Biodiversidad en México (CONABIO 2008). El SLN se ubica al este y sureste de la ciudad de Cancún y tiene un área de $50 \times 10^6 \text{ m}^2$, se forma a partir de tres cuerpos principales (lagunas) y varios cuerpos de tamaño menor conectados (Fig. 1). Las lagunas son poco profundas (media de 2.2 m) con bancos (profundidad de 0.5 m) que restringen la comunicación entre estas (Merino et al. 1990). Una franja de humedales se extiende entre las lagunas del lado oeste y sur, estos humedales y las tierras circundantes con un área de escurrentía de $48 \times 10^6 \text{ m}^2$ y los manantiales submarinos localizados en el límite oeste aportan agua con bajas salinidades a la laguna (Merino et al. 1990). El intercambio de agua con el Mar Caribe se produce a través de dos entradas; la entrada Cancún con 50 m de ancho en el extremo norte y la entrada Nizuc con 30 m de ancho en el extremo sur dragadas a 5 y 3 m de profundidad respectivamente (Carbajal et al. 2009).

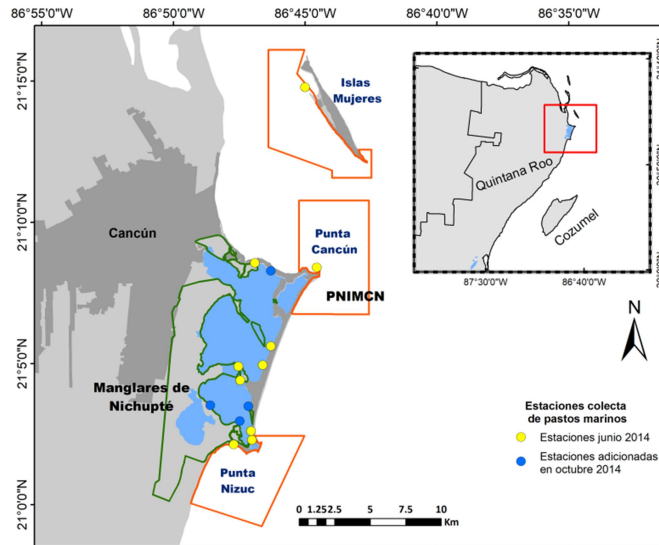


Fig. 1. Área de estudio. Se muestran los polígonos de las dos Áreas Naturales Protegidas.

2.2 Disposición y tratamiento de aguas residuales en la zona

El centro principal de la ciudad cuenta con un sistema de alcantarillado al que están conectadas la mayoría de las viviendas vinculado a tres PTARs, sin embargo, el agua tratada con frecuencia no cumple con las normas mexicanas (Domínguez y García 2007). Existen asentamientos informales en la ciudad que eliminan los desechos humanos en tanques sépticos o pozos construidos sin revestimiento (Domínguez y García 2007). En la parte oeste del SLN se encuentran áreas de asentamientos precarios ilegales donde se defeca al aire libre o que cuentan con letrinas que vierten hacia pozos sin revestimiento (Domínguez y García 2007). La zona hotelera, ubicada en la parte este y norte del SLN posee una red de alcantarillado y tres PTARs que se consideran que funcionan de manera adecuada según las normas mexicanas de calidad de agua (Domínguez y García 2007). Las PTARs están instaladas en las inmediaciones del SLN, en la parte norte se encuentra la planta “Pok Ta Pok” que trata 200 l/s de agua residual; en la parte este se ubican las plantas “Gucumatz” (que trata 150 l/s) y “El Rey” (con 70 l/s de agua tratada) (CONAGUA-SEMARNAT 2014). El agua tratada se usa para el riego de áreas verdes y de campos de golf; el agua sobrante se inyecta al subsuelo en pozos de absorción a 100m de profundidad (FONATUR 2010). No se tiene ninguna descarga directa a los cuerpos de agua superficiales (FONATUR 2010).

2.3 Clasificación de los meses en base a la precipitación

La región de estudio tiene un clima tropical clasificado como cálido subhúmedo con lluvias en verano (INEGI 2016), por tanto no existe una temporalidad marcada. Las precipitaciones medias mensuales para el periodo de 1996-2015 (base de datos del GPCP, de la NASA) fueron utilizadas para definir las condiciones hidrológicas de cada mes, con la finalidad de clasificarlos en temporadas seca y lluviosa. El criterio utilizado fue la media anual de precipitación (1996 a 2015) de 74.32mm (Fig. 2); los meses con valores por arriba de la media anual fueron considerados lluviosos y con valores por debajo como meses secos. Los meses secos fueron: diciembre, enero, febrero, marzo, abril, mayo, julio y agosto con una precipitación media de 48.85mm, y los meses lluviosos correspondieron a: junio, septiembre, octubre y noviembre, con una precipitación media de 125.25mm (Fig. 2). De acuerdo con esta serie de datos la precipitación media anual es de 981.8mm. Las precipitaciones mensuales del 2014 (857.58mm anuales) fueron variables por lo que difirieron en algunos meses de los valores medios (periodo 1996-2015; Fig. 2).

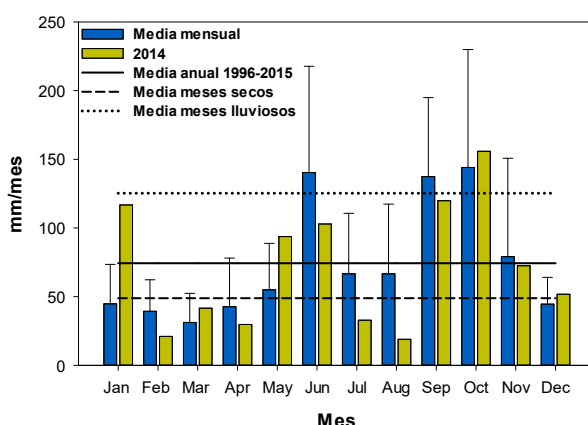


Fig. 2. Precipitación media mensual 1996-2015 y precipitación mensual del 2014. Datos obtenidos de la base de datos del *Global Precipitation Climatology Project* (GPCG) de la NASA (<https://iridl.ldeo.columbia.edu/SOURCES/.NASA/.GPCP/.V1DD/.V1p2/>), calculados con Huffman et al. (2001). Selección de datos con coordenadas 21.5° latitud Norte, 86.5° longitud oeste.

2.4 Características de la columna de agua

Las características hidrológicas de la columna de agua fueron obtenidas de los datos generados y reportados por Carriquiry et al. (2017) en un proyecto para la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). En este proyecto se obtuvieron datos hidrológicos básicos de temperatura, salinidad, nutrientes (nitrógeno inorgánico disuelto, nitratos + nitritos, amonio y fosfatos) y oxígeno disuelto desde

noviembre del 2006 a octubre del 2014. Las áreas estudiadas incluyen estaciones de muestreo que abarcaron el lado oriente, norte y sur del SLN, las zonas arrecifales de Punta Cancún, Punta Nizuc, y el lado poniente de Isla Mujeres.

Para caracterizar la variabilidad estacional de los datos de salinidad, temperatura, oxígeno y nutrientes de la columna de agua se agruparon los meses de muestreo en meses secos (mayo 2007, mayo 2011 y junio 2014) y meses lluviosos (noviembre 2006, noviembre 2011, septiembre 2012, septiembre 2013 y octubre 2014), de acuerdo con la clasificación hidrológica de los meses descrita anteriormente. El muestreo de junio del 2014 se consideró en los meses secos debido a que se realizó los días dos y seis del mes por lo que la información hidrológica es representativa del mes de mayo.

La variabilidad temporal se calculó promediando los valores de cada parámetro para los meses secos y para los meses lluviosos en cada estación de muestreo. En la descripción espacial del área de estudio las estaciones de muestreo, a su vez, se separaron en tres áreas correspondientes al Sistema Lagunar Nichupté (SLN), con 19 estaciones en meses secos y 20 en meses lluviosos, a Isla Mujeres (IM) con 6 estaciones en ambos tipos de meses, y las de Punta Cancún-Punta Nizuc (PC-PN) con 10 estaciones en meses secos y 11 estaciones en meses lluviosos. Durante todo el periodo de muestreo se generaron 284 datos por variable.

2.5 Recolección y análisis de muestras de pastos marinos

Las muestras de pastos marinos se tomaron el dos y seis de junio del 2014 (primavera) en un primer muestreo y del 27 al 30 de octubre del 2014 (otoño) en un segundo muestreo. Se colectaron manualmente brotes cortos o rametas de *T. testudinum* seleccionando cuidadosamente ejemplares sanos fijados al fondo. Los brotes se obtuvieron por medio de inmersiones de buceo libre; se considera que cada brote pertenece a un individuo diferente. En el diseño del muestreo se establecieron 10 estaciones en junio y se añadieron cuatro estaciones más en octubre en las mismas áreas del muestreo de agua, excepto en Punta Nizuc (Fig. 1). Las rametas colectadas se colocaron en hielo hasta llegar al laboratorio donde se congelaron previo a su análisis. Se analizaron dos rametas por cada estación de junio y tres rametas por estación de octubre (excepto en una estación donde se analizaron 6 rametas).

En el laboratorio se seleccionaron las rametas mejor conservadas, con mayor número de hojas verdes, y se separaron las hojas y los rizomas por rameta. El material se limpió con agua desionizada; las hojas se rasparon cuidadosamente con un cubre objetos

de vidrio para eliminar las epifitas. Las hojas limpias se observaron en el microscopio binocular para asegurar que estuvieran libres de epibiontes. El material (hojas y rizomas) se congeló durante tres días y posteriormente se liofilizó. El material seco se trituro y homogenizó usando un homogeneizador mecánico de balines de acero inoxidable.

Los análisis de contenido elemental e isótopos estables de C y N se realizaron mediante un espectrómetro de masas de relación isotópica Thermo Delta V Advantage acoplado en flujo continuo (CF-IRMS) a un analizador elemental Thermo Flash 2000 Plus en el laboratorio de isótopos estables del Grupo de Investigación de Geociencias Ambientales, del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California. El contenido elemental se reporta como porcentaje de C y N en peso seco y las proporciones elementales en relación mol:mol. Para la composición isotópica (R) se utilizó la notación delta estándar (‰): $\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}}) - 1] \times 1000$. Estos resultados se presentan con respecto a los estándares internacionales de N atmosférico (AIR, N₂) y Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) para C. La precisión obtenida fue de 0.17‰ para $\delta^{15}\text{N}$, 0.08‰ para $\delta^{13}\text{C}$, de 0.14% para N y 0.31% para C calculada mediante el análisis de estándares de laboratorio (n = 36) desarrollado por el Grupo de Investigación de Geociencias Ambientales del IIO, calibrados con estándares primarios.

Las hojas de *T. testudinum* alcanzan una longitud entre 10 y 80 cm (Van Tussenbroek et al. 2010) con una vida promedio de 50 días (revisión por Hemminga et al. 1999). Las hojas seleccionadas para nuestro estudio fueron de una longitud entre 10 y 25 cm aproximadamente, por tanto, las muestras de junio del 2014 se consideraron como representativas de mayo y abril del 2014 (meses secos) y las de octubre de este mismo mes y de septiembre del 2014 (meses lluviosos).

2.6 Análisis estadístico

Los conjuntos de datos hidrológicos de la columna de agua y de contenido elemental e isotópico de los pastos marinos se separaron por variable, tiempo (meses secos, meses lluviosos) y espacio (IM, PC-PN, SLN) con el fin de conocer las variaciones temporales y espaciales. Se aplicó un prueba Q-Q *plot* para evaluar la distribución normal de los datos siguiendo el procedimiento establecido por Johnson and Wichern (2007), para cada conjunto de datos. Sólo algunos conjuntos cumplieron con los requisitos para el análisis estadístico paramétrico (distribución normal, n>5, sin valores extremos y datos a escala mayor a intervalo). Por tanto para evaluar la variabilidad temporal en el contenido elemental e isotópico de los pastos marinos y de las variables de la columna de agua se

utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney U (Zar 1999) para dos muestras independientes en las tres zonas estudiadas. En todas las comparaciones se utilizó un intervalo de confianza (I.C.) de 95% (error $\alpha \leq 0.05$).

Como una primera aproximación para conocer las relaciones entre las variables se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) y de Spearman (r_s). Para profundizar en la exploración de las asociaciones entre variables de columna de agua y de las hojas de pastos marinos y en qué medida contribuyen a la variabilidad se utilizó un Análisis de Componente Principal (ACP) con una solución numérica (Santamaría-del-Ángel et al. 2011). Un componente principal con un eigenvalor mayor o igual que 1 se considera significativo (Santamaría-del-Ángel et al. 2011). El mayor valor absoluto del coeficiente de correlación se utilizó como criterio para establecer en que componente domina cada variable. Debido a la diversa naturaleza de las variables los datos se estandarizaron (Z) previo al ACP. La función de estandarización utilizada (Parks 1966), transforma los datos en intervalo de 0 a 1 y se calcula por medio de la siguiente ecuación (ecuación 1):

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - XMIN_i}{XMAX_i - XMIN_i}$$

Donde Z_{ij} es el valor estandarizado de i -ésimo atributo y j -ésimo objeto, X_{ij} es el valor de la i -ésima columna del j -ésimo renglón, $XMIN_i$ es el valor mínimo en la i -ésima columna, y $XMAX_i$ el valor máximo de la i -ésima columna. Esta transformación no cambia la distribución original de los datos.

Este estudio está enfocado principalmente en la variabilidad del $\delta^{15}N$ en el tejido de los pastos debido a que ha demostrado ser un indicador de las distintas fuentes de nutrientes en la región (por ejemplo Carruthers et al. 2005; Mutchler et al. 2007; Sánchez et al. 2013). Con la finalidad de determinar las principales fuentes de N en el área se seleccionaron las variables que explicaron variabilidad del $\delta^{15}N$ en base al ACP tomando como criterio que las variables elegidas no fueran redundantes (colineales). Las variables no redundantes que explicaron variabilidad de los valores del $\delta^{15}N$ fueron clasificadas en cinco categorías (incluyendo el $\delta^{15}N$) de acuerdo con su valor estandarizado: muy bajo para valores de 0 a 0.2, bajo para >0.2 a 0.4, medio para >0.4 a 0.6, alto para >0.6 a 0.8 y muy alto para >0.8 a 1. Las estaciones que mostraron patrones similares espaciales se agruparon de acuerdo a esta clasificación.

3. Resultados

3.1 Variaciones temporales en la columna de agua

En las tres áreas (IM, PC-PN y SLN) de estudio las salinidades medianas fueron significativamente mayores en los meses secos que en los meses lluviosos (Tabla 1). Por el contrario en PC-PN y SLN la concentración mediana de oxígeno disuelto fue significativamente mayor en los meses lluviosos. Únicamente en el SLN la temperatura mediana de la columna de agua fue significativamente menor en los meses lluviosos (Tabla 1).

Tabla 1. Temperatura, salinidad y oxígeno superficial en meses secos y lluviosos en Isla Mujeres, Punta Cancún-Punta Nizuc y Sistema Lagunar Nichupté. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medianas de meses secos y meses lluviosos por área detectadas con la prueba *U* a un α 0.05.

		Isla Mujeres		Punta Cancún-Punta Nizuc		Sistema Laguna Nichupté	
		Meses lluviosos	Meses secos	Meses lluviosos	Meses secos	Meses lluviosos	Meses secos
Salinidad	Mediana	36.2*	36.9*	36.2*	36.8*	26.0*	34.0*
	Intervalo	36.1-36.4	36.8-36.9	35.9-36.4	36.7-36.9	18.7-27.4	30.1-37.3
Oxígeno (mg/l)	Mediana	6.39	6.39	6.46*	5.96*	6.32*	5.86*
	Intervalo	6.1-7.1	6.1-7.6	6.1-7.2	5.7-6.4	5.1-7.6	4.8-7.5
Temperatura (°C)	Mediana	27.7	27.6	27.7	27.7	27.2*	29.2*
	Intervalo	27.3-27.8	26.9-28	27.4-28.4	27.1-27.9	26.9-28.2	26.5-29.7

EN IM la concentración mediana de nitrato (más nitrito, de aquí en adelante) y ortofosfatos (PO_4^{3-}) fueron significativamente mayores en los meses secos que en los meses lluviosos; aunque no se detectaron diferencias significativas temporales entre las concentraciones medianas de amonio (NH_4^+ ; Fig. 3a.). De manera contrastante en PC-PN la concentración mediana de nitrato (NO_3^-) no fue significativamente diferente entre temporadas mientras que la concentración mediana de NH_4^+ fue significativamente mayor en los meses lluviosos y la concentración mediana de PO_4^{3-} fue mayor en meses secos (Fig. 3b.). En el SLN todas las variables determinadas fueron significativamente diferentes entre meses secos y lluviosos, las concentraciones medianas de NO_3^- y NH_4^+ fueron mayores en meses lluviosos mientras que la concentración mediana de PO_4^{3-} fue mayor en meses secos (Fig. 3 c.).

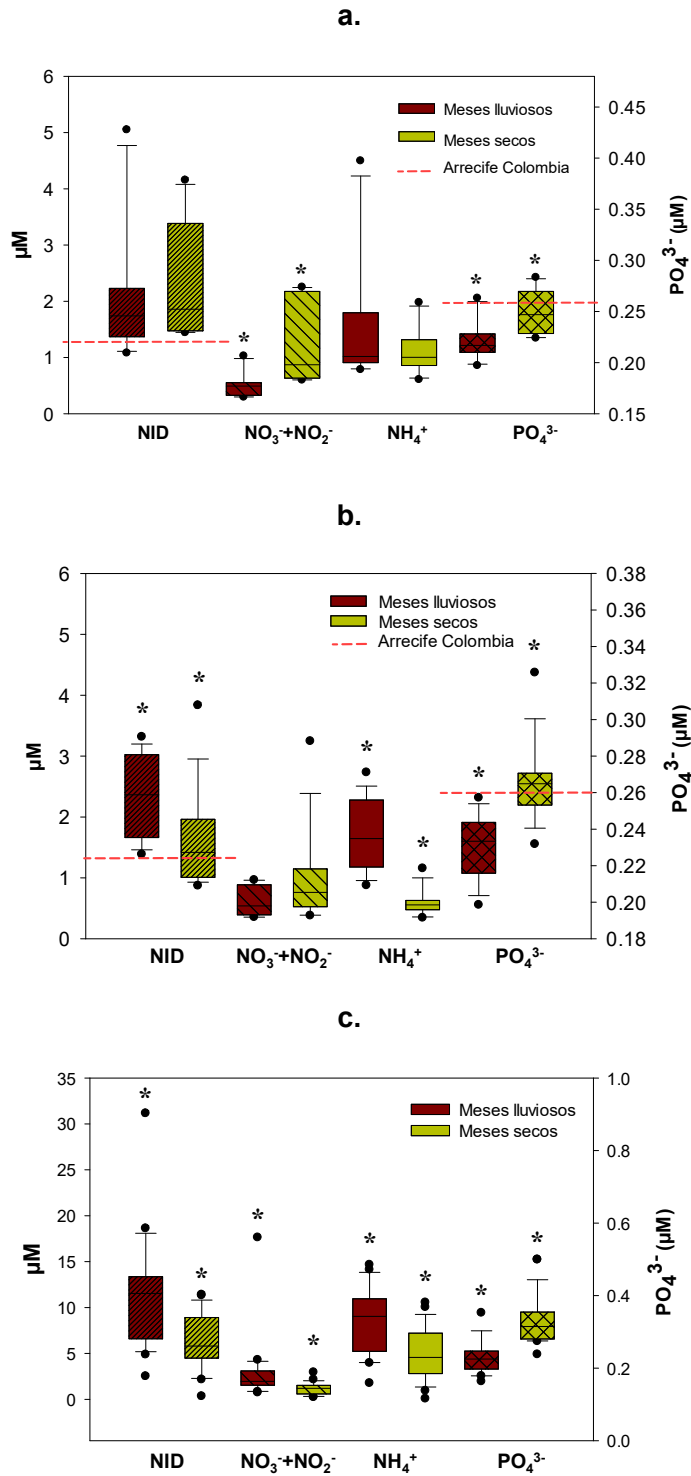


Fig. 3. Concentraciones medias de nutrientes en la columna de agua en los meses secos y meses lluviosos. NID: Nitrógeno Inorgánico Disuelto, $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$: nitrato más nitrito, NH_4^+ : amonio y PO_4^{3-} : fosfato. **a)** Isla Mujeres, **b)** Punta Cancún-Punta Nizuc, **c)** Sistema Lagunar Nichupté. Los asteriscos indican la diferencia entre las medianas (línea vertical que divide las barras) de los meses secos y lluviosos. Las líneas horizontales segmentadas en rojo indican valores promedio medidos en el arrecife Colombia del Parque de Cozumel usados como referencia (ver texto).

3.2 Nutrientes en la columna de agua

En ambas temporadas la mayoría de las estaciones de las zonas arrecifales tenían concentraciones medias de NID (de 1.1 a 5 μM en IM, 1.4 a 3.3 μM en PC-PN meses lluviosos; 1.4 a 4.2 μM IM, 0.9 a 3.8 μM en PC-PN meses secos) mayores a las concentraciones medias de NID encontradas en el arrecife Colombia del Parque de Cozumel en Quintana Roo (~1.3 μM primavera-verano 2007; 0.7 μM otoño-invierno 2006; Mendoza 2012), un sitio sin influencia antropogénica directa (Fig. 3 a y b). Las concentraciones medias de PO_4^{3-} en las estaciones de IM y PC-PN (de 0.2 a 0.26 μM en meses lluviosos; de 0.22 a 0.28 μM IM, 0.23 a 0.33 μM PC-PN en meses secos) fueron similares a la concentración media de PO_4^{3-} de Colombia (~0.26 μM ; Fig. 3 a y b).

Las concentraciones de NID y PO_4^{3-} en las estaciones marinas presentaron proporciones medias de NID: PO_4^{3-} (molar) menores o cercanas a la relación N: P de Redfield para el seston oceánico (16:1) durante ambos periodos. Dentro del SLN durante los meses lluviosos se encontraron proporciones NID: PO_4^{3-} mayores a 16 (excepto en una estación), mientras que en los meses secos aproximadamente la mitad de las estaciones tenían valores menores o cercanos a 16. Las aguas de los ambientes de arrecifes ricos en carbonato del Caribe típicamente se encuentran limitadas por P (Lapointe et al. 1993); las proporciones de NID: PO_4^{3-} en la columna de agua sugieren que en las zonas arrecifales de Isla Mujeres y Cancún existen aportes de P que reducen la limitación de este nutriente. En el SLN durante los meses secos aumenta los PO_4^{3-} y disminuye el NID lo que ocasiona que las proporciones NID: PO_4^{3-} sean menores.

Se utilizó el cociente $f = (\text{NO}_3^- / (\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-))$ para estimar la importancia del NO_3^- contra NH_4^+ como fuente de N de tal manera que un valor $f \leq 0.5$ indica dominancia de NH_4^+ y un $f > 0.5$ dominancia de NO_3^- . En los meses lluviosos el coeficiente f estuvo entre 0.11-0.50 en IM, 0.12- 0.41 en PC-PN y 0.13-0.57 en SLN. En los meses secos el coeficiente f varió entre 0.32-0.67 en IM, 0.38-0.85 en PC-PN y 0.03-0.77 en SLN. En las zonas arrecifales, de manera general, la especie dominante fue el NH_4^+ ($f < 0.5$) durante los meses lluviosos y el NO_3^- en meses secos ($f > 0.5$; Fig. 3a y b). En IM las concentraciones medias de NH_4^+ y NO_3^- en meses lluviosos se encontraron entre 0.79-4.5 μM y 0.30-1.03 μM respectivamente, mientras que durante los meses secos entre 0.61-1.98 μM de NH_4^+ y 0.6-2.25 μM de NO_3^- (Fig. 3 a). En PC-PN las concentraciones medias de NH_4^+ y NO_3^- en los meses lluviosos fueron de 0.88-2.73 μM y 0.36-0.96 μM respectivamente, y en los meses secos de 0.34-1.16 μM de NH_4^+ y 0.38-3.25 μM de NO_3^- (Fig. 3 b). En el SLN la especie dominante de NID fue el NH_4^+ ($f < 0.5$) en ambas temporadas; las concentraciones

medias de NH_4^+ y NO_3^- en meses lluviosos se encontraron entre 1.77-14.65 μM y 0.75-4.31 μM respectivamente, mientras que durante los meses secos entre 0.08-10.56 μM de NH_4^+ y 0.25-2.95 μM de NO_3^- (Fig. 3 c).

3.3 Relación de la salinidad y los nutrientes.

Las concentraciones medias de NID y NH_4^+ en todas las estaciones se correlacionaron negativamente con la salinidad independientemente de la temporada del año (lluvias o secas), mientras que las concentraciones medias de NO_3^- se correlacionaron negativamente únicamente en los meses lluviosos (Tabla 2). Sugiriendo que, en general, los aportes de agua dulce enriquecieron la columna de agua con nutrientes nitrogenados, principalmente NH_4^+ y en época de lluvias. En contraste las concentraciones medias de PO_4^{3-} mostraron una correlación baja pero significativa con la salinidad únicamente para los meses de secas (Tabla 2), esto indica que las lluvias no parecen tener un efecto importante en las concentraciones de PO_4^{3-} .

Tabla 2. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre nutrientes y salinidad de la columna de agua. Los valores en negrita indican relaciones estadísticamente significativas a un $\alpha=0.05$.

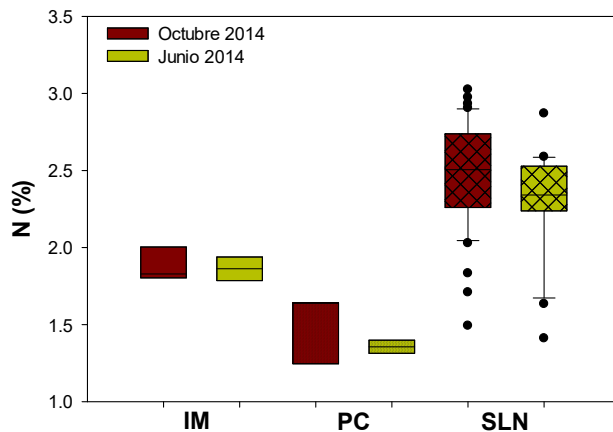
Nutriente	Salinidad	
	Meses lluviosos n=37	Meses secos n= 36
NID (μM)	-0.729 $p<0.0001$	-0.740 $p<0.0001$
Nitrato + nitrito (μM)	-0.438 $p= 0.007$	-0.172 $p=0.314$
Amonio (μM)	-0.803 $p<0.001$	-0.741 $p<0.001$
Fosfatos (μM)	-0.160 $p=0.345$	-0.384 $p=0.021$

3.4 Contenido elemental en hojas de pastos marinos

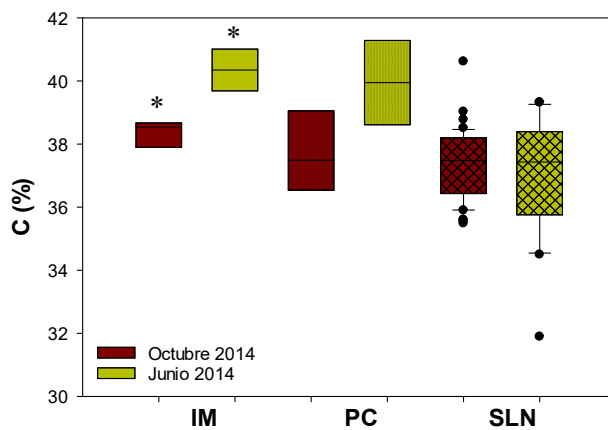
El contenido de N en las hojas de todas las rametas en junio del 2014 varió de 1.3 a 2.9% y el contenido de C fue de 31.9 a 41.3% por lo que la proporción C:N (mol:mol) varió entre 14.3 a 36.7 (Fig. 4). En octubre del 2014 el contenido de N varió de 1.1 a 3.0 %, el contenido de C de 35.5 a 40.6% y la proporción C:N (mol:mol) de 14.0 a 39.3 (Fig. 4). Estos resultados se encuentran dentro de los valores típicos para la especie (1.15-3.15% N; Fourqurean et al. 2005).

Con $n=2$ en junio y $n=3$ en octubre (rametas por estación) se aplicó la prueba no paramétrica U (Zar 1999) para probar la significancia a un I.C. del 80%. Con esta prueba se detectaron cambios significativos únicamente en el contenido mediano de C en IM ($U=6$, $n_1=3$, $n_2=2$, $p \leq 0.20$, Fig. 4).

a.



b.



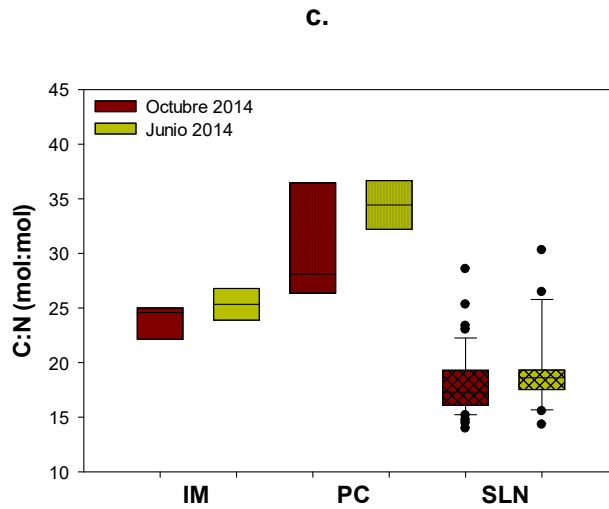


Fig. 4. a) contenido porcentual de nitrógeno, b) carbono y c) proporción de carbono: nitrógeno en todas las rametas de hojas de pastos marinos para junio y octubre del 2014 en las tres áreas. Isla Mujeres (IM), Punta Cancún-Punta Nizuc (PC-PN) y Sistema Lagunar Nichupté (SLN). Los asteriscos indican diferencias significativas.

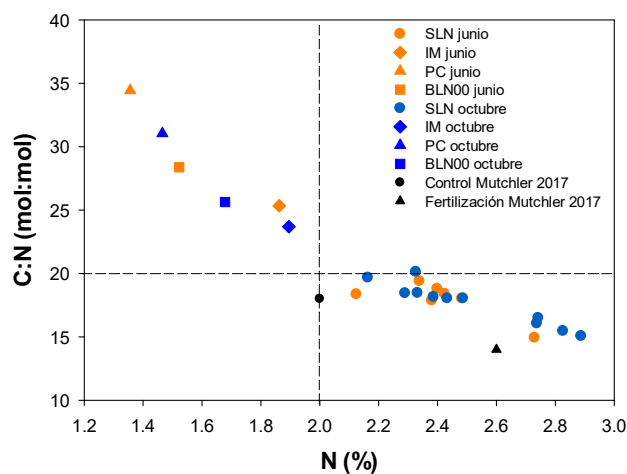
La variabilidad en el contenido de C (Coeficiente de Variación; CV=6.06% en junio, CV=3.04% en octubre) de las hojas de pastos marinos fue mucho menor que en los contenidos de N (CV=20.59% en junio, CV=18.86% en octubre), en consecuencia los cambios en las proporciones de C:N dependen principalmente del contenido de N.

La relación mediana de C:N en las hojas de pastos marinos (18:1-20:1; Atkinson y Smith 1983; Duarte 1990) es considerablemente mayor que los del seston oceánico. Las plantas con una fuerte limitación de N tienen bajos contenidos de N en relación con el C y por lo tanto muestran altas relaciones C: N (Duarte 1990). Este autor encontró que el contenido mediano de N (1.8%) en las hojas de pastos marinos es una referencia útil para comparar entre pastos marinos con limitación de N; sin embargo determinar el contenido de nutrientes críticos para el crecimiento de pastos marinos requiere un trabajo experimental debido a la potencial variabilidad entre especies y los cambios en las condiciones de crecimiento.

Estudios de enriquecimiento en *T. testudinum* se han realizado en otros sitios carbonatados por ejemplo Mutchler y Hoffman (2017) quienes agregaron un fertilizante comercial (19-6-12 NPK) en praderas de pastos marinos, la concentración de NID del control fue 0.16 μM mientras que en el experimento se incrementó a 2.68 μM ; en el transcurso del experimento, el contenido de N en las hojas de los especímenes de control fue de $2.0 \pm 0.3\%$ y una razón C: N de 18 ± 2 , que incrementó significativamente con el

enriquecimiento de N a $2.6 \pm 0.4\%$ y C: N de 14 ± 2 (Fig. 5). Otros estudios han mostrado resultados similares, por ejemplo se han observado incrementos en el contenido de N y disminución en la proporción C: N con el enriquecimiento de nutrientes (N y P) a contenidos control de N en las hojas menores o próximos a 2% (McGlathery 1995; Ferdie and Fourqurean 2004). Sin embargo a contenidos de N mayores que 2% parece no haber incrementos al añadir nutrientes (Powell et al. 1989; Armitage et al. 2005). Lo anterior sugiere que un contenido de N de 2% en las hojas de *T. testudinum* puede ser una referencia para establecer la frontera de potencial limitación de N para la especie en este tipo de entornos.

Por tanto se estableció el valor de 2% en contenido de N y una proporción C: N de 20 como frontera de potencial limitación de N en hojas de *T. testudinum* (Duarte 1990; Fig. 5). Anderson y Fourqurean (2003) también establecieron la limitación de N en *T. testudinum* a partir una razón de C: N entre 20-22. Los pastos que crecían en las zonas arrecifales mostraron concentraciones menores que 2% de N y C:N mayores que 20 independientemente de la pluviosidad indicando potencial limitación (Fig. 5). En contraste las estaciones dentro del SLN (excepto L00) presentaron contenidos promedios de N mayores que 2% y proporciones de C: N menores que 20.



3.5 Composición de isótopos estables de nitrógeno en hojas de pastos marinos

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de todas las rametas analizadas variaron de 0.9 a 8.0 ‰ en junio 2014 y de -6 a 9.3 ‰ en octubre 2014 (Fig. 6). El intervalo de valores de $\delta^{15}\text{N}$ medidos en este estudio se encuentran dentro del intervalo reportado del $\delta^{15}\text{N}$ para *T. testudinum* (de -10.1 a 9.4‰, con valor medio de 2.2-2.3‰; Fourqurean et al. 2005, 2015). Se detectaron cambios significativos a un I.C. del 80% en las medianas del $\delta^{15}\text{N}$ en IM ($U= 6$, $n_1=3$ $n_2=2$, $p\leq 0.20$) y PC- PN ($U= 6$, $n_1=3$ $n_2=2$, $p\leq 0.20$) entre junio y octubre (Fig. 6).

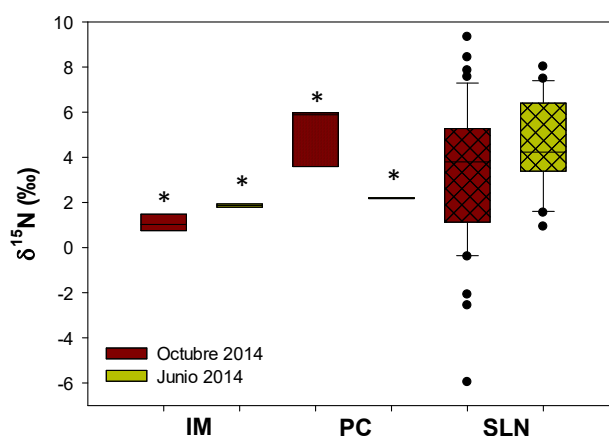


Fig. 6. Valores $\delta^{15}\text{N}$ para meses secos y meses lluviosos en las tres áreas. Isla Mujeres (IM), Punta Cancún-Punta Nizuc (PC-PN) y Sistema Lagunar Nichupté (SLN). Los asteriscos indican diferencias significativas.

El amplio intervalo de valores del $\delta^{15}\text{N}$ (-6 a 9.3 ‰) en las hojas de pastos marinos sugiere la influencia de diversos procesos que están ocurriendo en un área relativamente pequeña. Las variables que explicaron los valores del $\delta^{15}\text{N}$ se determinaron por medio de un ACP. Las variables de las hojas de pastos marinos se incluyeron en el análisis junto con las variables de la columna de agua (ver Tabla 3) para los meses secos y meses lluviosos de manera separada. Cada conjunto (variable y tiempo) de valores medios fueron estandarizados por previo al análisis ACP (ecuación 1). Los valores medios de las variables de columna de agua que se utilizaron en el APC fueron únicamente de las estaciones con muestras de pastos marinos. Del ACP se obtuvieron tres componentes principales significativos, aquellos que presentaron un eigenvalor ≥ 1 , en ambos periodos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de Componente Principal (ACP) para las variables en hojas de pastos marinos y columna de agua. El APC de las hojas de junio 2014 se hizo con los valores medios de los meses secos, el análisis de octubre 2014 con los valores medios de los meses lluviosos. Los coeficientes (cargas) que se muestran en negrita indican las variables dominantes en cada Componente Principal (CP).

	Junio 2014			Octubre 2014		
	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
Eigenvalor	5.78	2.02	1.2	5.87	1.95	1.42
% variación acumulada	52.5	70.9	81.7	53.4	71.1	84.0
$\delta^{15}\text{N}$	-0.63	-0.34	-0.34	-0.11	-0.79	0.38
%N	-0.77	-0.40	-0.11	-0.78	-0.13	0.47
$\delta^{13}\text{C}$	0.75	-0.36	-0.25	0.73	0.28	0.37
%C	0.10	0.86	-0.07	-0.27	-0.38	-0.66
C:N	0.77	0.50	0.06	0.74	-0.02	-0.55
NID	-0.97	0.28	0.19	-0.96	0.29	-0.22
NO_3^-	-0.40	0.45	-0.67	-0.91	0.37	-0.15
NH_4^+	-0.95	0.21	0.33	-0.96	0.26	-0.23
PO_4^{3-}	-0.48	-0.27	0.63	0.13	0.87	0.03
NID: PO_4^{3-}	-0.94	0.32	0.09	-0.97	0.10	-0.22
Salinidad	0.72	-0.36	-0.22	0.70	-0.25	-0.14

Se seleccionaron las variables que explicaron variabilidad del $\delta^{15}\text{N}$ con la finalidad de agrupar y describir espacial y temporalmente las estaciones usando el criterio los valores estandarizados (Z_{ij}) que fueron retenidos por las cargas de los componentes. Para junio 2014 el contenido de C en la hoja y la concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} en la columna de agua dominaron en componentes diferentes al $\delta^{15}\text{N}$ por tanto se descartaron. Las variables N (%), NID, NH_4^+ y NID: PO_4^{3-} variaron con el mismo signo al igual que $\delta^{13}\text{C}$, C: N y salinidad y dominan en el mismo CP por lo que se consideran redundantes (Tabla 3). Al ser de la misma naturaleza las variables NID, NH_4^+ y NID: PO_4^{3-} se eligió el NID por tener una mayor carga (valor mayor del coeficiente) en el CP1. El contenido de N (%) aunque varía con el mismo signo que NID es de naturaleza diferente, es decir el primero se determina en la hoja del pasto y el segundo en la columna de agua, por lo que también se seleccionó. Finalmente la salinidad se eligió sobre las otras variables ($\delta^{13}\text{C}$ y C: N) debido a que la proporción C: N se calcula en base al contenido de N y la facilidad de interpretación.

Se establecieron cinco categorías en base a un intervalo de valores estandarizados para clasificar las variables seleccionadas: $\delta^{15}\text{N}$, N, NID y salinidad (Tabla 4). Los valores estandarizados van de 0 a 1 y dependen del conjunto de datos, por tanto, para poder comparar entre temporadas se calcularon los valores estandarizados por variable para meses secos y meses lluviosos en conjunto. Los intervalos de valores medios y la asignación cualitativa para cada variable se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Intervalo de valores medios por categoría y variable ($\delta^{15}\text{N}$, N, NID y Salinidad) para ambos periodos.

Categoría (valor estandarizado)	Valores medios			
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N (%)	NID (μM)	Salinidad
Muy Bajo (0-0.2)	-2 a 0.1	1.4 a 1.5	0.4 a 3.4	18.8
Bajo (>0.2-0.4)	1.1 a 2.2	1.7 a 1.9	4.9 a 7.4	24.7 a 26.2
Medio (>0.4-0.6)	2.7 a 4.2	2.1 a 2.2	8.6 a 10.3	26.34 a 27.4
Alto (>0.6-0.8)	4.9 a 6.0	2.3 a 2.5	12.9 a 13.7	32.0 a 33.4
Muy Alto (>0.8-1)	6.8 a 8.5	2.7 a 2.9	15.6 a 18.6	35.4 a 36.9

La clasificación para el contenido de N indica las hojas con contenidos menores de 2% (que indica potencial limitación) como bajo y muy bajo (Tabla 4). Cabe señalar que las concentraciones de NID clasificadas como muy bajo incluye valores hasta de $\sim 3 \mu\text{M}$. Para la salinidad la clasificación muy bajo hacer referencia a la mayor influencia de agua dulce y muy alto a la influencia oceánica (salinidad 36.3-36.4 del agua superficial del Caribe). A cada estación de muestreo se le asignó una clasificación cualitativa de las cuatro variables, es decir, tiene una combinación de $\delta^{15}\text{N}$, N, NID y salinidad que la describe (Fig. 7).

En junio del 2014 el contenido de N presentó una correlación significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de pastos marinos ($r=0.64$, $n=10$, $p=0.046$), además el contenido de N mostró una alta correlación (significativa a un I.C. del 90%) con el NID de los meses secos ($r = 0.61$, $n=10$, $p=0.063$). La salinidad en todas las estaciones durante los meses secos varió entre alta y muy alta mientras que en los meses lluviosos únicamente las estaciones oceánicas presentaron salinidades muy altas (ver simbología, Fig. 7) lo que indica menor aporte de agua dulce y/o mayor evaporación en meses secos. En los meses secos todas

las estaciones mostraron NID medio, bajo o muy bajo mientras que durante los meses lluviosos algunas estaciones mostraron concentraciones de NID fueron altas y muy altas lo cual indica un aporte de NID con las lluvias en algunas zonas (Fig. 7).

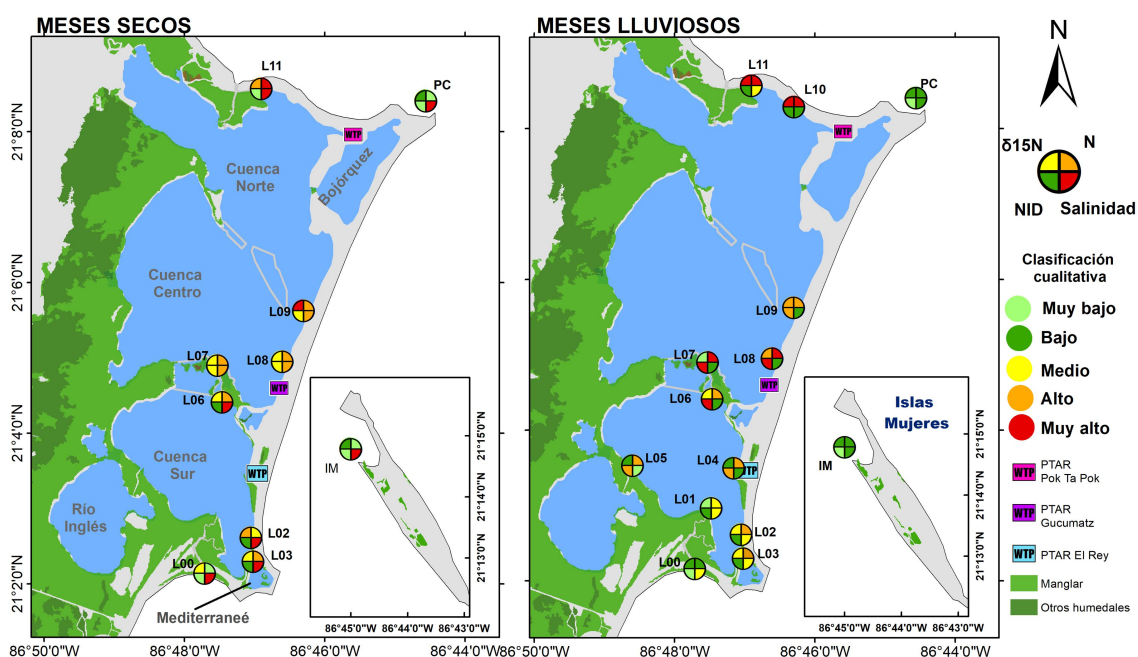


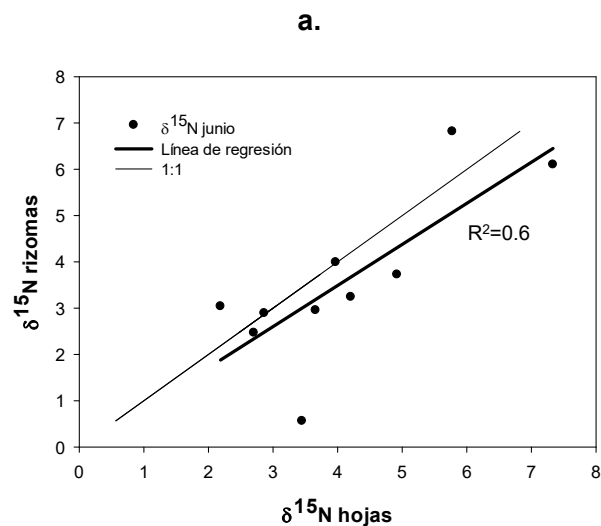
Fig. 7. Distribución espacial de la clasificación cualitativa del $\delta^{15}\text{N}$, N, NID y salinidad para meses secos y meses lluviosos.

A diferencia de junio de 2014, durante octubre 2014 el $\delta^{15}\text{N}$ y el PO_4^{3-} mostraron cargas altas pero inversas con el CP2, el resto de las variables con el CP1 y CP3 (Tabla 3). Esto señala que únicamente la concentración de PO_4^{3-} en la columna de agua se relaciona con el $\delta^{15}\text{N}$ durante este periodo. La concentración de PO_4^{3-} en la columna de agua mostró una correlación negativa y altamente significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ ($r_s = -0.63$, $n = 14$, $p = 0.017$). El contenido de N también mostró una correlación moderada (significativa a un I.C. del 90%) con el $\delta^{15}\text{N}$ ($r_s = 0.52$, $n = 14$, $p = 0.059$) y con el NID ($r_s = 0.61$, $n = 14$, $p = 0.063$).

3.6 Composición de isótopos estables de nitrógeno en rizomas

El $\delta^{15}\text{N}$ en los rizomas de todas las rametas analizadas varió entre -0.1 y 9.5‰ en junio de 2014 y entre -2.66 y 8.89‰ en octubre 2014. Se observó una correlación positiva y altamente significativa entre el $\delta^{15}\text{N}$ de hojas y los rizomas tanto en junio ($r = 0.77$, $n = 10$, $p < 0.009$) como en octubre ($r = 0.95$, $n = 10$, $p < 0.0001$). La línea de regresión entre el $\delta^{15}\text{N}$ de

las hojas y el $\delta^{15}\text{N}$ de los rizomas se desvió ligeramente de una relación 1:1 y el análisis sugirió que los valores $\delta^{15}\text{N}$ son ligeramente mayores en las hojas que en los rizomas durante junio, esta diferencia aumenta a medida que se incrementa el valor $\delta^{15}\text{N}$ de la hoja (Fig. 8). Los valores $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas también fueron ligeramente más altos en las hojas durante octubre pero a valores mayores de $\sim 5\%$ la línea de regresión cruza la pendiente 1:1 y son prácticamente iguales (Fig. 8). Esta relación se mantiene independientemente de la época del año ya que no se encontraron diferencias significativas entre los valores medianos del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas y rizomas de los pastos de las zonas arrecifales ($U=10$ $n1=4$ y $n2=4$; $p\leq 0.05$ en junio, y $U=13$, $n1=6$ y $n2=3$; $p\leq 0.05$ en octubre) ni en el SLN ($U=161$ $n1=16$ y $n2=16$; $p\leq 0.05$ junio, $U=322$, $n1=38$ y $n2=16$; $p\leq 0.05$). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los valores del $\delta^{15}\text{N}$ de los rizomas de octubre y los rizomas de junio en las zonas arrecifales ($U=8$ $n1=3$ y $n2=4$; $p\leq 0.1$) ni en el SLN ($U=128$ $n1=16$ y $n2=16$; $p\leq 0.05$).



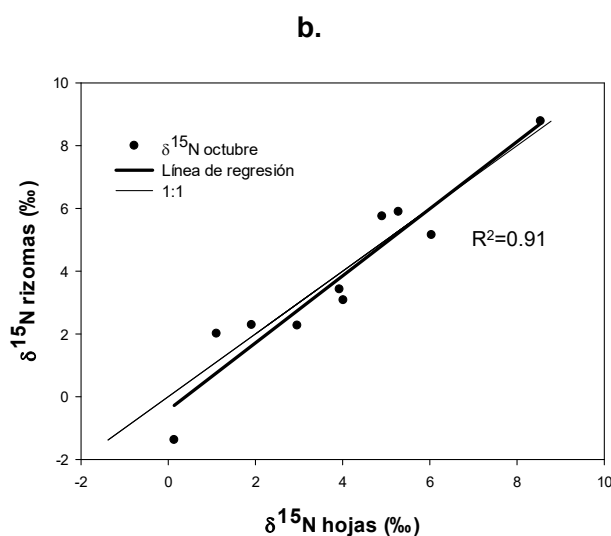


Fig. 8. Comparación de valores $\delta^{15}\text{N}$ en hojas y rizomas. a). junio 2014, b) octubre 2014.

4. Discusiones

4.1 Nutrientes en la columna de agua

4.1.1 El Sistema Lagunar Nichupté

Aunque existe poca información se ha propuesto que el SLN mantuvo condiciones oligotróficas previo a 1971 cuando inició el desarrollo turístico que trajo consigo el dragado de canales, el relleno del hábitat del manglar, las descargas de aguas residuales y el tráfico de botes (Van Tussenbroek et al. 1996). El potencial impacto de estas actividades pueden observarse en estudios comparativos que han mostrado un incremento en el contenido elemental en las hojas de *T. testudinum* de 2.04% de N y proporción C: N de 21 durante 1991-92, hasta valores de $2.93 \pm 0.12\%$ de N y C: N de 15 en 2002, promedios para Laguna Bojórquez y la Cuenca Norte de Laguna Nichupté (Van Tussenbroek et al. 1996; Carruthers et al. 2005). Sin embargo en las mismas zonas (estaciones L10 y L11) en el presente estudio se encontraron contenidos de N de $2.83 \pm 0.15\%$ y C: N de 15 (media de meses seco y lluviosos) durante 2014, estos valores son esencialmente iguales a los medidos en 2002. En conjunto, estos resultados sugieren un incremento en la carga de N a la laguna desde principios de la década de los noventa (1991-92) hasta 2002, una época de desarrollo en la oferta hotelera (Babinger 2012),

desde entonces al 2014 no parece haber ocurrido un cambio importante que haya impactado el contenido elemental en las hojas de los pastos marinos.

La laguna costera de Dzilam se encuentra en terreno kárstico en la parte norte de la Península de Yucatán, era una laguna prístina y poco profunda (2.5m a <1m; Medina-Gómez y Herrera-Silveira 2003) por lo que sus características hidrológicas pueden ser usadas como referencia regional. Estos autores determinaron concentraciones medianas de $2.90 \mu\text{M}$ de NO_3^- , $2.79 \mu\text{M}$ de NH_4^+ y $0.05 \mu\text{M}$ de PO_4^{3-} en esta laguna. Comparativamente las concentraciones medianas de NO_3^- en el SLN fueron menores ($1.97 \mu\text{M}$ lluviosos y $1.20 \mu\text{M}$ secos), y las concentraciones de NH_4^+ ($9.04 \mu\text{M}$ lluviosos y $4.57 \mu\text{M}$ secos) y PO_4^{3-} ($0.23 \mu\text{M}$ lluviosos y $0.31 \mu\text{M}$ secos) fueron mayores que las concentraciones medianas en la laguna Dzilam independientemente de la precipitación (Fig. 3 c). Las mayores concentraciones de NH_4^+ que en Dzilam sugieren aportes de N no naturales en el SLN.

Una fuente de nutrientes a la laguna son las aguas subterráneas que descargan por medio de manantiales submarinos. En la laguna prístina Dzilam, el agua de los manantiales tenía una concentración mediana mucho más alta de NO_3^- ($84.92 \mu\text{M}$) que de NH_4^+ ($1.69 \mu\text{M}$; Medina-Gómez y Herrera-Silveira 2003). En otro estudio se midieron las concentraciones de nutrientes en las aguas subterráneas de la playa (acuífero no confinado) y manantiales submarinos (acuífero más profundo), en las costas de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an al sur de Quintana Roo, un ecosistema de humedal sin impacto antropogénico aparente alimentado con aguas subterránea, y en las costas de Cancún (Null et al. 2014). Al igual que en la laguna Dzilam, los manantiales que aportaban agua a las costas de Sian Ka'an tenían una concentración media de NO_3^- ($9.4 \pm 13.1 \mu\text{M}$) mayor que la de NH_4^+ ($0.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$; Null et al. 2014). A diferencia de los manantiales submarinos que descargaban en las costas de Cancún que mostraron una concentración media de NH_4^+ ($7.0 \pm 12.4 \mu\text{M}$) más altas que la de NO_3^- ($1.5 \pm 1.3 \mu\text{M}$) y mucho mayor a las concentraciones de NH_4^+ de los manantiales en Dzilam y Sian Ka'an (Medina-Gómez y Herrera-Silveira, 2003; Null et al. 2014). El predominio de NH_4^+ en el agua subterránea en la costa de Cancún puede deberse a la presencia de OSDs; las aguas subterráneas debajo de la capa freática tienen bajas concentraciones de oxígeno y las altas cargas de DBO (demanda bioquímica de oxígeno) proveniente de los campos de lixiviados de los OSDs que causan aguas subterráneas subóxicas o anóxicas que limitan la nitrificación, ocasionando el predominio de NH_4^+ (Lapointe et al. 1990).

En el presente estudio los valores calculados de f ($f = \text{NO}_3^- / (\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-)$) dentro el SLN fueron menores a 0.5 lo que indica una dominancia del NH_4^+ sobre NO_3^- independientemente de las temporadas (Fig. 3 c). Esto sugiere que los aportes de N de los manantiales puede ser una fuente muy importante de nutrientes que puede suplir parcialmente la demanda de N de los pastos independientemente de las lluvias, ya que aún en los meses con menores precipitaciones el aporte de agua de los manantiales de aguas subterráneas afectan la salinidad del SLN (Merino et al 1990).

De la misma manera que el NID, las concentraciones de PO_4^{3-} en el SLN también pueden ser afectadas por los aportes de PO_4^{3-} de los manantiales. La concentración de PO_4^{3-} en el agua de los manantiales en la costa de Cancún (media $0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$; Null et al. 2014) fue mucho mayor que en los manantiales de la laguna Dzilam (mediana $0.06 \mu\text{M}$; Medina-Gómez y Herrera-Silveira 2003), sin embargo fue similar a la concentración de PO_4^{3-} en los manantiales de Sian Ka'an (media $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ Null et al. 2014). De forma comparativa no existe evidencia de un aporte antropogénico de P en las costas de Cancún. Las concentraciones de PO_4^{3-} en la columna de agua también pueden deberse a la removilización de P causada en las comunidades de manglar; los manglares acumulan grandes cantidades de materia orgánica en sus sedimentos por lo que se vuelven anóxicos, la liberación de P se produce bajo tales condiciones altamente reductoras (Hernández-Terrones et al. 2011).

En el SLN la concentración mediana de PO_4^{3-} fue mayor en temporada de secas que en temporada de lluvias probablemente por efecto de dilución lo cual podría explicar la baja concentración y el comportamiento de los fosfatos en el SLN. A diferencia del N, la eliminación parcial de los PO_4^{3-} en el agua subterránea se ha reportado para los sustratos carbonatados (Lapointe et al. 1990). El PO_4^{3-} adsorbe y coprecipita con el carbonato de calcio y/o apatita mineral; adicionalmente el PO_4^{3-} puede ser removido por adsorción sobre óxidos de hierro (II), hierro (III) y aluminio (III) (Lapointe et al. 1990).

Por otra parte los nutrientes orgánicos constituyen una fuente alterna de nutrientes para los pastos en estos sistemas costeros pero típicamente no son considerados en los balances elementales. Un estudio reciente mostró que la concentración de N orgánico aportado por aguas subterráneas a través de los manantiales a la costa de Puerto Morelos, Q.Roo (un sitio cercano a nuestra área de estudio), es cerca de tres veces mayor ($31.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$) que las especies de N inorgánico como el NH_4^+ ($9.7 \pm 1.01 \mu\text{M}$) y el NO_3^- ($0.16 \pm 0.02 \mu\text{M}$; Hernández-Terrones et al. 2011). Proporción similar que se aplica para el P orgánico ($0.77 \pm 0.07 \mu\text{M}$) comparado con la concentración de PO_4^{3-} ($0.32 \mu\text{M}$;

Hernández-Terrones et al. 2011). Aunque el aporte de nutrientes orgánicos no ha sido evaluado en nuestra área de estudio es muy factible que contribuyan con N y P al SLN y las zonas arrecifales.

Otras fuentes importantes de nutrientes nitrogenados al SLN y potencialmente en las zonas arrecifales son las descargas directas de aguas residuales residenciales y turísticas, y las descargas de las PTARs. Por ejemplo, Espinosa (2011) reportó la existencia de cuando menos 8 descargas ilegales de aguas residuales a la Laguna Bojórquez pero se considera que puede haber muchas más. Si bien las tres PTARs no vierten directamente agua tratada a la laguna, cuando ocurren lluvias que exceden la capacidad instalada de las PTARs, el agua sin tratar se desvía hacia la laguna (comunicación personal con personal de FONATUR). Las tres PTARs (Pok Ta Pok, Gucumatz y El Rey; Fig. 7) vierten parte del agua tratada en pozos de absorción de 100m de profundidad; las concentraciones típicas de nutrientes en el agua tratada son de ~0.1 mg/L de NO_3^- (<0.001 mg/L de nitritos), fósforo total de entre 0.4 - 5.2 mg/L y nitrógeno Kjeldahl (amonio + nitrógeno orgánico) entre 1.7 a 17.5 mg/L (Laboratorio-Conquimex 2018). El potencial impacto de estas plantas como fuente de nutrientes al SLN puede calcularse haciendo algunas suposiciones simplificadas. Si consideramos que la laguna (SLN) es un sistema cerrado y la única entrada de N es el agua tratada con una concentración de N Kjeldahl constante y todo el N orgánico es remineralizado a NH_4^+ , entonces con aporte del 30% del agua tratada a los pozos de absorción en cada PTARs, se requerirían 178 días para alcanzar una concentración de NH_4^+ de $9.04\mu\text{M}$, que es la concentración mediana en la laguna de los meses lluviosos. El tiempo de residencia del agua en la laguna ha sido calculado en 1.94 años (Merino et al. 1990), lo que sugiere que de llegar estos nutrientes de las aguas tratadas al SLN serían un factor significativo que contribuiría en mantener las concentraciones tan elevadas de N disuelto (particularmente del NH_4^+).

4.1.2 Las zonas arrecifales

Las concentraciones medias de NID en las zonas arrecifales de Cancún e Isla Mujeres fueron mayores a otras zonas arrecifales sin influencia antropogénica al norte del Caribe mexicano (Fig. 3 a y b; Mendoza 2012). Esto sugiere un proceso de dispersión hacia la costa de nutrientes nitrogenados provenientes de las zonas urbanizadas principalmente en los meses con mayores lluvias. En contraste con el NID, las concentraciones medias de PO_4^{3-} son similares a las encontradas en la zona arrecifal más

prístina (Fig. 3 a y b; Mendoza 2012). Herrera-Silveira et al. (2015) realizaron el monitoreo de las condiciones de la columna de agua en las mismas zonas arrecifales (de 2008 a 2014) en el cual se observa poca variabilidad entre temporada de lluvias y de secas. La concentración mediana de NO_3^- en IM en época de lluvias fue de $1.22 \mu\text{M}$ ($n=90$) y en época de secas de $1.30 \mu\text{M}$ ($n=105$), en PC-PN en la época de lluvia de $1.17 \mu\text{M}$ ($n=204$) y en época de seca de $1.45 \mu\text{M}$ ($n=238$; Herrera-Silveira et al. 2015). Estos resultados indican un ligero incremento de las concentraciones de NO_3^- en los meses secos en ambas zonas. En nuestro estudio la mediana de las concentraciones de NO_3^- fueron ligeramente menores a las reportadas por Herrera-Silveira et al.(2015); en IM se presentó un aumento significativo en la concentración mediana en meses secos ($0.87 \mu\text{M}$) comparado con los meses lluviosos ($0.49 \mu\text{M}$) y aunque PC-PN también mostró una concentración mediana de NO_3^- ($0.76 \mu\text{M}$) mayor durante los meses secos que en los meses lluviosos ($0.54 \mu\text{M}$) no hubo una diferencia significativa (Fig. 3 a y b). El incremento en la concentración mediana de NO_3^- en IM durante los meses secos no parece ser una consecuencia de un aumento en la nitrificación puesto que la concentración de NH_4^+ no presentó diferencias significativas entre ambas épocas (mediana $1.02 \mu\text{M}$ meses secos, $1.0 \mu\text{M}$ meses lluviosos).

Los datos de nutrientes reportados para los meses secos son promedios de muestreos realizados en mayo y principios de junio justo cuando la surgencia de Yucatán alcanza su intensidad máxima (abril-junio; Merino 1997). El agua de surgencia tiene altos contenidos de NO_3^- ($8-14 \mu\text{mol l}^{-1}$) y PO_4^{3-} ($1.2- 1.7 \mu\text{mol l}^{-1}$; Merino 1997). La dominancia de NO_3^- ($f \geq 0.5$) en los meses secos en las zonas arrecifales, además del aumento significativo de la concentración mediana de NO_3^- en IM, pueden ser consecuencia de la influencia de la mezcla del agua de la surgencia de Yucatán con el agua superficial del Caribe.

La concentración mediana de PO_4^{3-} fue estadísticamente diferente entre temporadas con una mediana ligeramente mayor durante los meses secos ($0.26 \mu\text{M}$) en comparación con los en meses lluviosos ($0.23 \mu\text{M}$) tanto en PC-PN como en IM ($0.25 \mu\text{M}$ en meses secos y $0.22 \mu\text{M}$ en meses lluviosos), lo que sugiere que también el PO_4^{3-} encontrado en primavera en las zonas arrecifales pudieran ser influenciado por agua de la surgencia de Yucatán (Fig. 3 a y b). Aunque las concentraciones de PO_4^{3-} también pueden ser afectadas por los aportes de PO_4^{3-} de los manantiales submarinos, en temporada lluviosa el efecto de dilución puede contribuir a explicar el comportamiento de los PO_4^{3-} en las zonas arrecifales al igual que en el SLN.

A diferencia de IM, en PC-PN la concentración mediana de NH_4^+ fue significativamente mayor en meses lluviosos ($1.65\mu\text{M}$) comparada con los meses secos ($0.56\mu\text{M}$). De acuerdo con Herrera-Silveira et al. (2015), la concentración mediana de NH_4^+ en IM fue de $0.52\mu\text{M}$ en época seca y $0.44\mu\text{M}$ en época de lluvia, mientras que en PC-PN fueron de $1.28\mu\text{M}$ en seca y de $1.32\mu\text{M}$ en época lluviosa, estos resultados indican que las lluvias no afectan de manera importante de las concentraciones de NH_4^+ como el detectado en el presente estudio. El enriquecimiento con NH_4^+ en lugar de NO_3^- en la temporada húmeda es un fenómeno que ha sido documentado como resultado del transporte de las aguas residuales ricas en NH_4^+ a las aguas costeras cercanas (Lapointe et al. 1990; 2004). Lapointe et al. (2004) observaron las concentraciones más altas de NH_4^+ en el sitio costero afectado con aguas residuales tanto en época de secas ($1.64 \pm 1.41 \mu\text{M NH}_4^+$ vs $0.64 \pm 0.5 \mu\text{M NO}_3^-$) como en época de lluvias ($1.68 \pm 1.38 \mu\text{M NH}_4^+$ vs $0.34 \pm 0.19 \mu\text{M NO}_3^-$), donde encontraron las relaciones más bajas del coeficiente f ($f=0.21 \pm 0.12$), y estos resultados difirieron en un sitio más alejado de la costa donde el NO_3^- fue la especie dominante en ambos periodos. La dominancia del NH_4^+ ($f \leq 0.5$) en la columna de agua en las zonas arrecifales y las concentraciones significativamente mayores de NH_4^+ en PC-PN en los meses lluviosos (Fig. 3 a y b) apoya la hipótesis que el enriquecimiento de nutrientes es causado por las aguas residuales que ingresan a las aguas costeras cercanas principalmente en los meses con mayores precipitaciones, pero también en algunas estaciones de los meses secos, sobre todo en Punta Nizuc donde las tres estaciones establecidas ahí tenían dominancia de NH_4^+ . Al igual que en el SLN el agua de los manantiales submarinos puede ser una fuente potencial de NH_4^+ a las zonas arrecifales predominantemente en época de lluvias.

Además del aporte por medio los manantiales submarinos el agua subterránea de las playas (acuífero costero somero) también puede contribuir a las concentraciones de nutrientes a las zonas arrecifales. En el agua dulce subterránea de la playa en Cancún la concentración de NO_3^- fue de $233.6 \pm 163.2 \mu\text{M}$ mucho mayor que la de NH_4^+ de $9.0 \pm 9.08\mu\text{M}$, aunque también fue mucho mayor a la concentración de NO_3^- en el agua subterránea de la playa de Sian Ka'an ($26.9 \pm 76.9\mu\text{M}$). Por lo que la principal contribución de NID sería en forma de NO_3^- . Las concentraciones de PO_4^{3-} son similares entre ambas costas ($0.7 \pm 0.5\mu\text{M}$ en Cancún, $0.7 \pm 0.0\mu\text{M}$ Sian Ka'an; Null et al. 2014).

4.2 Variaciones temporales del contenido elemental y el $\delta^{15}\text{N}$

La composición isotópica de N ($\delta^{15}\text{N}$) en las hojas de *T. testudinum* reveló diferencias estacionales significativas (IC de 80%) para los sitios arrecifales. En Isla Mujeres se encontraron valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$ en octubre comparados con junio mientras que en Punta Cancún se determinó lo contrario, el $\delta^{15}\text{N}$ fue significativamente más bajo en junio que en octubre (Fig. 6). En el SLN el $\delta^{15}\text{N}$ también fue más bajo en octubre que en junio, pero debido a la elevada dispersión observada en ambos periodos esta diferencia no fue significativa (Fig. 6). La marcada estacionalidad en el $\delta^{15}\text{N}$ y el contenido de N en *T. testudinum* es típica en estos ecosistemas (Fourqurean et al. 2005). A pesar de ser una región tropical se ha observado una considerable variabilidad estacional en el crecimiento de los pastos mostrando mayores tasas de crecimiento en verano, cuando se observan mayores abundancias de *T. testudinum*, comparadas con el invierno (Fourqurean et al. 2001). La razón C:N mostró ser ligeramente más baja en octubre con respecto a junio pero no presentaron diferencias significativas en ninguna de las áreas (Fig. 4).

Las causas más probables de la variación estacional en los valores del $\delta^{15}\text{N}$ son la variabilidad en el $\delta^{15}\text{N}$ de la fuente de NID o diferencias estacionales en el fraccionamiento del NID durante la absorción y transformación (McCusker et al. 1999 Fourqurean et al. 2005; Anderson y Fourqurean 2003). Típicamente las tasas metabólicas están inversamente relacionadas con la discriminación isotópica (Walton et al. 2016). Por ejemplo, los valores más altos del $\delta^{15}\text{N}$ durante el verano pueden ser una consecuencia de la reducción en el fraccionamiento (Fourqurean et al. 2005). Una evidencia para respaldar este mecanismo hipotético es la relación entre C: N y $\delta^{15}\text{N}$; a medida que aumenta la C: N, lo que indica una menor disponibilidad de N, el $\delta^{15}\text{N}$ también aumentan (Fourqurean et al. 2005). Sin embargo en el norte del Caribe mexicano encontramos una relación contraria al disminuir la razón C: N observamos un ligero aumento en el $\delta^{15}\text{N}$, que puede ser resultado de que la razón C: N no varía de manera significativa entre primavera (junio) y otoño (octubre). Por tanto las diferencias en el $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos de las zonas arrecifales pueden ser debidas a un potencial cambio en la fuente de NID, que encubren las diferencias en el metabolismo.

4.3 Variaciones espaciales del $\delta^{15}\text{N}$

El contenido de N en las hojas de los pastos mostró una correlación positiva y significativa con el $\delta^{15}\text{N}$ y a su vez el contenido de N en los pastos se correlacionó con la concentración del NID independientemente de la temporada, por lo que de manera general, las variaciones espaciales en el $\delta^{15}\text{N}$ no parecen depender de la disponibilidad del NID sino que refleja diferencias en la relación $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ de las diversas fuentes de N. Yamamuro et al. (2003) también encontraron una correlación altamente significativa entre el contenido de N y el $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de pastos marinos, y aunque no determinaron la concentración de NID asumen que el aumento en el contenido de N en la hoja se debe a un aumento de la entrada de N disuelto con valores altos del $\delta^{15}\text{N}$.

En general se ha observado que los pastos muestran valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$ comparadas con la fuente de N; la discriminación del isótopo más pesado (^{15}N) ocurre cuando el suministro de N excede la demanda de la planta, y este mismo efecto se observa con la edad de la planta (Evans 2001). En las muestras de pastos colectadas en el SLN (excepto en L00) las hojas de *T. testudinum* mostraron contenidos de N y una proporción C:N que no indican una limitación de este nutriente, contrario a lo observado en las zonas arrecifales durante ambos periodos (Fig. 5). Aunque no es posible determinar con precisión la edad de las hojas, descartamos la edad como una posible fuente de variación en el grado de discriminación del ^{15}N al seleccionar solo las hojas verdes y parecidas en tamaño.

En el SLN las concentraciones de NH_4^+ fueron mucho más elevadas que las de NO_3^- en casi todas las estaciones, con excepción de las estaciones ubicadas en las entradas Nizuc (L00) y Cancún (L11) durante los meses secos. A pesar de que *T. testudinum* puede utilizar tanto NH_4^+ como NO_3^- existe una preferencia por la fuente reducida, es decir NH_4^+ sobre NO_3^- (Lee y Dunton 1999). Bajo este escenario es de esperar que los valores del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas sean similares o menores al $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ debido al fraccionamiento bajo condiciones no limitantes de N (Fig. 9). En la estación L00 el N fue limitante por tanto se espera que los pastos marinos utilicen ambas especies de NID de manera indiscriminada y que el $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas resulte de una mezcla del $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ y del $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ en ambas temporadas (Fig. 9). En el sitio L11 debido a las concentraciones similares de NH_4^+ y NO_3^- durante condiciones secas el $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas potencialmente refleja una mezcla de $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ y $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ mientras que en periodos de lluvia puede reflejar el $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ (Fig. 9).

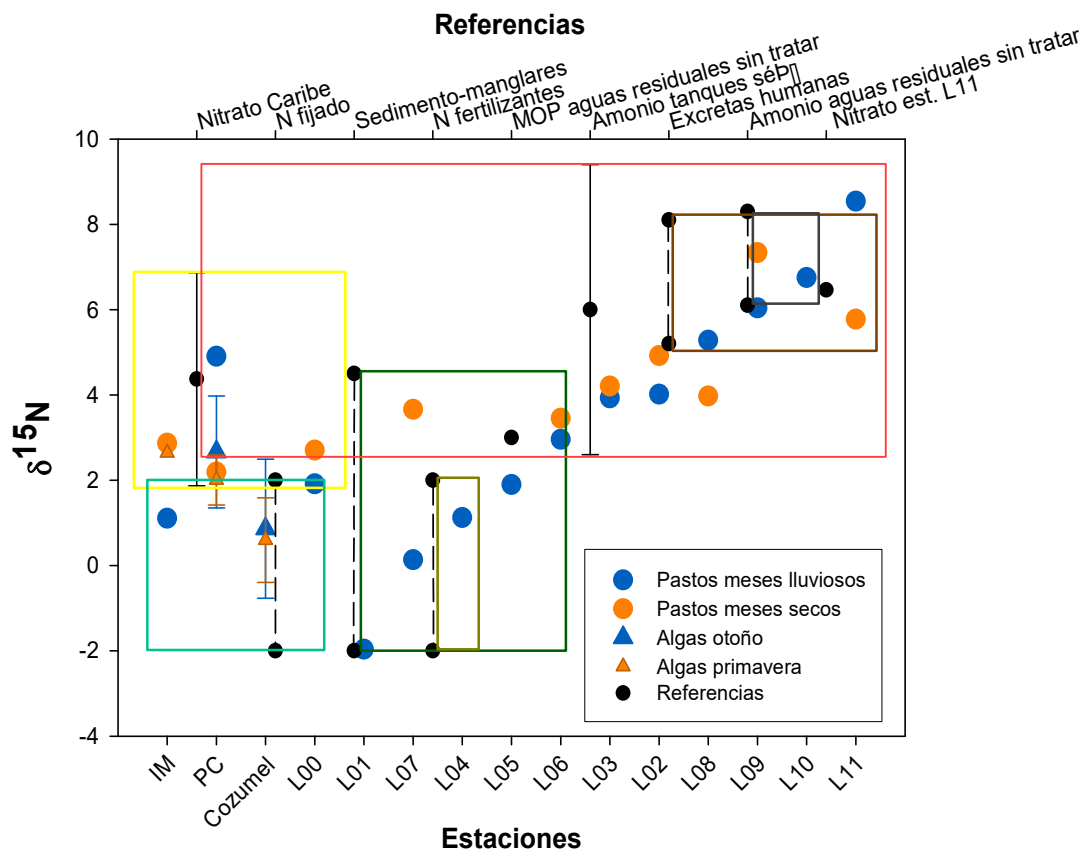


Fig. 9. Valores del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de los pastos marinos en cada estación de muestro, para meses secos y meses lluviosos. Referencia en la parte superior; nitrato Caribe (amarillo) media de $4.37 \pm 2.5\text{‰}$ (Carriquiry et al. 2017); N fijado (azul claro) de -2 a 2‰ (Fry 2006); Material Orgánico Particulado (MOP) de aguas residuales sin tratar de 3‰ (Tucker et al. 1999); sedimento de manglares (verde oscuro) de -2 a 4.5‰ (Gonneea et al. 2004); fertilizantes sintéticos (verde seco) entre -2 y 2‰ (Bateman y Kelly 2007) amonio de tanques sépticos (rojo) media de $6 \pm 3.4\text{‰}$ (McClelland y Valiela 1998); excretas humanas (café) entre 5.2 y 8.1‰ (Kuhnle et al. 2013); amonio aguas residuales sin tratar (gris) entre 6.1 - 8.3‰ (Tucker et al. 1999); nitrato estación L11 de 6.46‰ (Carriquiry et al. 2017). Datos de algas de Carriquiry et al. (2017).

4.3.1 Composición isotópica de las fuentes de nitrógeno

Otros estudios han utilizado el $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ para marcar diferencias en las cuencas hidrográficas de zonas costeras afectadas por los aportes de fosas sépticas y cuencas relativamente prístinas en la bahía de Waquoit, donde el NH_4^+ parece tener menos variación por lo que los valores $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ son más parecidos entre sitios prístinos e impactados (McClelland y Valiela 1998). Si esto es generalmente aplicable diferenciar la firma isotópica del NH_4^+ de fuentes naturales y de las fosas sépticas se complica. El N inorgánico vertido de los tanques sépticos se encuentra predominantemente en forma de

NH_4^+ con valores $\delta^{15}\text{N}$ de $\sim 6\text{‰}$ (McClelland y Valiela 1998). Estos autores midieron valores de $\delta^{15}\text{NH}_4^+ \sim 6 \pm 3.4\text{‰}$ en las aguas subterráneas que ingresan al río Childs en Bahía Waquoit, en la costa este de EUA, una cuenca impactadas con efluentes de fosas sépticas (Fig. 9).

En el lado este del SLN se encuentra un desarrollo turístico muy importante con una gran cantidad de restaurantes, hoteles y fraccionamientos donde se han identificado un elevado número de descargas directas ilegales (Espinosa 2011). Para detectar las descargas directas de aguas residuales se tomaron de referencia los valores del $\delta^{15}\text{N}$ de las heces y orina humana. Se sabe que el N en las excretas humanas se encuentra principalmente en forma de urea que tiende hidrolizarse en amoníaco (Heaton 1986). Valores medidos del $\delta^{15}\text{N}$ en heces y orina humana varían con la dieta pero se encuentran entre 5.2 y 8.1‰ cuando la base de la dieta es carne y pescado (Kuhnle et al. 2013). Otros autores han reportado valores del $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ entre 6.1 y 8.3‰ en aguas residuales sin tratamiento, similares a lo publicado por (Kuhnle et al. 2013), y estos valores también podrían ser útiles como referencia para detectar la potencial influencia de las descargas residuales directas (Fig. 9).

En el tratamiento de aguas residuales Munksgaard et al. (2017) han mostrado que la composición isotópica del N varía de acuerdo con el grado de tratamiento, pero también entre el N disuelto o particulado. Por ejemplo, en efluentes de tratamientos secundarios y terciarios, el N particulado muestra variaciones del $\delta^{15}\text{N}$ entre ~ 2 a 17‰ y de ~ 12 a 23‰ para el N disuelto (Munksgaard et al. 2017). En los efluentes con tratamiento secundario el $\delta^{15}\text{NO}_x$ fue de 4.1 ‰ y el $\delta^{15}\text{NH}_3$ de 26.1‰ (Munksgaard et al. 2017). Es de esperar que la mineralización del material particulado de los efluentes genere productos, como el NH_4^+ , con valores $\delta^{15}\text{N}$ similares (Heaton 1986; McCusker et al. 1999), por tanto potencialmente podrían usarse como referencias los valores $\delta^{15}\text{NH}_4^+$. Sin embargo los intervalos tan amplios en la composición isotópica de estos productos limita la capacidad de diferenciarlos claramente de otras fuentes de N.

Los ecosistemas de manglares constituyen una importante fuente de carbono orgánico y nutrientes para los sistemas costeros adyacentes (Gonneea et al. 2004). Estos autores estudiaron tres lagunas en la costa oeste de la Península de Yucatán cuyas especies de mangle dominantes son *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa*, especies de mangle que también se encuentran en el SLN (SEMARNAT-CONANP 2014) y en IM (SEMARNAT-CONANP 2016). En su estudio midieron la composición isotópica en los sedimentos con influencia de manglares; en la

laguna Celestum en un sitio con manglares marginales (estación 16) se encontraron valores del $\delta^{15}\text{N}$ de $\sim 4.5\text{‰}$ a 17cm de profundidad con una contribución de MO de mangle de 60%, que disminuyó hasta $\sim -1\text{‰}$ a medida que aumentó la proporción de MO de mangle a 70% y la profundidad (hasta 27cm). Y en Laguna Términos, un sitio natural en un estero de manglares (estación 7), el $\delta^{15}\text{N}$ fue de $\sim 3\text{‰}$ con una proporción entre $\sim 44\text{-}62\%$ de MO del mangle en los primeros 15cm, y disminuyó hasta -2‰ a una profundidad de 22 cm con una contribución de MO de mangle de $\sim 82\%$. Considerando que en entornos similares a estas lagunas, como es el caso del SLN, las características de los sedimentos son similares por lo que se utilizó el intervalo del $\delta^{15}\text{N}$ de -2 a 4.5‰ como valores de referencia para identificar N proveniente de manglares (Fig. 9).

El proceso de fijación de N (N_2) atmosférico es la ruta dominante de captura N en el océano. Comúnmente se asume que fijación de N_2 en el medio marino es insignificante cuando las concentraciones de NO_3^- y/o NH_4^+ exceden $1\text{ }\mu\text{M}$ debido al costo energético adicional asociado con la asimilación de N_2 (Knapp 2012). Sin embargo, Knapp (2012) mostraron que aún bajo concentraciones elevadas de NO_3^- y/o NH_4^+ el proceso de fijación de N_2 puede continuar con tasas sustanciales hasta con concentraciones de $30\text{ }\mu\text{M}$ de NO_3^- y $200\text{ }\mu\text{M}$ de NH_4^+ . Por otro lado, se ha estimado que en entornos de arrecifes oligotróficos la fijación de N puede ser fuente principal de N a estos ecosistemas (Yamamuro et al. 2003), donde la fijación de N produce valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre -2 a 2‰ (Fry 2006; Fig. 9). Otro proceso que puede aportar N con una señal isotópica similar a la fijación es la contribución de N proveniente de los fertilizantes (Bateman y Kelly, 2007); aunque en toda la región circundante al SLN y las zonas arrecifales no existe áreas de cultivo que empleen fertilizantes de manera importante (CONABIO 2016), en las inmediaciones del SLN se encuentran 4 campos de golf que posiblemente si utilicen fertilizantes por lo que consideramos la contribución de N proveniente de esta fuente (Fig. 9).

Debido a que existe una superposición de las señales isotópicas de las distintas fuentes potenciales de N dentro del SLN, la variabilidad del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas son interpretadas en función de la relación con la salinidad (como una medida del aporte de agua dulce), el NID (disponibilidad de N) y el contenido de N en las hojas de pastos marinos (como medida de limitación).

4.3.2 Caracterización espacial

En las zonas arrecifales la clasificación cualitativa de la salinidad se mantuvo en niveles muy altos y el NID en niveles muy bajos en ambos periodos (Fig. 7). Esto indica que la cantidad de N aportado por escorrentía superficial y subterránea no modificó la clasificación relativa de las zonas arrecifales durante el periodo de lluvias; sin embargo la especie de N dominante varió de acuerdo con la temporada. El NO_3^- fue la especie dominante de NID en los meses secos ($2.25 \mu\text{M NO}_3^-$ vs $1.13 \mu\text{M NH}_4^+$ en IM; $0.53 \mu\text{M NO}_3^-$ vs $0.49 \mu\text{M NH}_4^+$ en PC) especialmente en IM. El promedio de $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ para las zonas arrecifales del norte del Caribe es de $4.37 \pm 2.5\text{‰}$ (Carriquiry et al. 2017), comparando contra el $\delta^{15}\text{N}$ las hojas de 2.19‰ en PC y 2.86‰ en IM. Considerando que las hojas de los pastos marinos puede adquirir el N tanto del NH_4^+ como del NO_3^- (Lee y Dunton 1999), nuestros resultados sugiere que la composición isotópica de las hojas es afectada principalmente por los NO_3^- en IM y posiblemente ambas especies son fuente de N en los pastos de PC que se refleja en el valor más bajos del $\delta^{15}\text{N}$ (Fig. 9). En los meses lluviosos el NH_4^+ fue la especie dominante (media de $1.8 \mu\text{M NH}_4^+$ vs $0.43 \mu\text{M NO}_3^-$ en IM; $1.6 \mu\text{M NH}_4^+$ vs $0.54 \mu\text{M NO}_3^-$ en PC), el promedio del $\delta^{15}\text{N}$ en IM paso de tener una clasificación media a una baja con 1.1‰ y de una clasificación baja a una alta con 4.91‰ en PC (Fig. 7). En PC el valor promedio de $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de pastos marinos durante la época de lluvias se encuentra dentro del intervalo para el $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ proveniente de tanques sépticos, y muy próximo al del $\delta^{15}\text{N}$ para para heces y orina humana, y NH_4^+ de aguas residuales sin tratamiento (Fig. 9). En IM durante la época de lluvias, el valor de $\delta^{15}\text{N}$ sugiere que la fijación de N puede ser la fuente principal de N (Fig. 9).

Un estudio previo mostró que el $\delta^{15}\text{N}$ en las macroalgas de las zonas arrecifales de Punta Cancún, Isla Mujeres y Colombia en Cozumel exhibieron valores de $\delta^{15}\text{N} < 3\text{‰}$, excepto en algunas macroalgas de Punta Cancún en otoño (Fig. 9). Evidencias han mostrado que las macroalgas que crecen bajo una afectación crónica por el aporte de N proveniente de aguas residuales presentan valores de $\delta^{15}\text{N}$ típicamente $> 3\text{‰}$ (Costanzo et al. 2001; Lapointe et al. 2004), lo que también sugiere un impacto por descargas de aguas residuales no tratadas en PC durante los meses lluviosos.

Durante el periodo de secas dentro del SLN, específicamente en la estación L11 ubicada cerca de la boca de la laguna en la cuenca norte, se detecta la influencia de agua del mar Caribe caracterizada por alta salinidad y muy bajas concentraciones de NID (Fig. 7) además que la concentración de NO_3^- fue mayor que la de NH_4^+ (medias de $1.23 \mu\text{M}$

contra $0.94 \mu\text{M}$), similar a las zonas arrecifales. Sin embargo a diferencia de las zonas arrecifales el contenido de N en las hojas fue muy alto, lo que señala que las hojas de los pastos pueden almacenar N durante condiciones de alta carga de N que no se detectaron en la columna de agua en esta temporada. El valor promedio del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de los pastos en este sitio fue de 5.77‰ clasificado como alto y similar al $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ de 6.46‰ (Fig. 9) medido en esta misma estación por Carriquiry et al. (2017). En los meses lluviosos el NID pasó de una clasificación muy baja a baja, sin embargo la concentración de NID aumentó hasta $7.43 \mu\text{M}$ en L11. La especie dominante de NID fue el NH_4^+ en esta estación y en L10 a 1.2km de distancia ($4.38 \mu\text{M}$ vs $2.04 \mu\text{M}$ en L10 y $5.86 \mu\text{M}$ vs $1.57 \mu\text{M}$ en L11). La salinidad fue clasificada como media en L11 y baja en L10; aún en los meses lluviosos la estación cercana a la entrada (L11) del SLN tiene influencia del mar Caribe, esto se infiere por la salinidad media. El contenido de N en la hoja de los pastos se mantiene muy alto tanto en L11 y L10 señalando nuevamente que los pastos marinos integran las señales cambiantes de la columna de agua. El $\delta^{15}\text{N}$ aumentó a muy alto con el valor medio más alto de todo el estudio en L11 de 8.54‰ , y 6.75‰ en L10 (Fig. 7).

Un estudio donde emplean un modelo para el SLN muestra una dispersión eficiente desde la laguna Bojórquez y la zona noroeste de la cuenca norte con vientos del noreste y se concluye que viento es el principal responsable de la dispersión de contaminantes en el SLN (Carbajal et al. 2009). El modelo muestra también que las partículas que se esparcen a partir de la boca sur de la laguna Bojórquez (ver Fig. 7) después de 3 días alcanzan la cuenca centro y después de 8 días llegan hasta la cuenca sur, mientras que el transporte de las partículas que se dispersan desde el noroeste del SLN ocurre principalmente hacia el este, después de 3 días las partículas se esparcen por la cuenca norte y después de 8 días las partículas se encuentran en prácticamente todo el sistema lagunar (Carbajal et al. 2009). En base a este modelo se sugiere que la parte norte de la cuenca norte tiene influencia del agua subterránea que fluye a través de los cuatro manantiales ubicados en el lado poniente de esta cuenca, con valores típicamente altos del $\delta^{15}\text{N}$ ($>6\text{‰}$) que sugiere el aporte de NH_4^+ de tanques sépticos y/o aguas residuales sin tratar (Fig. 9). La cuenca norte posiblemente reciba el agua de las fosas sépticas del centro de la ciudad de Cancún así como descargas directas. Sin embargo durante los meses de secas el potencial impacto de estos desechos se aminora (se reduce el valor del $\delta^{15}\text{N}$) debido a la influencia de NO_3^- de agua del mar.

En el límite sureste de la cuenca norte (estación L09) durante el periodo de secas el NID mostró una clasificación relativa media donde la concentración de NH_4^+ (8.46 μM) fue mucho mayor a la concentración de NO_3^- (1.83 μM), la salinidad fue alta, el contenido de N en las hojas fue alto y el $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 7.33‰ fue el valor medio más alto de esta temporada. En contraste durante el periodo de lluvias la salinidad disminuye a clasificación baja al mismo tiempo que el NID aumenta a alto, la concentración de NH_4^+ (9.64 μM) también fue mucho mayor a la de NO_3^- (3.3 μM). El incremento en la concentración de NID durante las lluvias no tiene un efecto importante sobre el contenido de N en las hojas ya que al igual que el periodo de secas se mantiene como alto, sin embargo el $\delta^{15}\text{N}$ disminuye ligeramente (de 7.33 a 6.04‰). La estación L09 que se encuentra muy cerca de potenciales fuentes identificadas (restaurantes) mostró un valor del $\delta^{15}\text{N}$ más bajo durante el periodo de lluvias comparados al de secas, estos valores se encuentran dentro del intervalo para excretas humanas y aguas residuales sin tratar (Fig. 9). El límite sureste de la cuenca norte potencialmente también recibe N del agua proveniente de la laguna Bojórquez (Carbajal et al. 2009) que tiene un gran desarrollo turístico y hotelero. Además de la influencia de los cuatro manantiales ubicados en el límite poniente (Merino-Ibarra 1999; Carbajal et al. 2009) durante ambos periodos, pero principalmente en los meses lluviosos (salinidad baja).

En la cuenca centro existe 16 manantiales submarinos ubicados en el lado poniente (Carbajal et al. 2009) que aportan agua dulce y potencialmente N, su influencia se extiende hasta el lado oriente de esta cuenca (estaciones L07 y L08). Durante la época de secas la influencia de los manantiales se observa con una disminución ligera de la salinidad (clasificada como alta) en comparación con la salinidad muy alta de la entrada a la laguna (estación L11). El NID se clasifica como medio y la especie dominante del N fue el NH_4^+ (medias de 7.11 vs 1.49 μM en L07; 8.08 vs 1.17 μM en L08). Los valores medios del $\delta^{15}\text{N}$ de 3.66‰ en L07 y de 3.97‰ en L08 fueron ~4‰ más bajos que los pastos de L09 (Figs. 7 y 9). Durante los meses secos los valores del $\delta^{15}\text{N}$ caen en el intervalo para el NH_4^+ proveniente de tanques sépticos (Fig. 9) aunque el aporte de agua subterránea durante estos meses afecta muy poco la salinidad. Durante los meses lluviosos el agua dulce disminuyó la salinidad a baja y aumentó la concentración de NID a muy alta; el NH_4^+ también fue mucho mayor que el NO_3^- en esta temporada (medias 14.65 vs 0.25 μM L07; 14.14 vs 0.18 μM L08). El incremento en las concentraciones de NID en los meses lluviosos elevó el contenido de N en las hojas de alto a muy alto; el $\delta^{15}\text{N}$ aumentó a 5.28‰ en L08 mientras que en L07 el valor medio $\delta^{15}\text{N}$ disminuyó hasta 0.14‰ (Fig. 9).

Durante la temporada de lluvias es posible observar el efecto del agua subterránea en L08 ya que el valor del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas se aproxima al valor medio del $\delta^{15}\text{N}$ para amonio de tanques sépticos. A pesar de la cercanía de la PTARs Gucumatz a la estación L08, el valor del $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas en ambos periodos es muy bajo comparado con el intervalo para el $\delta^{15}\text{N}$ del N disuelto para tratamientos secundarios (Munksgaard et al. 2017). Una disminución tan importante en los valores del $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos de L07 durante los meses lluviosos se puede explicar como resultado de valores bajos del $\delta^{15}\text{N}$ del N aportado en la escorrentía superficial proveniente de los manglares y/o un mayor fraccionamiento por parte del pasto marino.

Durante los meses de secas en la cuenca sur las salinidades fueron muy altas (35.42 en L06 más alejada de la entrada y 36.14 en L02), donde se hace notar la influencia del agua marina entrado por la boca sur. Las concentraciones de NID se clasificaron como bajas con el NH_4^+ como especie dominante (medias de 6.88 vs 0.51 μM L06 y 4.52 vs 0.52 μM L02). El valor del $\delta^{15}\text{N}$ de los pastos en L06 de 3.45‰ es ligeramente menor al $\delta^{15}\text{N}$ en L07, ambas estaciones se establecieron en un canal que conecta la cuenca sur y centro (ver Fig. 7), mientras que el $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos de L02 tuvo clasificación alta con 4.92 ‰. Tanto en L06 como L02 los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se encuentran dentro del intervalo de la señal del $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ de tanques sépticos en temporada de secas. De hecho el $\delta^{15}\text{N}$ en pastos de L02 durante este periodo se encuentra dentro del intervalo para excretas humanas (Fig. 9) y se ubica cercana a una fuente potencial de descargas directas.

Durante la época de lluvias en la estación L06 la salinidad se redujo a clasificación baja y el NID aumento a muy alto (15.59 μM) pero sin un efecto aparente en los pastos ya que el contenido de N en la hoja permaneció alto y el $\delta^{15}\text{N}$ con clasificación media (2.96 ‰). Esto indica que aun cuando el NID cambió drásticamente entre la época de lluvias y secas los pastos de L06 solo mostraron cambios menores en el contenido de N, lo que señala nuevamente a los pastos marinos como integradores a largo plazo de las condiciones de NID cambiantes en la columna de agua. En la estación L02 la salinidad se clasificó como media lo que indica una cierta influencia de la entrada de agua de exterior del SLN aún en los meses lluviosos, aunque la concentración de NID fue clasificada como baja (5.50 μM) es más alta que en las zonas arrecifales (muy bajo) y el NH_4^+ fue la especie dominante (4.6 μM vs 0.91 μM de NO_3^-). En este sitio (L02) el contenido de N en las hojas de los pastos fue alto y el $\delta^{15}\text{N}$ mostró una clasificación media (4‰). Tanto en L06 como L02 los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se encuentran dentro del intervalo de la señal del

$\delta^{15}\text{NH}_4^+$ de tanques sépticos en ambos periodos, de hecho el $\delta^{15}\text{N}$ en pastos de L02 durante los meses de secas está dentro del intervalo para excretas humanas (Fig. 9) y se ubica cercana a una fuente potencial de descargas directas. En época de lluvias la cuenca sur presenta una influencia del agua subterránea proveniente de tres manantiales ubicados en la cuenca Río Inglés (Carbajal et al. 2009), del escurrimiento superficial de los humedales que circundan a esta cuenca (ver Fig. 7) y de la entrada sur, esto puede observarse en la estación L05 ubicada en la entrada a la cenca Río Inglés donde la salinidad medida de 18.75 fue la más baja. El NID en esta estación fue alto (13.02 μM) al igual que en L04 (13.71 μM) que se encuentra cerca de la PTARs “El Rey”. El contenido de N en las hojas de pastos de L05 y L04 fue alto y el $\delta^{15}\text{N}$ fue bajo con un valor promedio de 1.9‰ en L05 y 1.12‰ en L04. Estos resultados sugieren que la influencia de los aportes de N a partir de los efluentes de las PTAR es insignificante o indetectable durante este periodo. La estación L04 se estableció en las inmediaciones de un campo de golf por lo que potencialmente puede estar recibiendo N proveniente de la escorrentía de los fertilizantes aplicados para el crecimiento del pasto (Fig. 9).

La estación L01, situada en el canal de la entrada sur, mostró una salinidad media durante la temporada de lluvias, la concentración de NID fue baja con NH_4^+ como especie dominante (3.97 μM vs 1.63 μM de NO_3^-) lo que sugiere un aporte de N no marino. El contenido de N en las hojas se clasificó como medio, sin embargo el $\delta^{15}\text{N}$ en las hojas de los pastos fue el más bajo de todo el estudio con un valor medio de -1.96‰. Se ha mostrado que en los cuerpos de agua del Río Inglés y la cuenca sur la escorrentía de los humedales es muy importantes (Merino et al. 1990). Las estaciones L01, L04 y L05 situadas en la cuenca sur se encuentran próximas a las áreas de manglares donde el agua proveniente de escorrentías potencialmente constituye la fuente principal de N; los valores del $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos se encontraron dentro de los valores reportados para sedimentos de manglares en la Península de Yucatán (Gonneea et al. 2004; Fig. 9). Los valores tan bajos de $\delta^{15}\text{N}$ (<0‰) observados en la cuenca sur, aunque poco comunes, han sido observados en otros sitios como las costas de Qatar donde el $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos varían entre +2.95 a -12.39‰ (Walton et al. 2016) y en las costas de Bermuda donde se han reportado valores extremos entre +8.8 y -10.6‰ (Fourqurean et al. 2015).

En la estación L03 situada en una pequeña laguna semicerrada conectada a la cuenca sur, frente al complejo turístico Mediterraneé, durante la temporada seca la salinidad de 37.3 fue clasificada como muy alta, inclusive fue mayor que la salinidad típica del agua superficial del Caribe adyacente (salinidad 36.3-36.4; Merino 1997) sugiriendo

una alta evaporación y poca circulación. En este sitio la concentración de NID fue baja al igual que L02, la concentración de NH_4^+ (4.29 μM) fue mayor que el NO_3^- (0.87 μM), y el valor del $\delta^{15}\text{N}$ en las hoja de los pastos (4.20‰) fue ligeramente menor que en L02. Durante el periodo de lluvias el valor de los parámetros medidos en L03 tuvieron la misma clasificación cualitativa que L02, *i.e.* salinidad media, NID bajo (4.88 μM), contenido de N en la hoja alto y $\delta^{15}\text{N}$ medio (3.93‰). La relación entre ambos sitios sugiere que representan las características de la zona; los valores del $\delta^{15}\text{N}$ en los pastos se encuentran dentro del intervalo $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ de tanques sépticos en ambas temporadas (Fig. 9).

La estación L00 localizada en la parte externa del canal de la entrada Nizuc es el único sitio del SLN que mostró un contenido de N considerado limitante para los pastos independientemente de las lluvias lo que sugiere poca o nula discriminación contra el ^{15}N (Fig. 5). En los meses secos la salinidad fue clasificada como muy alta y la concentración de NID como muy baja con marcada dominancia de NO_3^- (0.27 μM vs 0.08 μM de NH_4^+). El valor del $\delta^{15}\text{N}$ de la hoja fue de 2.7‰ muy similar a observado en los pastos de IM en esta temporada. Durante los meses lluviosos la salinidad disminuyó a media, el NID permanece clasificado como muy bajo aunque el valor de NID aumentó a 2.52 μM lo que se reflejó en un incremento en el contenido de N en las hojas; el NH_4^+ (1.77 μM) dominó sobre NO_3^- (0.75 μM) pero el $\delta^{15}\text{N}$ disminuyó a 1.91‰, lo que sugiere la presencia de N de escorrentía de manglares o de N fijado (Fig. 9).

Aunque el ACP (Tabla 3) mostró que durante octubre 2014 la variable $\delta^{15}\text{N}$ se relacionó únicamente con la concentración de PO_4^{3-} en la columna de agua, es decir mostraron cargas altas e inversas en el mismo componente, no fue posible encontrar una relación espacial clara puesto que las concentraciones de PO_4^{3-} son bastante constantes. En las tres áreas estudiadas la concentración media vario de 0.16-0.35 μM en meses lluviosos y de 0.22-0.50 μM en meses secos. Walton et al. (2016) en la bahía Al Khor, Catar, explicaron que el agotamiento del ^{15}N en los tejido de pastos marinos se debía a una fuerte limitación de P. Estos autores señalan que la limitación de P aumenta la oferta de N en relación con la demanda brindando una mayor oportunidad para la discriminación ^{15}N . Debido a que no se determinaron contenidos de P en las hojas de los pastos marinos no se puede indicar si están o no limitados por este nutriente y cuál es su relación con el $\delta^{15}\text{N}$. Se han encontrado valores de N:P tan altos como 160 en la columna de agua en ambientes de rocas carbonatadas sin embargo los valores de N:P de pastos marinos no están tan lejos del equilibrio estequiométrico (30-45; Fourqurean et al. 2015). Por tanto no

se cuenta con las pruebas suficientes para determinar que el P sea limitante para los pastos marinos en meses lluviosos en el área estudiada.

4.4 Composición de isótopos estables de nitrógeno en rizomas

Los pastos marinos pueden adquirir N inorgánico a través de las hojas y las raíces; aunque los tejidos de raíces y hojas contribuyen por igual (50 y 50%) al balance N de *T. testudinum* en una base anual hay diferencias estacionales con hasta 75% de absorción N por medio de la raíz en mayo y hasta 53% en octubre (Lee y Dunton, 1999). Una de las principales funciones de los rizomas en los pastos marinos es el almacenamiento de nutrientes (Kuo y den Hartog, 2006) por lo que se espera que el valor del $\delta^{15}\text{N}$ de los rizomas está influenciado por los valores $\delta^{15}\text{N}$ de las columna de agua y el sedimento. Debido a que no se detectaron diferencias significativas entre los valores del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas y los rizomas en ambas temporadas, no parece haber variaciones en la contribución relativa de las hojas y las raíces.

5. Conclusiones

En conjunto con la caracterización espacial y temporal de la salinidad, la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto y el contenido de nitrógeno de las hojas los pastos marinos se determinó que los valores del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas mayores a 3‰ señalaban la presencia de aguas residuales no tratadas (descargas directas) o parcialmente tratadas (sistemas de eliminación de aguas residuales in situ) dentro del Sistema Lagunar Nichupté y las zonas arrecifales de Isla Mujeres y Cancún tanto para la temporadas seca como lluviosa. El amonio fue identificado como la especie dominante de nitrógeno inorgánico disuelto en el agua subterránea que descarga en las costas de Cancún, lo que explica las mayores concentraciones de amonio que de nitrato dentro del Sistema Lagunar en ambas temporadas; excepto en las entradas, por lo tanto se utilizaron los valores del $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ de las fuentes de nitrógeno potenciales como valores de referencia, mientras que para las zonas arrecifales principalmente se utilizaron los valores del $\delta^{15}\text{NH}_4^+$ de las fuentes potenciales como referencias comparativas en la temporada lluviosa y los principalmente los valores $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ de las fuentes en la temporada seca, debido a que la dominancia de estas especies cambiaron en cada temporada. En base a lo anterior, dentro del Sistema Lagunar Nichupté durante la temporada seca se

encontraron evidencias de amonio de aguas residuales sin tratamiento y parcialmente tratadas en toda la laguna donde las hojas de los pastos marinos mostraron valores medios del $\delta^{15}\text{N}$ de 3.5 a 7.3 ‰; en la temporada lluviosa, el agua de escorrentía de los manglares encubre el efecto de las aguas residuales en la cuenca sur de la laguna donde las hojas mostraron medias del $\delta^{15}\text{N}$ de -2 a 3 ‰, excepto en dos estaciones muy cercanas a desarrollos turísticos (L02 y L03), mientras que la cuenca centro y norte continua presente el impacto con amonio de aguas residuales (medias del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 5.3- 8.5 ‰). En las zonas arrecifales durante la temporada seca no hay señales de aguas residuales (medias del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 2.2 y 2.9 ‰), sin embargo en la temporada lluviosa se detectó la presencia de nitrógeno de aguas residuales en Punta Cancún con un valor medio del $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas de 4.9 ‰. Estos resultados sugieren que las entradas de aguas residuales difusas y puntuales son una fuente importante de nitrógeno que sostiene la eutrofización. La escorrentía superficial y subterránea impulsada por las lluvias es el principal mecanismo que regula el impacto relativo del nitrógeno antropogénico en la laguna costera debido al largo tiempo de residencia del agua, mientras que en la laguna arrecifal influyen otros procesos como las corrientes regionales en la temporada seca.

Referencias

- Anderson, W. . and Fourqurean, J. . (2003) 'Intra- and interannual variability in seagrass carbon and nitrogen stable isotopes from south Florida, a preliminary study', *Organic Geochemistry*, 34(2), pp. 185–194. doi: 10.1016/S0146-6380(02)00161-4.
- Armitage, A. R. *et al.* (2005) 'Enrichment Nutrient Causes Complex Experimental Changes in in and Macroalgae Structure Seagrass, Microalgae, and Macroalgae Community Structure in Florida Bay', *Estuaries*, 28(3), pp. 422–434.
- Atkinson, A. M. J. and Smith, S. V (1983) 'C : N : P ratios of benthic marine plants', *Limnology and Oceanography*, 28(3), pp. 568–574.
- Babinger, F. (2012) 'El turismo ante el reto de peligros naturales recurrentes : una visión desde Cancún 1 Tourism facing the challenge of recurring natural hazards : a view from Cancún', pp. 75–88.
- Bateman, A. S. and Kelly, S. D. (2007) 'Fertilizer nitrogen isotope signatures', *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 43(3), pp. 237–247. doi: 10.1080/10256010701550732.
- Beddows, P. A. *et al.* (2002) 'Density stratified groundwater circulation on the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico', in Martin, J. B., Wicks, C. M., and Sasowsky, I. D. (eds) *Hydrogeology and Biology of Post-Paleozoic Carbonate Aquifers*. Vol. 7. Charles Town, West Virginia: Karst Waters Institute Special Publication, pp. 129–134.
- Beddows, P. A. *et al.* (2007) 'Decoupled fresh-saline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: Spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity', *Journal of Hydrology*, 346(1–2), pp. 18–32. doi: 10.1016/j.jhydrol.2007.08.013.
- Carbajal, N. *et al.* (2009) *Hidrodinámica y transporte de contaminantes y sedimentos en el sistema lagunar Nichupté-Bojórquez , Cancún , Quintana Roo , México Dr . Noel Carbajal Pérez.*
- Carriquiry, J. D. *et al.* (2017) *Monitoreo del Bentos, Nutrientes e Isótopos en Relación a la Salud Arrecifal de las Áreas Naturales Protegidas del Norte de Quintana Roo con Mayor Vulnerabilidad al Cambio de Fase Arrecifal.*
- Carruthers, T. J. B., Van Tussenbroek, B. I. and Dennison, W. C. (2005) 'Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(2–3), pp. 191–199. doi: 10.1016/j.ecss.2005.01.015.
- CONABIO (2008) 'Sitios prioritarios marinos para la conservación de la biodiversidad'. Ciudad de México, México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), The Nature Conservancy - Programa México (TNC), Pronatura. Available at: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/region/biotic/spm1mgw.
- CONABIO (2016) 'Mapa de uso del suelo y vegetación de la zona costera asociada a los manglares en la Región Península de Yucatán en 2015. Escala: 1:50000'. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- CONAGUA-SEMARNAT (2014) *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación*. México.
- CONANP (2016) 'Sitios RAMSAR de México 2016'. Ciudad de México, México: Comisión Nacional de Áreas naturales Protegidas. Available at: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/region/biotic/ramsar15gw.
- Costanzo, S. D. *et al.* (2001) 'A new approach for detecting and mapping sewage impacts', *Marine Pollution Bulletin*, 42(2), pp. 149–156. doi: 10.1016/S0025-326X(00)00125-9.
- Domínguez, M. and García, A. (2007) 'Barriers to achieving the water and sanitation-related Millennium Development Goals in Cancún, Mexico at the beginning of the twenty-first century', *Environment and Urbanization*, 19(1), pp. 243–260. doi: 10.1177/0956247807076918.
- Duarte, C. (1990) 'Seagrass nutrient content', *Marine Ecology Progress Series*, 67(October 1990), pp. 201–207. doi: 10.3354/meps067201.
- Espinosa, M. (2011) *Plan para la recuperación ambiental de la Laguna el informe final y de Bojórquez.*
- Evans, R. D. (2001) 'Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition', *Trends in Plant Science*, 6(3), pp. 121–126. doi: 10.1016/S1360-1385(01)01889-1.
- Ferdie, M. and Fourqurean, J. W. (2004) 'Responses of seagrass communities to fertilization along a gradient of relative availability of nitrogen and phosphorus in a carbonate environment', *Limnology and Oceanography*, 49(6), pp. 2082–2094. doi: 10.4319/lo.2004.49.6.2082.
- FONATUR (2010) 'Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales 2010'. Cancún, Quintana Roo.

- Fourqurean, J. W. *et al.* (2001) 'Spatial and temporal pattern in seagrass community composition and productivity in south Florida', *Marine Biology*, 138(2), pp. 341–354. doi: 10.1007/s002270000448.
- Fourqurean, J. W. *et al.* (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(3), pp. 447–461.
- Fourqurean, J. W. *et al.* (2015) 'Water quality, isoscapes and stoichioscapes of seagrasses indicate general P limitation and unique N cycling in shallow water benthos of Bermuda', *Biogeosciences*, 12(20), pp. 6235–6249. doi: 10.5194/bg-12-6235-2015.
- Fry, B. (2006) *Stable Isotope Ecology*. 1ra edn, *Life Sciences*. 1ra edn. doi: 10.1002/9780470015902.a0021231.
- Gonneea, M. E., Paytan, A. and Herrera-Silveira, J. A. (2004) 'Tracing organic matter sources and carbon burial in mangrove sediments over the past 160 years', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61(2), pp. 211–227. doi: 10.1016/j.ecss.2004.04.015.
- Heaton, T. H. E. (1986) 'Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: A review', *Chemical Geology: Isotope Geoscience Section*, 59(C), pp. 87–102. doi: 10.1016/0168-9622(86)90059-X.
- Hemminga, M. A., Marbà, N. and Stapel, J. (1999) 'Leaf nutrient resorption, leaf lifespan and the retention of nutrients in seagrass systems', *Aquatic Botany*, 65(1–4), pp. 141–158. doi: 10.1016/S0304-3770(99)00037-6.
- Hernández-Terrones, L. *et al.* (2011) 'Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems', *Water, Air, and Soil Pollution*, 218(1–4), pp. 517–528. doi: 10.1007/s11270-010-0664-x.
- Herrera-Silveira, J. A. *et al.* (2009) 'Evidence of negative impacts of ecological tourism on turtlegrass (*Thalassia testudinum*) beds in a marine protected area of the Mexican Caribbean', *Aquatic Ecology*, 44(1), pp. 23–31. doi: 10.1007/s10452-009-9260-9.
- Herrera-Silveira, J. A. *et al.* (2015) *Monitoreo de la condición trófica de la columna de agua de los ambientes costeros del Parque Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizúc: Segunda Etapa-Base de datos*.
- HRFHP (2015) *Mesoamerican reef and evaluation of ecosystem health*. Available at: <http://www.healthyreefs.org/cms/wp-content/uploads/2015/05/MAR-EN-small.pdf>.
- Huffman, G. J. *et al.* (2001) 'Global Precipitation at One-Degree Daily Resolution from Multisatellite Observations', *Journal of Hydrometeorology*, 2(1), pp. 36–50. doi: 10.1175/1525-7541(2001)002<0036:GPAODD>2.0.CO;2.
- INEGI (2016) *Anuario estadístico y geográfico de Quintana Roo 2016*. México.
- Johnson, R. A. and Wichern, D. W. (2007) *Applied multivariate statistical analysis*. Sixth edit. Pearson Education. doi: 10.1198/tech.2005.s319.
- Jones, B. L. and Unsworth, R. K. F. (2016) 'The perilous state of seagrass in the British Isles', *Royal Society Open Science*, 3(1), p. 150596. doi: 10.1098/rsos.150596.
- Knapp, A. N. (2012) 'The sensitivity of marine N_2 fixation to dissolved inorganic nitrogen', *Frontiers in Microbiology*, 3(OCT), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2012.00374.
- Kuhnle, G. G. C. *et al.* (2013) 'Carbon and nitrogen isotopic ratios of urine and faeces as novel nutritional biomarkers of meat and fish intake', *European Journal of Nutrition*, 52(1), pp. 389–395. doi: 10.1007/s00394-012-0328-2.
- Kuo, J. and den Hartog, C. (2006) 'Seagrass Morphology, Anatomy, and Ultrastructure', in Larkum, A. W. D., Orth, R. J., and Duarte, C. M. (eds) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, p. 57.
- Laboratorio-Conquimex (2018) *Informe Final de Ensayo; FEB-276-2018, FEB-325-2018, FEB-390-2018*.
- Lapointe, B. E., Barile, P. J. and Matzie, W. R. (2004) *Anthropogenic nutrient enrichment of seagrass and coral reef communities in the Lower Florida Keys: Discrimination of local versus regional nitrogen sources*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. doi: 10.1016/j.jembe.2004.01.019.
- Lapointe, B. E., Littler, M. M. and Littler, D. S. (1993) 'Modification of benthic community structure by natural eutrophication: the Belize Barrier reef', *Seventh International Coral Reef Symposium*, pp. 323–334.
- Lapointe, B. E., O'Connell, J. D. and Garrett, G. S. (1990) 'Nutrient couplings between on-site sewage disposal systems, groundwaters, and nearshore surface waters of the Florida Keys', *Biogeochemistry*, 10, pp. 289–307.
- Larkum, A. W. D., Orth, R. J. and Duarte, C. M. (2006) *Seagrasses: Biology, ecology and conservation*, *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Edited by A. W. D. Larkum, R. J. Orth, and C. M.

- Duarte. doi: 10.1007/978-1-4020-2983-7.
- Lee, K. S. and Dunton, K. H. (1999) 'Influence of sediment nitrogen-availability on carbon and nitrogen dynamics in the seagrass *Thalassia testudinum*', *Marine Biology*, 134(2), pp. 217–226. doi: 10.1007/s002270050540.
- McClelland, J. W. and Valiela, I. (1998) 'Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources', *Limnology and Oceanography*, 43(4), pp. 577–585. doi: 10.4319/lo.1998.43.4.0577.
- McCusker, E. M. *et al.* (1999) 'Seasonal variation in the biogeochemical cycling of seston in Grand Traverse Bay, Lake Michigan', *Organic Geochemistry*, 30(12), pp. 1543–1557. doi: 10.1016/S0146-6380(99)00129-1.
- McGlathery, K. J. (1995) 'Nutrient and grazing influences on a subtropical seagrass community', *Marine Ecology Progress Series*, 122(1–3), pp. 239–252. doi: 10.3354/meps122239.
- Medina-Gómez, I. and Herrera-Silveira, J. A. (2003) 'Spatial characterization of water quality in a karstic coastal lagoon without anthropogenic disturbance: A multivariate approach', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58(3), pp. 455–465. doi: 10.1016/S0272-7714(03)00112-4.
- Mendoza, D. (2012) *Concentración de nutrientes e isótopos de nitrógeno en comunidades algales como indicadores de fuentes de nutrientes en hábitats arrecifales del Norte de Quintana Roo, México*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Merino-Ibarra, M. (1999) *Nichupté Lagoonal System, Quintana Roo Martin Merino Ibarra Study, Mexican and Central American Coastal Lagoon Systems: Carbon, Nitrogen and Phosphorus Fluxes (Regional Workshop II)*. Edited by S. V. Smith, J. . . M. Crossland, and C. J. Crossland. Texel, The Netherlands. ISSN: LOICZ IPO. doi: 10.13140/RG.2.1.2611.3761.
- Merino, M. (1997) 'Upwelling on the Yucatan Shelf: Hydrographic evidence', *Journal of Marine Systems*, 13(1–4), pp. 101–121. doi: 10.1016/S0924-7963(96)00123-6.
- Merino, M., Czitrom, S. and Jordan, E. (1990) 'Hydrology and Rain Flushing of the Nichuptr Lagoon System, Cancun, Mexico', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30, pp. 223–237. doi: 10.1016/0272-7714(90)90049-W.
- Munksgaard, N. C. *et al.* (2017) 'Enrichment of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in wastewater-derived effluent varies with operational performance of treatment systems: implications for isotope monitoring in receiving environments', *Environmental Monitoring and Assessment*. Environmental Monitoring and Assessment, 189(1). doi: 10.1007/s10661-016-5754-9.
- Mutchler, T. *et al.* (2007) 'Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 74(3), pp. 449–457. doi: 10.1016/j.ecss.2007.04.005.
- Mutchler, T. and Hoffman, D. K. (2017) 'Response of seagrass (*Thalassia testudinum*) metrics to short-term nutrient enrichment and grazing manipulations', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier B.V., 486, pp. 105–113. doi: 10.1016/j.jembe.2016.09.015.
- Null, K. A. *et al.* (2014) 'Composition and fluxes of submarine groundwater along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula', *Continental Shelf Research*. Elsevier, 77, pp. 38–50. doi: 10.1016/j.csr.2014.01.011.
- Orth, R. J. *et al.* (2006) 'A Global Crisis for Seagrass Ecosystems', *BioScience*, 56(6), pp. 987–996. doi: 10.1641/0006-3568(2006)56.
- Parks, J. M. (1966) 'Cluster analysis applied to multivariate geologic problems', *J. Geol.*, 74, pp. 703–715.
- Powell, G. V. N., Kenworthy, W. J. and Fourqurean, J. W. (1989) 'Experimental evidence for nutrient limitation of seagrass growth in a tropical estuary with restricted circulation', *Bulletin of Marine Science*, 44, pp. 324–340.
- Sánchez, A. *et al.* (2013) 'Stable nitrogen isotopes in the turtle grass *Thalassia testudinum* from the Mexican Caribbean: Implications of anthropogenic development', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. Elsevier Ltd, 135, pp. 86–93. doi: 10.1016/j.ecss.2013.01.021.
- Santamaría-del-Ángel, E. *et al.* (2011) 'Determining Dynamic Biogeographic Regions using Remote Sensing Data', in *Handbook of Satellite Remote Sensing Image Interpretation: Applications for Marine Living Resources Conservation and Management*, pp. 273–293.
- SEMARNAT-CONANP (2014) *Programa de Manejo Area de Protección de Flora y Fauna Manglares de Nichupte*. doi: 10.1073/pnas.0703993104.
- SEMARNAT-CONANP (2016) *Programa de Manejo Paque Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc*.
- Tucker, J. *et al.* (1999) 'Using stable isotopes to trace sewage-derived material through Boston Harbor and

- Massachusetts Bay', *Mar Environ Res* 1999, 48: 353-75 T0051, 48(99), pp. 353–375.
- van Tussenbroek, B. I. *et al.* (2006) 'The Biology of Thalassia: Paradigms and Recent Advances in Research', in Larkum, A., Orth, R. J., and Duarte, C. (eds) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Netherlands, pp. 409–439.
- Van Tussenbroek, B. I. *et al.* (2010) *A guide to the tropical seagrasses of the western Atlantic*, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Del Coyoacan, Mexico. Available at: [http://www.seagrassrestorationnow.com/docs/van Tussenbroek et al 2010 CaribbeanSeagrassGuide.pdf](http://www.seagrassrestorationnow.com/docs/van_Tussenbroek_et_al_2010_CaribbeanSeagrassGuide.pdf).
- Van Tussenbroek, B. I., Hermus, K. and Tahey, T. (1996) 'Biomass and growth of the turtle grass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in a shallow tropical lagoon system, in relation to tourist development', *Caribbean Journal of Science*, 32(4), pp. 357–364.
- Walton, M. E. M. *et al.* (2016) 'Extreme¹⁵N Depletion in Seagrasses', *Estuaries and Coasts*. Estuaries and Coasts, 39(6), pp. 1709–1723. doi: 10.1007/s12237-016-0103-3.
- Yamamuro, M., Kayanne, H. and Yamano, H. (2003) 'δ¹⁵N of seagrass leaves for monitoring anthropogenic nutrient increases in coral reef ecosystems', *Marine Pollution Bulletin*, 46(4), pp. 452–458. doi: 10.1016/S0025-326X(02)00463-0.
- Zar, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*. Fourth edi. Edited by T. Ryu.