



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**  
**UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN**  
**(BIOLOGÍA MARINA)**

Isótopos estables  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  en macroalgas como biomonitores de contaminación de nitrógeno en una laguna costera subtropical: estudio bajo condiciones naturales y controladas

**T E S I S**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. MARÍA JULIA OCHOA IZAGUIRRE**

**TUTOR:**

**Dr. MARTÍN F. SOTO JIMÉNEZ**

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,  
UNIDAD ACADÉMICA, MAZATLÁN, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. ELVA G. ESCOBAR BRIONES**

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Dra. ELISA SERVIERE ZARAGOZA**

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Dr. DOMENICO VOLTOLINA LOBINA**

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**Dr. JOSÉ LUIS CARBALLO CENIZO**

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,  
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

© Queda prohibida la reproducción parcial y/o total de la información contenida en esta tesis doctoral, sin previa autorización del autor y/o del director de tesis.

La autorización deberá solicitarla a las siguientes direcciones electrónicas:

[julia@ola.icmyl.unam.mx](mailto:julia@ola.icmyl.unam.mx)

[martin@ola.icmyl.unam.mx](mailto:martin@ola.icmyl.unam.mx)

Favor de otorgar el crédito correspondiente y citar la fuente de la siguiente manera:

Ochoa-Izaguirre M. J. 2014. Isótopos estables  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  en macroalgas como biomonitores de contaminación de nitrógeno en una laguna costera subtropical: estudio bajo condiciones naturales y controladas. Tesis Doctoral. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 241 pp.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como alumna en las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología a través del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, agradezco la confianza para desarrollar esta investigación de tesis doctoral.

Al proyecto UNAM-PAPIIT IN206409: Isótopos estables en biomonitores para el estudio de la contaminación por nitrógeno en ecosistemas costeros del Golfo de California, por el financiamiento para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó durante la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por haber permitido separarme de mis labores docentes para superarme académicamente.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado de la SEP (PROMEP) creado para impulsar el nivel de los profesores de las Universidades públicas, por el apoyo que me brindó para realizar este proyecto.

Al Dr. Martín Federico Soto Jiménez, por la dirección de esta tesis, por confiar en mí para aceptarme a realizar este proyecto académico bajo su dirección, y por su valiosa disposición y paciencia para apoyar el desarrollo de esta investigación. Sobre todo, por la humildad para compartir sus conocimientos.

Al Comité tutor:

Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Dra. Elva G. Escobar Briones, Dr. Domenico Voltolina Lobina y Dr. José Luis Carballo Cenizo, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis, así como sus observaciones en la revisión del manuscrito para mejorar su contenido y redacción.

### **Al personal del ICMYL, UNAM de la Unidad Académica Mazatlán**

Químico Humberto Bojórquez Leyva por su valiosa ayuda en la realización de los análisis químicos de nutrientes.

María Clara Ramírez Jáuregui responsable de la Biblioteca "María Elena Caso", por proporcionarme el material bibliográfico durante el desarrollo de mi tesis.

A Ma. Margarita Cordero Ruiz. por su buena disposición en cuanto a trámites ante el posgrado en la Unidad Mazatlán.

A Victoria Montes Montes, por sus atinadas sugerencias en la redacción del manuscrito de tesis.

Germán Ramírez, Carlos Suárez y Herlinda Pérez Virgen del centro de cómputo por el apoyo con las videoconferencias durante los exámenes tutorales.

A todo el personal administrativo de la Unidad Académica Mazatlán.

### **Al personal del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (México, D.F)**

Mi agradecimiento a la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Coordinadora de este posgrado por el apoyo durante mi estancia como alumna. A Diana Juárez Bustos, Chantal Ruiz Guerrero, Guadalupe Godoy Medina y Gabriela Almaraz Mejía por su apoyo siempre oportuno en la realización de todo trámite ante el posgrado.

### **Al personal de la Facultad de Ciencias del Mar, UAS.**

M.C. Isidro Osuna López, responsable del laboratorio de estudios ambientales, por permitirme el acceso al laboratorio para el uso del material y equipo para la preparación de las macroalgas para el análisis isotópico.

M.C. Héctor Zazueta Padilla y Biol. Pesq. Francisco Atondo, por proporcionarme el material y equipo en el laboratorio de estudios ambientales.

M.C. Cumberto Manjarrez Acosta, exDirector de la FACIMAR, por las facilidades que me brindó en la realización de trámites administrativos ante Rectoría-UAS, durante mi estancia en el posgrado.

Dr. Juan Manuel Audelo Naranjo actual director de la FACIMAR, por las facilidades que me brindó para terminar este proyecto.

Dr. Mario Nieves Soto, Coordinador General de la Dirección General de Investigación y Posgrado, UAS, por el financiamiento otorgado para la publicación del primer artículo científico generado de esta tesis.

Dr. José Cristobal Román Reyes por su ayuda en el tratamiento estadístico de algunos datos de esta tesis.

Dr. Gildardo Izaguirre Fierro por estar siempre dispuesto a apoyarme en la redacción de manuscritos.

Biol. Pesq. Ma. del Carmen Velázquez Cuadras, responsable del laboratorio de química, por su ayuda en los análisis microbiológicos del agua de los experimentos.

Dr. Pablo Piña por motivarme a continuar preparándome académicamente.

Al resto de mis compañeros de la Facultad de Ciencias del Mar.

### **Un agradecimiento especial**

M.C. Marco Antonio Escalante Cavazos, por mostrarme el fascinante mundo de las algas. Gracias por aquellos viajes inolvidables al Golfo de California cuando aún era estudiante de Licenciatura.

Dr. Federico Páez Osuna, por abrirme las puertas de su laboratorio e invitarme a participar en diversos proyectos que me motivaron a continuar estudiando más sobre las macroalgas.

### **A mis compañeros del laboratorio de Isótopos estables, ICMYL, UNAM, durante mi estancia**

Arcelia Cruz, Marcela Fregoso, Gabriel Gaxiola y Daniela Villanueva por su buena disposición para apoyarme en los análisis de laboratorio.

Siria Meráz González, Mario Peraza Yee y Roberto Velázquez Ochoa, por su colaboración en los muestreos de campo y preparación de las muestras de macroalgas para los análisis.

Vicente Olmedo por estar siempre dispuesto a ayudarnos con los programas de cómputo.

### **A mi familia y amigos**

A mis hijos Ricardo, Roberto y Rodrigo por todo su apoyo para realizar este proyecto.

José y Esther, por estar siempre pendiente de mí y de mis hijos. ¡¡¡ Muchas gracias!!!

A mis hermanos, que siempre se han preocupado por mí, en especial a Ernesto por su solidaridad, ¡¡¡¡¡¡ Gracias hermanito !!!!!!!.

Miguel y Zoila por el apoyo moral que recibo de ustedes.

Martín y Fabiola, por ser tan buenos amigos. Martín, muchas gracias, por la paciencia que siempre me tuviste y por tu ayuda más allá de tu compromiso, que me permitió enfrentar los momentos difíciles con calma y llegar al final de este proyecto.

Domenico Voltolina, por sus valiosos consejos y por apoyarme a lo largo de este proyecto, ¡¡¡ Muchas gracias por cumplir su promesa!!!.

Sarahí, por dedicar parte de tu tiempo a la revisión de los manuscritos en inglés.

Victoria, por tu sincera amistad y por fomentar siempre la buena convivencia entre los amigos.

Gloria Ana María, por tu amistad, gracias amiga.

Lalis, gracias por tus buenos consejos.

Oscar y Lili, por la amistad y solidaridad que hemos mantenido a lo largo de nuestras vidas (más de 30 años).

### **A mis compañeros de generación**

Elsa I. Bojórquez Mascareño y Jesús Manuel Quintero Álvarez, por caminar juntos en este proyecto, a veces con momentos difíciles.

Por último, a mis amigos con quienes compartí mi estancia en este laboratorio (Elsa, Jesús, Siria, Arcelia, Vicente, Daniel, Mario, Susy, Roberto y Gabriel) por la excelente convivencia que siempre mantuvimos haciendo agradable esta larga estancia.

### **Un agradecimiento especial**

M.C. Marco Antonio Escalante Cavazos, por mostrarme el fascinante mundo de las algas. Gracias por aquellos viajes inolvidables al Golfo de California cuando aún era estudiante de Licenciatura.

Dr. Federico Páez Osuna, por abrirme las puertas de su laboratorio e invitarme a participar en diversos proyectos que me motivaron a continuar estudiando más sobre las macroalgas.

**iiiiiii Gracias !!!!!!!**

## *Dedicatoria*

*A mis hijos: Ricardo, Roberto y Rodrigo, que caminaron junto a mí hasta la meta.*

*A la memoria de Ricardo y mi madre, que me acompañaron hasta la mitad de este proyecto.*

*A cada una de las personas (familiares y amigos) que estuvieron presentes para darme palabras de ánimo.*

*Gracias.....*





La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Isótopos estables del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Martín F. Soto Jiménez, con el apoyo del Proyecto UNAM-PAPIIT IN206409: Isótopos estables en biomonitores para el estudio de la contaminación por nitrógeno en ecosistemas costeros del Golfo de California.

A la fecha, el producto de esta investigación doctoral es un artículo publicado en una revista indizada de circulación internacional y se presenta en el Anexo 11.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Fraccionamiento isotópico en macroalgas.....	5
1.2. Absorción y asimilación de N por macroalgas.....	6
1.3. Uso de macroalgas como biomonitores ecológicos.....	8
2. ANTECEDENTES.....	9
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1. Área de estudio.....	14
5.2. Trabajo de campo.....	15
5.2.1. Selección de los sitios de muestreo.....	15
5.2.2. Descripción de los sitios de muestreo.....	16
5.2.3. Recolección de muestras de agua para identificar y caracterizar isotópicamente fuentes de N.....	18
5.2.4. Medición de variables físicas y químicas.....	18
5.2.5. Determinación de nitrógeno disuelto y sus especies.....	19
5.2.6. Recolección de muestras de macroalgas.....	19
5.3. Trabajo de laboratorio.....	20
5.3.1. Selección de la especie de macroalga para los experimentos.....	20
5.3.2. Experimento de absorción de $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$ por <i>Ulva lobata</i> .....	21
5.3.3. Experimento de asimilación, crecimiento y fraccionación de N por <i>Ulva lobata</i> .....	22

5.4. Análisis isotópico.....	24
5.4.1. Agua.....	24
5.4.2. Macroalgas.....	25
5.4.3. Medición de isótopos estables de N.....	26
5.5. Tratamiento estadístico.....	27
5.6. Estimación de las contribuciones relativas.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6.1. Identificación y caracterización isotópica de las fuentes de aporte de nitrógeno al sistema lagunar Urías.....	31
6.1.1. Identificación de fuentes de N que entran al sistema.....	31
6.1.2. Caracterización isotópica de las fuentes de nitrógeno en el sistema	34
6.2. Caracterización física, química e isotópica del agua.....	37
6.2.1. Caracterización física y química.....	37
6.2.1.1. Temperatura, salinidad, precipitación y evaporación.....	37
6.2.1.2. Oxígeno disuelto y pH.....	40
6.2.1.3. Nitrógeno y sus especies químicas.....	42
6.2.1.3.1. Amonio.....	42
6.2.1.3.2. Nitrato + nitrito.....	44
6.2.1.3.3. Nitrógeno disuelto total (NDT).....	46
6.2.1.3.4. Nitrógeno orgánico disuelto (NOD).....	47
6.2.2. Caracterización isotópica del N disponible en el sistema.....	49
6.2.2.1. Modelación de la variación isotópica del N disponible.....	49
6.2.2.2. Observaciones de campo y validación del modelo.....	52
6.2.2.3. Variabilidad espacial y temporal de las señales isotópicas de N disponible en el agua.....	60
6.3. Caracterización de la flora ficológica de Urías.....	64
6.4. Variabilidad espacial y temporal del $\delta^{15}\text{N}$ de las especies de macroalgas..	67
6.5. Asociación entre señales isotópicas $\delta^{15}\text{N}$ de las macroalgas con las fuentes dominantes de N en el sitio de colecta.....	79
6.6. Contribuciones relativas de las fuentes de N a las señales $\delta^{15}\text{N}$ en las macroalgas.....	82

6.7. Experimentos de laboratorio.....	87
6.7.1. Tasas de absorción, asimilación y crecimiento de <i>Ulva lobata</i> con diferentes concentraciones de amonio, nitrato y nitrato de amonio.....	87
6.7.1.1. Experimento 1: Tasas de absorción con amonio y nitrato.....	87
6.7.1.2. Experimento 2. Tasas de crecimiento y asimilación.....	94
6.7.1.2.1. Amonio.....	94
6.7.1.2.2. Nitrato.....	96
6.7.1.2.3. Nitrato de amonio.....	98
6.7.2. Determinación del fraccionamiento isotópico.....	105
6.7.3. Variación de la señal $\delta^{15}\text{N}$ los especímenes de <i>U. lobata</i> recolectados en el campo y determinación de la tasa de recambio metabólico en base a experimentos de laboratorio.....	107
7. CONCLUSIONES.....	113
8. LITERATURA CITADA.....	119
9. ANEXOS.....	139

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreo.....	16
Figura 2	Entradas de N (ton año <sup>-1</sup> ) al sistema lagunar Urías proveniente de las diversas actividades humanas que se desarrollan a su alrededor.....	33
Figura 3	Valores de las señales $\delta^{15}\text{N}$ de las fuentes de aportes de nitrógeno al Golfo de California, incluyendo las fuentes medidas en Urías y comparación con resultados publicados en otros sitios del mundo.....	35
Figura 4	Variación mensual de la temperatura en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	37
Figura 5	Variación mensual de la salinidad en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	38
Figura 6	Variación mensual del oxígeno disuelto en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	41
Figura 7	Variación mensual del pH en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	42
Figura 8	Variación mensual de amonio en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	43
Figura 9	Variación mensual de nitrato + nitrito en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	45
Figura 10	Variación mensual de nitrógeno disuelto total (NDT) en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).....	47
Figura 11	Variación mensual de Nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y orgánico disuelto (NOD) en el sistema Urías.....	48
Figura 12	Análisis de correlación entre las señales de $\delta^{15}\text{N}$ -NID en el agua estimadas con el modelo 1 y las señales $\delta^{15}\text{N}$ -NID medidas en el sistema Urías.....	56
Figura 13	Análisis de correlación entre las señales de $\delta^{15}\text{N}$ -NID estimadas con	

	el modelo 2 y las señales $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ medidas en el agua del sistema Urías.....	57
Figura 14	Análisis de correlación entre las señales de $\delta^{15}\text{N-NID}$ estimadas con el modelo 2 y las señales $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ medidas en el agua del sistema Urías.....	58
Figura 15	Análisis de correlación entre las señales de $\delta^{15}\text{N-NID}$ y las concentraciones de nitrato + nitrito en el agua del sistema Urías.....	59
Figura 16	Análisis de correlación entre las señales de $\delta^{15}\text{N-NID}$ y las concentraciones de amonio en el agua del sistema Urías.....	60
Figura 17	Variación espacial (a) y temporal (b) de las señales de $\delta^{15}\text{N-NID}$ en el sistema Urías.....	61
Figura 18	Variación espacial de las señales de $\delta^{15}\text{N}$ de amonio (a) y nitrato (b) en el sistema Urías.....	62
Figura 19	Variación temporal de las señales de $\delta^{15}\text{N}$ de amonio (a) y nitrato (b) en el sistema Urías.....	63
Figura 20	Valores promedio $\pm$ ds y coeficiente de variación de los valores $\delta^{15}\text{N}$ en 45 especies de macroalgas recolectadas en el sistema Urías durante un año de muestreo.....	67
Figura 21	Variabilidad temporal de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en nueve especies selectas de macroalgas representativas del sistema Urías.....	72
Figura 22	Comparación de las señales de $\delta^{15}\text{N}$ entre especímenes juveniles y adultos de las mismas especies recolectadas en el mismos sitio y fecha de muestreo.....	73
Figura 23	Valores de las señal de $\delta^{15}\text{N}$ de las macroalgas expuestas a diferentes mezclas de fuentes en el sistema Urías y una comparación con resultados registrados en el Golfo de California y publicados en otros sitios del mundo. (AC=acuícola, AG=agrícola, U=Urbana, PP=Productos pesqueros, M=marina).....	75
Figura 24	Contribuciones relativas de las fuentes de N (en % del total)	

	identificadas en el sistema Urías a las señales de $\delta^{15}\text{N}$ de las especies de macroalgas.....	84
Figura 25	Resultados del análisis de regresión lineal entre el $\delta^{15}\text{N}$ -NID disponible en el agua y $\delta^{15}\text{N}$ de las especies de macroalgas más frecuentes en el sistema Urías.....	86
Figura 26	Variaciones en el tiempo de la tasas de absorción de amonio (a) y de nitrato (b) de <i>U. lobata</i> expuesta a diferentes concentraciones en condiciones de laboratorio.....	89
Figura 27	Tasas de absorción de amonio (a) y nitrato (b) en función de la concentración del sustrato donde se muestran tres fases de las tasas de absorción.....	91
Figura 28	Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga <i>U. lobata</i> expuesta a diferentes concentraciones de amonio.....	96
Figura 29	Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga <i>U. lobata</i> expuesta a diferentes concentraciones de nitrato.....	97
Figura 30	Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga <i>U. lobata</i> expuesta a diferentes concentraciones de nitrato de amonio.....	99
Figura 31	Relación entre la tasa específica de crecimiento y el contenido de N en <i>U. lobata</i> expuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno. Gráficamente se estimó el valor de $N_Q$ . A partir de la ecuación ( $\mu = \mu_{\max} (1 - N_Q/N)$ ) se calculó $\mu_{\max}$ . El contenido crítico de N ( $N_c$ ), que representa el contenido de N a la cual se alcanza el máximo crecimiento que fue estimado gráficamente como el intercepto de la curva asintótica.....	102
Figura 32	Tasas de recambio metabólico de N en los especímenes de <i>U. lobata</i> sometidos experimentalmente a diferentes formas químicas y concentraciones de nitrógeno.....	107

Figura 33	Variación espacial (a) y temporal (b) de la señal $\delta^{15}\text{N}$ de los especímenes de <i>U. lobata</i> recolectados en el sistema Urías.....	108
Figura 34	Variación espacial (a) y temporal (b) de la señal $\delta^{15}\text{N}$ -NID disponible en el agua del sistema Urías donde se recolectaron los especímenes de <i>U. lobata</i> .....	110
Figura 35	Tasa de recambio metabólico medio calculadas para los tratamientos 1 al 3 de amonio y nitrato en condiciones experimentales y utilizadas para calcular la tasa de recambio metabólico en especímenes de <i>U. lobata</i> en el campo.....	111



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición isotópica de las fuentes de N, identificadas en el sistema Urías.....	35
Tabla 2	Parámetros estimados en base a las concentraciones de amonio, nitrato + nitrito y NOD, así como las señales isotópicas del amonio y nitrato para aplicación del Modelo 1.....	56
Tabla 3	Parámetros estimados en base a las concentraciones de amonio, nitrato + nitrito y NOD, así como las señales isotópicas del amonio y nitrato de las fuentes identificadas para aplicación del Modelo 2 .....	57
Tabla 4	Composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de N (media $\pm$ DS, ‰) para las especies de macroalgas más frecuentes recolectadas en hábitats del sistema Urías, durante las diferentes épocas climáticas.....	69
Tabla 5	Estimación de la contribución relativa a la variabilidad de la señal isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de las macroalgas con factores simples y combinados de acuerdo a un modelo de ajuste (Fit model, Jump 9.0)..	79
Tabla 6	Contenido de nitrógeno en los especímenes de macroalgas expuestos experimentalmente a diferentes formas químicas y concentraciones de nitrógeno.....	100
Tabla 7	Tabla comparativa entre las tasas máximas de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ), cuotas de subsistencia ( $N_0$ ), concentraciones críticas de N en el ejido ( $N_c$ ) y N requerido ( $N_{\text{req}}$ ) para sostener el crecimiento bajo condiciones de laboratorio en <i>U. lobata</i> y otras especies de macroalgas.....	103
Tabla 8	Valores de las señales $\delta^{15}\text{N}$ de especímenes de juveniles y adultos de <i>U. lobata</i> , recolectados en los hábitats lagunar-marino y marino del sistema Urías, y variaciones de las concentraciones de amonio y nitrato + nitrito y en la señal $\delta^{15}\text{N}$ -NID en los sitios de colecta.....	112

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Espécimen de <i>Ulva lobata</i> utilizada para los experimentos de laboratorio (a), y (b) vista superficial de una fronda de (10x) sin epífitas, recolectada del sitio donde se tomaron las muestras para los experimentos.....	139
Anexo 2	Tabla comparativa entre las cargas de N que entran a cuerpos de agua costeros de diversos sitios de Estados Unidos de Norteamérica y de México.....	139
Anexo 3	Tabla comparativa de las variables ambientales (temperatura, salinidad, O <sub>2</sub> disuelto y pH) y nutrientes (amonio, nitrato+nitrito y NDT) registradas entre los diferentes hábitats y épocas climáticas en el sistema Urías.....	140
Anexo 4	Valores mensuales de la precipitación y evaporación registradas en la región de Mazatlán, Sinaloa durante el periodo de estudio (2009-2010)	140
Anexo 5	Listado taxonómico de las especies de macroalgas recolectadas en el sistema Urías durante el ciclo anual 2009-2010.....	141
Anexo 6	Valores promedio±ds y rango de variación de la señal de $\delta^{15}\text{N}$ en las macroalgas recolectadas en el sistema Urías.....	145
Anexo 7	Tabla comparativa de las señales de $\delta^{15}\text{N}$ de las macroalgas entre los diferentes hábitats y épocas climáticas en el sistema Urías.....	147
Anexo 8	Datos del Modelo 2 de predicción del valor isotópico del alga en función de las especies, épocas climáticas, concentraciones de amonio y nitrato + nitrito, $\delta^{15}\text{N}$ amonio fuente y $\delta^{15}\text{N}$ nitrato fuente...	148
Anexo 9	Datos del Modelo 3 de predicción del valor isotópico del alga en función de las épocas, hábitat, especies, y efectos combinados época-hábitat, época-hábitat-especie y hábitat-especie.....	149
Anexo 10	María Julia Ochoa-Izaguirre, Martín F. Soto-Jiménez. Variability in	157

nitrogen stable isotope ratios of macroalgae: consequences for the identification of nitrogen sources. Manuscrito en revision en la revista Journal of Phycology.....

Anexo 11	María Julia Ochoa-Izaguirre, Martín F. Soto-Jiménez. 2013. Evaluation of nitrogen sources in the Urías lagoon system, Gulf of California, based on stable isotopes in macroalgae. Ciencias Marinas, 39(4):413–430.....	224
----------	--	-----

## RESUMEN

Con el fin de conocer el posible uso de las macroalgas como biomonitores de contaminación por N en ecosistemas costeros, se estudió la variabilidad espacio temporal de la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de 738 especímenes de macroalgas del sistema lagunar Urías de febrero de 2009 a marzo de 2010. Se identificaron y caracterizaron isotópicamente las fuentes de aporte de N, así como su contribución relativa a la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas. Se realizó el monitoreo de variables fisicoquímicas y de las concentraciones de las formas químicas del N y de sus señales isotópicas en la columna de agua del sistema. Además, se realizaron experimentos para medir las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N así como la fraccionación en la especie *Ulva lobata*.

La señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas, varió de 0.41 a 22.67‰, con una alta variabilidad interespecífica (8 a 14‰) e intraespecífica (9 a 11 ‰). Los valores  $\delta^{15}\text{N}$  más bajos se registraron en la época de lluvias atribuido a la entrada de lixiviados terrestres, mientras que valores altos se registraron en secas cálidas atribuido a los procesos biogeoquímicos que se intensifican durante esta época. Las macroalgas del hábitat lagunar registraron la más alta variabilidad de  $\delta^{15}\text{N}$  en respuesta a los cambios en las señales del N relacionados con entradas de agua dulce y/o efluentes, alta evaporación, una menor influencia de las mareas, tiempos de residencia mayores. En el lagunar-marino la variabilidad fue atribuida a la entrada de fuentes estacionales y a la intensificación de los procesos biogeoquímicos en la época de secas cálidas. En contraste, en el hábitat marino la variabilidad fue más baja debido a la estabilidad de las señales por los procesos de mezcla en esta zona. Como resultado de estas variaciones se observaron diferencias entre especímenes de las mismas especies recolectadas en la misma época pero diferente hábitat. También se observaron diferencias entre diferentes especies del mismo hábitat y época, atribuido a características de las especies como: preferencia por la forma química de N disponible, la cinética de absorción, la capacidad para acumular N, y a la fraccionación isotópica.

Se identificaron cinco fuentes de N derivadas de las actividades humanas: agricultura acuicultura, desechos domésticos, del procesamiento de productos pesqueros y el depósito atmosférico, además una fuente natural de nitratos de origen marino. La contribución relativa de las fuentes a la señal global de  $\delta^{15}\text{N}$  en las macroalgas registró el siguiente orden: depósito atmosférico (11-34%), los desechos domésticos (5-12%), la actividad acuícola (3-7%). El resto del N correspondió a mezclas de amonio (15-47%) y nitratos (20 a 40%).

Los resultados experimentales de *U. lobata* expuesta a diferentes especies químicas y concentraciones de N, mostraron tasas de absorción, crecimiento y asimilación más altas para amonio que para nitrato para una misma concentración y tiempo de exposición. Todas las tasas se incrementaron con la concentración de ambas formas de N, siguiendo un modelo cinético tipo Michaelis-Menten. Las estimaciones de las tasas de absorción dependen del tiempo de exposición, y son mayores para experimentos de corto plazo (<1 h). Se estimó la fraccionación isotópica ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) para *U. lobata* en un rango de 1.1 a 2.72‰. El uso de  $^{15}\text{N}$  en macroalgas para identificar fuentes de N en sistemas estresados y complejos que reciben múltiples fuentes de N, como el caso de Urías, sugiere considerar ciertos factores como: la selección de la especie, el sitio de muestreo, la estación climática y la influencia de los procesos biogeoquímicos.

## ABSTRACT

In order to know the possible uses of macroalgae as biomonitors of N pollution in coastal ecosystems, we studied the spatial and temporal variability of the  $\delta^{15}\text{N}$  signals of 738 specimens of macroalgae from the lagoon system Urías, from February 2009 to March 2010. We identified and characterized isotopic sources of N input to the system, and their relative contributions to the  $\delta^{15}\text{N}$  signals of macroalgae. We monitored physicochemical variables and chemical forms and isotopic signals of N in the water column of the ecosystem. Besides, experiments were conducted to measure absorption rates, growth assimilation and isotopic fractionation of N in the specie *Ulva lobata*.

The  $\delta^{15}\text{N}$  signals of macroalgae ranged from 0.41 to 22.67 ‰ with a high interspecific (8-14 ‰) and intraspecific variability (9-11 ‰). Lowest  $\delta^{15}\text{N}$  values were observed in the rainy season attributed to the entry of land leachate with low signals, while the highest values were recorded in the dry warm season that is attributed to the biogeochemical processes that are intensified during this period. In the lagoonal habitat, macroalgae recorded the highest  $\delta^{15}\text{N}$  variability in response to changes in the signals of N in this habitat, related to freshwater input and/or effluents, high evaporation, lower tidal influence, residence times higher. In the lagoonal-marine habitat the variability was attributed to seasonal input sources and intensified biogeochemical processes in the hot dry season. In contrast, in the marine habitat had a lower variability due to the stability of signals by mixing processes in this area. In spite of the variations, significant differences were observed between specimens of the same species collected at the same season in different habitats. Besides, we observed differences among different species recollected in the same habitat and season, attributed to the characteristics of the species as preferred chemical form of N available, absorption kinetics, the ability to accumulate N, and isotopic fractionation. We identified five sources of N derived from human activities: agriculture, aquaculture, domestic wastes, seafood processing and atmospheric deposition also a natural source of marine derived nitrate. The relative contribution of the sources to the overall  $\delta^{15}\text{N}$  signal in macroalgae was recorded in the following order: atmospheric deposition (11-34%), domestic wastes (5-12%), aquaculture (3-7%). The resting N corresponds to mixtures of ammonia (15-47%) and nitrates (20-40%). The experimental results of *U. lobata* exposed to different concentrations and chemical species of N showed rates of absorption, assimilation and higher growth for ammonium compared to nitrate for the same concentration and exposure time. All rates increased with the concentration of both forms of N, following a kinetic model Michaelis-Menten type. Estimates of absorption rates depend on the exposure time, and they are higher for short-term experiments (<1 h). We estimated the isotopic fractionation ( $\delta^{15}\text{N}$ ) for *U. lobata* in a range of 1.1 to 2.72 ‰. The use of  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae to identify N sources in complex systems that are stressed and receive multiple sources of N, as in the case of Urías, suggests considering such factors as: the selection of the species, the sampling site, the climatic season and the influence of biogeochemical processes.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El nitrógeno es considerado el nutriente que limita con mayor frecuencia la productividad primaria de las aguas costeras (Nixon et al., 1986; GESAMP, 1990). Incrementos en sus concentraciones producen una cascada de efectos ambientales y ecológicos que van desde aumentos en la abundancia de fitoplancton y macroalgas, en la concentración de la materia orgánica particulada, en la turbidez, mayor frecuencia en los estados de hipoxia, sucesión de especies, aparición de especies nocivas, hasta pérdida de especies de interés comercial (GESAMP, 1990; Nixon et al., 1995). Los aportes de nutrientes han ido en aumento, afectando a la salud de los cuerpos de agua costeros a nivel mundial (Valiela et al., 2000; Martinetto et al., 2006) y las aguas costeras de México no han escapado a este problema global (De la Lanza-Espino y Flores-Verdugo, 1998; Páez-Osuna et al., 1999; Páez-Osuna, 2001; Soto-Jiménez et al., 2003; Páez Osuna et al., 2007).

En México se tienen alrededor de 125 ecosistemas costeros a lo largo de los más de 11,000 km de línea costera. Gran parte de las cuencas de captación de la mayoría de estos ecosistemas están experimentando el desarrollo de actividades como el urbanismo, la agricultura, ganadería, acuicultura, industria, turismo, entre otras (Soto-Jiménez et al., 2001; Páez-Osuna et al., 2007). Debido a la rápida expansión e intensificación de tales actividades, aunado a la escasa observancia de criterios ambientales, la integridad ecológica de las áreas costeras está comprometida. Esto ha sido particularmente demostrado en algunos ecosistemas asociados al Golfo de California, una de las regiones económicamente más importantes del país y ecológicamente más importantes de la Tierra (SEMARNAT, 2004). En particular, en el noroeste la zona costera más impactada es la parte oriental del Golfo de California, donde los estados de Sonora y Sinaloa albergan las

zonas agrícolas más productivas del país (e.g. Valles del Yaqui, Fuerte y Culiacán). Por ejemplo, en el Valle del Yaqui se estiman que entre 2,060 a 11,500 ton N año<sup>-1</sup> (Beman et al., 2005) y en el Valle de Culiacán entre 7,215 y 9,100 ton N año<sup>-1</sup> (García-Pagés, 2007) son arrojadas al Golfo procedentes de las actividades agrícolas. Estimaciones realizadas por Páez-Osuna et al. (2003), establecen que cerca de 5,700 ton N año<sup>-1</sup> llegan al Golfo provenientes de la acuicultura. A estas cantidades se agregan las descargas domésticas de los habitantes de los cinco estados que bordean el Golfo de California, que se estiman en aproximadamente 8,200 ton N año<sup>-1</sup> (Ramírez-Pérez, 2008). La excesiva carga de nutrientes provenientes de estas actividades y de los procesos naturales está asociada al incremento en la biomasa de productores primarios en los ecosistemas costeros y en particular de las macroalgas formadoras de “blooms” (Valiela et al., 1997; Kamer et al., 2001; Piñón Gimete et al, 2008). En este sentido, las macroalgas pueden ser utilizadas como indicadores biológicos para determinar el suministro de nutrientes en un ecosistema (Huntington y Boyer, 2008).

La composición de las comunidades de macroalgas depende de las características ambientales y de su variabilidad (Pedersen y Borum, 1996, 1997). Entre los factores que controlan el desarrollo de las macroalgas están la luz, la temperatura y los nutrientes (Darley, 1987; Kamer et al., 2001; Zaldívar et al., 2009), y entre éstos, el nitrógeno y el fósforo pueden limitar su crecimiento debido a su importancia en la formación de macromoléculas de importancia biológica (Wheeler y Björnsäter, 1992; Larned, 1998).

Por este motivo, el contenido de nitrógeno y fósforo y la proporción en la cual se encuentran en el tejido de las macroalgas pueden ser utilizados como indicadores de procesos de eutrofización (Britton y Fisher, 2007).

Las formas del nitrógeno inorgánico disuelto (NID), principalmente amonio y nitrato, son rápidamente removidas por el fitoplancton y las macroalgas. Sin embargo, el nitrógeno orgánico disuelto (NOD) ha sido ignorado como fuente de nitrógeno para los productores primarios debido al aumento considerable de las entradas de las formas inorgánicas de origen antropogénico a los ecosistemas (Tyler et al., 2001). A pesar de lo anterior, se ha demostrado que las macroalgas son capaces de utilizar urea y algunos aminoácidos, en especial cuando la disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto es baja, y que a través de su excreción pueden satisfacer una significativa proporción de la demanda total de nitrógeno de la vegetación béntica (Tyler et al., 2003; Tyler et al., 2005).

Las complejas mezclas de nutrientes en la zona costera, provenientes de fuentes naturales y antropogénicas, hacen muy difícil la evaluación de los impactos relativos que cada fuente produce a los ecosistemas. En este sentido, el uso de los isótopos estables se convierte en un importante aliado tecnológico.

Los isótopos son átomos de un mismo elemento que poseen diferente número de neutrones pero igual número de protones. Se consideran estables cuando no decaen transformándose en otros isótopos en escalas de tiempo geológico (Kendall y Caldwell, 1998).

El nitrógeno posee dos isótopos estables,  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ , cuyas proporciones son 0.99636 y 0.00364, respectivamente, y su abundancia natural se ha convertido en una herramienta útil para la determinación de las fuentes de nutrientes responsables de la eutrofización de los ecosistemas costeros, y además es de utilidad para la determinación de las rutas de su asimilación y transferencia a través de los niveles tróficos en un ecosistema (e.g. Lajtha y Michener, 1994; Kendall y Caldwell, 1998; Cole et al., 2004; Costanzo et al., 2005; Michener y Lajtha, 2007).



En este sentido, las macroalgas pueden constituir uno de los indicadores con mayor potencial para estudios de contaminación de N, ya que se ha observado que registran la composición isotópica del N de las fuentes en los sitios donde habitan, cuya identificación es esencial para la evaluación de la contribución relativa y el impacto ambiental de cada una de las fuentes en un ecosistema (Lin y Fong, 2008; Kaldy, 2011). Sin embargo, la respuesta de las macroalgas a la disponibilidad de nitrógeno puede variar entre grupos taxonómicos y entre estadios de crecimiento, y también depender de las condiciones ambientales (Cole et al., 2004). Además, las algas presentan preferencia por las diferentes formas del nitrógeno (amonio o nitrato), lo cual puede modificar los valores  $\delta^{15}\text{N}$ , debido a que el  $^{15}\text{N}$  es acumulado más rápidamente en el tejido del alga cuando se suministra  $^{15}\text{NH}_4^+$  que  $^{15}\text{NO}_3^-$ , lo cual es explicado por el bajo costo energético requerido para metabolizar amonio (Cohen y Fong, 2004). O bien, en ausencia de formas inorgánicas pueden emplear nitrógeno orgánico e incluso pueden utilizar sus reservas para construir nuevo tejido (Tyler et al., 2005; Thornber et al., 2008). Kaldy (2011) sugiere que el uso de isótopos estables en macroalgas asociado a verificación experimental se convierte en una poderosa herramienta para la evaluar las contribuciones relativas de las fuentes de nitrógeno a un ecosistema.

Para realizar este estudio se seleccionó al sistema lagunar Urías localizado en Mazatlán, Sinaloa, que es aledaño a un área altamente urbanizada (Páez-Osuna et al., 2007) y que por tanto recibe las descargas de diferentes tipos de actividades.

Este ecosistema se caracteriza además por contener una variedad de especies de macroalgas a lo largo del cuerpo lagunar y durante la mayor parte del año. Por otro lado, se hicieron bioensayos previos en el laboratorio con diferentes especies de macroalgas con el fin de

elegir a una especie en función de su tolerancia al manejo en condiciones de laboratorio y de su disponibilidad. Para tal propósito se seleccionó *Ulva lobata*.

### **I.1. Fraccionamiento isotópico en macroalgas**

Existen pocos estudios relacionados al fraccionamiento isotópico de N en macroalgas, la mayoría de ellos ignoran la fraccionación o asumen que es insignificante (Kaldy, 2011). En cambio en microalgas como diatomeas se ha medido una fraccionación de hasta 20 ‰ en el caso de asimilación de amonio y 6 ‰ cuando utilizan nitrato (Waser et al., 1998).

Este alto valor de fraccionación en presencia de amonio es atribuido a las enzimas primarias que participan en la asimilación de amonio, la glutamina sintetasa y las transaminasas. La primera es el regulador primario del metabolismo del N ya que es responsable de la reacción del amonio con el glutamato para producir la glutamina, mientras que las transaminasas son las enzimas responsables de la síntesis y degradación de los aminoácidos (catalizan la transferencia del grupo amino). La fraccionación de 20 ‰ en diatomeas en presencia de amonio es debida a la fraccionación isotópica intrínseca de la enzima glutamina sintetasa, con una significativa salida de N.

Needoba et al. (2004), estudiaron la fraccionación en un medio con nitrato en diatomeas y sugieren que la fraccionación podría seguir el siguiente orden: en el flujo del paso de nitrato a través de la membrana celular (absorción), la reducción intracelular de nitrato a nitrito hasta amonio y en la subsecuente formación de macromoléculas, y que la fraccionación ocurre durante la reducción del nitrato por la enzima nitrato reductasa junto a la salida de nitrato isotópicamente más pesado. Otros trabajos sugieren que la fraccionación

en fitoplancton ocurre en la reducción de nitrato por la enzima nitrato reductasa (Shearer et al., 1991; Needoba et al., 2004).

Cohen y Fong (2005) midieron la fraccionación isotópica de N en *Ulva intestinalis* (como *Enteromorpha intestinalis*) y no encontraron evidencia de fraccionación durante la adquisición de amonio y nitrato cuando es suministrado suficiente nutriente y señalan que no existe este proceso en algas verdes oportunistas, sin embargo estudios recientes realizados por Kaldy (2011) con *Ulva* spp., registraron al menos un 3 ‰ de fraccionación en algas verdes durante la absorción de amonio.

## **I.2. Absorción y asimilación de N por macroalgas**

El metabolismo de nitrógeno en algas marinas consiste de cinco procesos (Barr, 2007)

- 1) absorción de nitrógeno a través de la membrana celular (por difusión pasiva, facilitada o transporte activo).
- 2) Almacenamiento celular en compartimentos (vacuolas, citoplasma).
- 3) Asimilación de amonio por conversión enzimática de pequeños metabolitos (aminoácidos, purinas, pirimidinas).
- 4) Incorporación de pequeños metabolitos dentro de las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos).
- 5) Utilización de macromoléculas para el metabolismo o crecimiento de las algas.

El proceso de absorción inicia con el transporte del N inorgánico desde la columna de agua pasando a través de la membrana celular para ser almacenado en el citoplasma o las vacuolas, y continuar con la asimilación, la cual consiste en el ingreso a los cloroplastos de la forma química absorbida (amonio o nitrato) (Lobban y Harrison, 1994). En el caso del

nitrato, este debe ser reducido a amonio por las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa antes de ser asimilado (Solomonson y Barber, 1990; Tischner, 2000).

En cuerpos de agua estuarinos, la habilidad de las algas para absorber las diferentes especies químicas del nitrógeno, principalmente  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$ , depende de la variabilidad espacial y temporal de las diferentes fuentes de N que están presentes (Topinka, 1978), las cuales dependen de las aportaciones externas, así como de los procesos biogeoquímicos dentro del sistema, que resultan en el tipo de forma química de N disponible para las algas (Valiela et al., 1992; McClelland y Valiela, 1998).

Se han estudiado en una variedad de algas las formas químicas del N utilizadas en forma preferencial, y se ha encontrado que algunas algas prefieren  $\text{NH}_4^+$  (*Gracilaria*), otras prefieren  $\text{NO}_3^-$  (*Ulva* sp.) o bien, pueden utilizar indiferentemente ambas formas químicas, como ha sido demostrado con la especie *Ulva intestinalis* (syn. *Enteromorpha intestinalis*) que es capaz de absorber simultáneamente amonio y nitrato (Björnsäter y Wheeler, 1990; Lotze y Schramm, 2000; Cohen y Fong, 2004). Sin embargo, otros estudios han encontrado que el amonio puede inhibir la absorción de nitrato hasta un 50% en otras especies como: *Hypnea musciformis* y *Gracilaria pacifica* (Thomas y Harrison, 1987; Rees et al., 2007). En algunas especies de algas cafés de los géneros *Fucus*, *Laminaria* y *Macrocystis*, la presencia de amonio no inhibe la absorción de nitrato (Topinka, 1978; Ahn et al., 1998; Thomas y Harrison, 1987). Aún así, se ha demostrado que los índices de absorción y de crecimiento de las algas responden mejor al amonio (Pedersen y Borum, 1996; Naldi y Wheeler, 2002; Cohen y Fong, 2005), lo que es entendible, ya que la planta requiere menos energía para asimilar amonio en relación al nitrato, que debe ser reducido antes de ser incorporado a las rutas metabólicas de la macroalga, por lo que se entiende que existe una

absorción preferencial de las algas para el amonio, aunque su almacenamiento puede ser limitado debido a su toxicidad (Lotze y Schramm, 2000; Cohen y Fong, 2004).

Por otro lado, los compuestos nitrogenados son utilizados también en el metabolismo energético de las macroalgas, por lo cual la dinámica del N en las aguas costeras dominadas por macroalgas puede ser afectada por sus tasas de absorción y de excreción de las especies nitrogenadas presentes (Tyler y McGlathery, 2006).

### **I.3. Uso de macroalgas como biomonitores ecológicos**

Las macroalgas han resultado importantes monitores de la calidad ambiental. Muchas especies son cosmopolitas y sensitivas a una variedad de estresores ambientales, a los cuales responden rápidamente, por lo que proveen una herramienta de monitoreo en términos de información obtenida por unidad de esfuerzo (McCormick y Cairns, 1994). Sin embargo, la desventaja para su uso es que la respuesta a un contaminante puede diferir dependiendo de la especie y de las demás características ambientales.

Se considera que un organismo puede ser usado como bioindicador cuando provee evidencia de la exposición a un contaminante por su presencia y/o ausencia o por frecuencia de ocurrencia o por variaciones de sus actividades fisiológicas. Cuando el organismo bioindicador permite evaluar el estado de contaminación con base en la acumulación de ese contaminante en sus tejidos, y además permite analizar e identificar la abundancia y disponibilidad de un contaminante en un ecosistema acuático debido a su tolerancia, ese organismo es también un biomonitor (Phillips, 1990; Rainbow y Phillips, 1993).

## 2. ANTECEDENTES

El sistema lagunar Urías es uno de los ecosistemas más alterados por las actividades humanas, y uno de los mejor estudiados del país. Los primeros estudios sobre este sistema fueron realizados por Álvarez-Léon (1977), el cual mencionó el impacto del exceso de nutrientes y material orgánico vertidos como efecto de las actividades humanas. Dos décadas más tarde, Páez-Osuna et al. (1997) reportaron altas concentraciones de nitrógeno inorgánico (N como amonio), con mayor acumulación hacia la cabecera lagunar y principalmente en época de secas. Las altas concentraciones fueron relacionadas con las actividades acuícolas realizadas en esta parte del sistema y a las descargas domésticas y de la industria alimenticia en la parte central. Sin embargo, las concentraciones reportadas fueron comparables con las encontradas en otros sistemas lagunares de México con intensas actividades en su cuenca de captación (De La Lanza-Espino, 1994).

En un estudio posterior sobre las variaciones espacio-temporales de los nutrientes dentro del sistema, Ochoa-Izaguirre (1999) registró concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) de hasta 51.4  $\mu\text{M}$  en sitios específicos del sistema, siendo el amonio la especie química predominante (75% del NID). Estas altas concentraciones se relacionaron con aportes de escurrimientos de la cuenca de captación, principalmente relacionados con aguas residuales domésticas. Del Río-Chuljak (2003) determinó la concentración y el aporte de nutrientes en el sistema de Urías, así como el tiempo de residencia y su variabilidad estacional, sus resultados mostraron una heterogeneidad a lo largo del año, con un tiempo de residencia de 7.5 días.

Existen numerosos estudios que abordan la variabilidad temporal en el metabolismo béntico y el ciclo del N en ecosistemas templados, sin embargo, en aguas tropicales y

subtropicales estos estudios son escasos en relación con el incremento de las actividades humanas en los últimos años (Ferguson y Bradley, 2010).

En aguas costeras la vegetación béntica forma la base de la estructura y funcionamiento del ecosistema (Viaroli et al., 2008), y las principales causas de los cambio y de la sucesión de las macrofitas son las cargas de nutrientes, principalmente el nitrógeno. Las plantas marinas absorben y asimilan el exceso de nutrientes en la columna de agua y lo acumulan en sus tejidos, actuando como integradores confiables a largo plazo de cargas continuas de nitrógeno (Jones et al., 2001; Cohen y Fong, 2005; Cole et al., 2005).

Los estudios de isótopos estables para determinar fuentes de nitrógeno en ambientes costeros mexicanos son escasos. Entre éstos, Mutchler et al. (2007) determinaron el  $\delta^{15}\text{N}$  de 10 especies de macroalgas verdes y 3 especies de pastos marinos del Caribe Mexicano y verificaron que los valores encontrados estaban relacionados con entradas de nitrógeno desde el medio terrestre, mientras que Soto-Jiménez et al. (2003), mediante las proporciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , determinaron que la materia orgánica de los sedimentos del sistema Altata Ensenada del Pabellón se origina principalmente por el fitoplancton, cuyo crecimiento está influenciado directamente por nutrientes derivados de la actividad agrícola, agroindustrial y por las descargas domésticas.

Posteriormente, García-Pagés (2007) caracterizó química e isotópicamente fuentes naturales y antropogénicas de nitrógeno del mismo sistema y Piñón-Gimate et al. (2009) estudiaron el  $\delta^{15}\text{N}$  en especies de macroalgas de tres lagunas costeras del litoral de Sinaloa, incluyendo Altata Ensenada del Pabellón, y concluyeron que la señal isotópica fue variable dependiendo de los sitios, los valores más altos de  $13.6\pm 0.1\%$  se relacionaron con entradas de aguas residuales urbanas.

Recientemente se publicó un trabajo realizado en parte en el sistema de Urías y en otras lagunas costeras del mundo (Teichberg et al., 2010), en el cual se experimentó *in situ* con *Ulva* spp., para determinar la importancia de la limitación por nitratos y fosfatos y además, utilizando el  $\delta^{15}\text{N}$  del tejido de *Ulva* spp., se concluyó que los valores más altos de  $\delta^{15}\text{N}$  se asociaron con incrementos en la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto, asociados con descargas residuales urbanas.



### 3. HIPÓTESIS

1.- Se espera encontrar variaciones de las señales  $\delta^{15}\text{N}$  relacionadas con las fuentes de N en las macroalgas recolectadas en el sistema lagunar Urías, y que estas variaciones permitan determinar mediante un modelo de mezcla la contribución relativa de cada una de las fuentes que llegan al sistema.

2.- Se espera encontrar diferencias en la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las mismas especies de macroalgas expuestas a las diferentes fuentes en el sistema.

3.- No habrá diferencias en la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las diferentes especies de macroalgas que habitan en un mismo sitio y que por tanto están expuestas a las mismas fuentes de nitrógeno.

4.- No habrá fraccionación isotópica en especímenes de una especie de macroalga expuesta en condiciones de laboratorio a diferentes formas químicas de N y señales  $\delta^{15}\text{N}$ , basado en una de las premisas que sustenta el uso de las macroalgas para identificar fuentes de N.

5.- Se espera encontrar diferencias en la tasa de crecimiento de los especímenes de la macroalga expuestos a la misma concentración de amonio y nitrato como resultado de la forma química preferente. Asimismo, cuando sean expuestas a nitrato de amonio la tasa será más cercana a la tasa de la forma química preferente.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el uso de las macroalgas como biomonitores de las fuentes de contaminación por nitrógeno en una laguna costera subtropical bajo condiciones naturales y controladas.

### **4.2. Objetivos específicos**

- 1.- Identificar y caracterizar isotópicamente las fuentes de aporte de nitrógeno al sistema lagunar Urías.
- 2.- Caracterizar física, química e isotópicamente el agua del sistema lagunar Urías, con particular atención a los compuestos de nitrógeno.
- 3.- Caracterizar la flora ficológica del sistema lagunar Urías.
- 4.- Analizar la variabilidad isotópica ( $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ ) de las especies de macroalgas recolectadas en diferentes épocas climáticas y sitios del sistema lagunar Urías.
- 5.- Verificar si hay correspondencia entre las señales isotópicas de las macroalgas y de las fuentes de nitrógeno dominantes en el sitio de colecta.
- 6.- Determinar las contribuciones relativas de las fuentes de N a las señales  $\delta^{15}\text{N}$  registradas en las macroalgas.
- 7.- Determinar las tasas de absorción, asimilación y de crecimiento de la especie selecta *Ulva lobata* expuesta experimentalmente a diferentes concentraciones de amonio, nitrato y nitrato de amonio.
- 8.- Determinar el fraccionamiento isotópico en *U. lobata* sometida a experimento con amonio y nitrato.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Área de estudio**

El sistema lagunar Urías, conocido como estero de Urías (Figura 1), se localiza entre los 23°09'00" a 23°13'00" N y 106°20'00" a 106°25'25" W en la entrada al Golfo de California y mantiene comunicación libre con el mar a través de una boca permanente. Su superficie es aproximadamente 1,800 ha, con un espejo de agua de 1,280 ha. (Páez Osuna et al. 2007).

El clima es tropical-subtropical con temperatura media anual de 24.7°C, la precipitación anual es de 365 a 2621 mm con una media de 882 mm. La evaporación varía de 40.3 a 64.3 mm por año con promedio de 49.5 mm y un patrón meteorológico que presenta tres épocas muy bien marcadas, una de lluvias de julio a octubre con tormentas tropicales, una segunda de secas frías de noviembre a abril y una de secas cálidas, de mayo a junio (CNA, 2009).

El sistema no tiene aporte continuo de agua dulce y únicamente en época de lluvias recibe escurrimientos de algunos esteros tributarios, por lo que sus características físicas y químicas están altamente influenciadas por las mareas.

De acuerdo a la salinidad, en el sistema lagunar se observan diferentes ambientes; salobre o lagunar (<30 ups), lagunar-marino (30-34 ups), marino (35±1 ups), e hipersalino (>36 ups). Además, de acuerdo a las actividades urbanas que se desarrollan a su alrededor, el sistema comprende cinco secciones: 1) La parte superior es donde se reciben los mayores aportes de agua dulce desde los escurrimientos terrestres y algunos canales adyacentes, así como aguas de desechos acuícolas, y está cubierta por manglar, 2) La cabecera lagunar que representa la zona con mayor distribución del manglar en sus márgenes, y recibe escurrimientos de tierras agrícolas y de aguas residuales urbanas, además de desechos

acuícolas, 3) La zona industrial que comprende la mayor parte del sistema, donde se reciben las descargas de aguas residuales de las industrias que procesan alimentos marinos (atún y camarón), la descargas residuales urbanas y de la planta termoeléctrica, 4) el canal de navegación donde se concentra la flota naviera tanto turística como mercante y 5) La zona de la entrada portuaria (boca).

## **5.2. Trabajo de campo**

### **5.2.1. Selección de los sitios de muestreo**

Los sitios de muestreo se seleccionaron de acuerdo al impacto de las diversas actividades que ahí se realizan, que coincidieron con el aporte de las diferentes fuentes de nitrógeno. Con un recorrido prospectivo a lo largo del sistema lagunar se ubicaron 20 sitios de muestreo a lo largo del sistema, incluyendo uno inmediatamente en el exterior (Figura 1). En cada sitio, se tomaron mensualmente muestras de macroalgas y de agua, durante un ciclo anual de febrero de 2009 a marzo de 2010. Para este estudio los sitios ubicados en la cabecera lagunar fueron considerados como del hábitat lagunar (E1-E5), los sitios ubicados ente la zona de transición del hábitat lagunar y lagunar marino (E6-E8) y los de la zona industrial (E9-E17) fueron considerados como del hábitat lagunar-marino. Los sitios ubicados en la boca (E18 a E20) fueron considerados del hábitat marino.

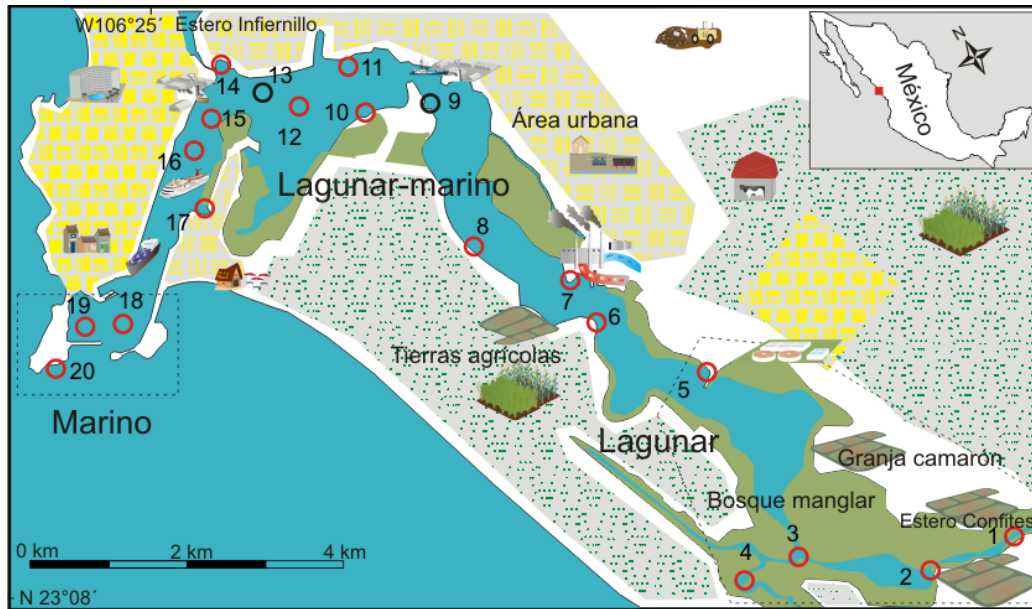


Figura 1. Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreo.

### 5.2.2. Descripción de los sitios de muestreo

#### Sitios E1 a E5

Localizados en la cabecera lagunar, que se caracteriza por la presencia del bosque de manglar, integrado por tres especies de mangle (Agraz-Hernández, 1997): *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), *Avicennia germinans* (L) L. (mangle negro) y *Laguncularia racemosa* (L) G.F. Gaertn (mangle blanco). Recibe la mayor entrada de agua dulce proveniente de escurrimientos en época de lluvias. Las mayores aportaciones de nitrógeno son los efluentes de las granjas camaronícolas y los fertilizantes agrícolas de los cultivos de temporal acarreados por los escurrimientos en los periodos de lluvias. Además, representa la parte más vulnerable a la contaminación debido a la baja tasa de recambio de agua que permite la acumulación de contaminantes (Montaño-Ley et al., 2008). Las macroalgas recolectadas se encontraron sobre raíces de mangles y/o sustratos fangosos.

#### Sitios E6 a E8

Estos sitios se ubicaron en la zona de transición entre el hábitat lagunar y el lagunar marino, donde inician las actividades industriales. Se caracterizan por estar influenciadas por la planta termoeléctrica que arroja aguas sobrecalentadas al sistema; el área también recibe aguas residuales provenientes de empacadoras y procesadoras de mariscos con altas cargas de nitrógeno (Páez-Osuna et al., 2007). En estos sitios las macroalgas se recolectaron sobre sustratos fangosos y arenosos.

#### Sitios E9 a E17

Estos sitios se ubicaron en la zona donde se desarrollan las actividades de la zona naval y portuaria, principalmente las operaciones de las flotas atunera, camaronera y mercante. Aquí, se ubican las plantas procesadoras de mariscos (Páez-Osuna et al., 2007), y más recientemente se ha ubicado en la zona un mercado de mariscos. También se descargan desechos domésticos provenientes de asentamientos urbanos de su alrededor. El patrón de circulación residual del sistema modula la dispersión de contaminantes y en esta zona la circulación del agua efectúa dos giros, uno anticiclónico y el otro ciclónico (Montaño-Ley et al., 2008), que probablemente provoca una mezcla de las diferentes fuentes de aguas usadas que inciden en esta zona. Las macroalgas se recolectaron sobre sustratos arenosos/fangosos, así como sobre sustratos sólidos diversos (boyas, pilotes, madera).

#### Sitios E18 a E20

Se ubicaron en la zona del antepuerto justo en la boca del sistema lagunar, donde el ambiente es completamente marino y donde se mezclan las aguas provenientes del interior

del sistema con las del exterior. En estos sitios las macroalgas se recolectaron sobre sustratos rocosos, boyas o pilotes.

### **5.2.3 Recolección de muestras de agua para identificar y caracterizar isotópicamente las fuentes de N**

La ubicación de los sitios de muestreo para la identificación de las fuentes naturales y antropogénicas de N que entran al sistema, se realizó paralelamente con el estudio prospectivo. De acuerdo a las actividades humanas que se realizan a su alrededor (agricultura, acuicultura, procesamiento de productos pesqueros), se tomaron muestras de agua (4 litros) de las descargas de estos sitios. Para la identificación de fuentes naturales como es la entrada de agua marina, se tomaron muestras del exterior del sistema lagunar, así como de agua de lluvia para medir la entrada de N atmosférico. A cada muestra se le determinó la concentración de amonio y nitrato para seleccionar la forma química dominante, la cual fue preparada para el análisis isotópico de acuerdo al protocolo que se describe en los siguientes capítulos.

Las cargas de N ( $\text{ton año}^{-1}$ ) que entran al sistema fueron calculadas mediante el modelo NLOAD ([www.nload.mbl.edu](http://www.nload.mbl.edu)), descrito por Valiela (1997, 2002)

### **5.2.4. Medición de variables físicas y químicas**

En cada sitio de muestreo se tomaron datos de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH por medio de una sonda YSI 6600, y se recolectaron muestras de agua en botellas de polietileno de alta densidad (HDPE) de 1 litro previamente lavadas con HCl 2M para los análisis de nitrógeno disuelto, inorgánico y total. Las muestras de agua se guardaron en una

hielera con temperatura baja hasta su transporte a la sala de acuarios del ICMYL, Unidad Mazatlán, donde las muestras se filtraron mediante filtros Whatman GF/F libres de nitrógeno y previamente incinerados en una mufla a 450°C por 4 horas, con capacidad de retención de partículas de 0.70 µm. La filtración se realizó hasta la saturación del filtro mediante el uso de una bomba de vacío.

Se tomaron alícuotas de 200 ml del agua filtrada para determinar el nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en sus diferentes formas (amonio, nitrito y nitrato), así como el nitrógeno disuelto total (NDT), el nitrógeno orgánico disuelto (NOD) se estimó por diferencias. Las alícuotas se mantuvieron en congelación a -18°C hasta el análisis correspondiente.

#### **5.2.5. Determinación de nitrógeno disuelto y sus especies**

La concentración de las diferentes especies de nitrógeno inorgánico disuelto se determinó de acuerdo a Strickland y Parsons (1972) y Solórzano (1969) para amonio. El nitrógeno disuelto inorgánico (NID) total se obtuvo sumando las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato. El nitrógeno disuelto total (NTD) se determinó de acuerdo a Grassoff et al. (1983) y el nitrógeno orgánico disuelto (NOD) se determinó por diferencia entre el NDT y el NID. El límite de detección de amonio fue de 0.042 µM y el de nitrato y nitritos 0.71 µM con un coeficiente de variación de 12.4 y 15% respectivamente.

#### **5.2.6. Recolección de muestras de macroalgas**

Paralelamente con las muestras de agua se recolectaron en cada sitio y salida 5-6 especímenes de cada especie de macroalgas por buceo libre o directamente desde la embarcación menor y se limpió cuidadosamente cada espécimen con agua de mar del sitio



para eliminar epibiontes visibles y sedimentos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y se guardaron en hieleras a temperaturas bajas para su transporte al laboratorio.

En el laboratorio, las macroalgas se lavaron con agua de mar filtrada y fueron cepilladas utilizando una brocha suave con el fin de eliminar la mayoría de los epibiontes, finalmente se enjuagaron con agua MilliQ. Se pesaron en húmedo y se guardaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas separadas por taxón, sitio y fecha de muestreo, y cuando fue posible por estadios de crecimiento (juveniles y adultos). Posteriormente se congelaron a temperatura  $< -20^{\circ}\text{C}$ .

Un ejemplar de cada especie fue separado y preservado en una solución de formaldehído al 4% en agua de mar para su identificación a nivel de especie, la cual se realizó mediante la observación al microscopio de la forma del talo, tipos de ramificaciones, células de crecimiento, estructuras reproductivas, arreglo de células medulares y corticales. Para ello, se utilizaron claves dicotómicas y las monografías disponibles para las costas del Pacífico oriental subtropical (Abbott y Hollenberg, 1976; Ochoa Izaguirre et al., 2007).

### **5.3. Trabajo de laboratorio**

#### **5.3.1. Selección de la especie de macroalga para los experimentos**

Para la realización de los experimentos, se seleccionaron las especies más representativas del sistema lagunar en estudio y se evaluó el grado de epibiosis y su resistencia a las condiciones experimentales. Al final la especie seleccionada fue *Ulva lobata* (Anexo 1), por ser una de las especies más resistentes a manipulación y presentar menor grado de epibiosis. Con esta especie se realizaron diferentes experimentos para cuantificar las tasas

de absorción y asimilación de amonio y nitrato, las tasas de crecimiento, para determinar la relación entre la señal del alga y la fuente de nitrógeno a la que se expuso (efecto fuente-respuesta) y determinar el fraccionamiento isotópico de las diferentes formas químicas de nitrógeno inorgánico.

### **5.3.2. Experimento de absorción de $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$ por *Ulva lobata***

Especímenes de *U. lobata* fueron expuestos en cuadruplicado a diferentes concentraciones de amonio o nitrato (como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaNO}_3$ ) en frascos de plástico transparente de 2 litros repartidos aleatoriamente. En cada frasco, debidamente etiquetado, se adicionaron 1.5 L de agua de mar filtrada y pasada por luz UV, con concentración de amonio o de nitrato correspondiente. Previo a los experimentos los especímenes fueron aclimatados en agua de mar que contenía 2.5  $\mu\text{M}$  de amonio y 3  $\mu\text{M}$  de nitrato (35 y 42  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente).

Los especímenes de *U. lobata* fueron expuestos a tres tratamientos con diferentes concentraciones, para amonio: 12.5  $\mu\text{M}$  (175  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), 52.5  $\mu\text{M}$  (735  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y 102.5  $\mu\text{M}$  (1,435  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); para nitrato: 13  $\mu\text{M}$  (182  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), 53  $\mu\text{M}$  (742  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y 103  $\mu\text{M}$  (1,442  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente. El agua de mar fue enriquecida con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y el experimento se realizó sin recambio de agua. En cada frasco se colocaron cuatro especímenes de macroalga sanos y libres de epibiontes visibles, previamente pesados ( $\approx 1$  g de peso húmedo), con fotoperiodo 12:12 horas luz-oscuridad (5000-6000 lux), temperatura: 23-25 °C, pH: 7.8-8.2 y salinidad 35-36 ups. Durante los experimentos se mantuvo aireación mediante el burbujeo suave de aire comprimido y se tomaron muestras de agua ( $\sim 100$  ml) a diferentes tiempos: Inmediatamente después de la adición y homogenización del nutriente, a las 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Cada

muestra de agua fue filtrada con filtros GF/C e inmediatamente refrigerada y analizada para amonio y nitrato + nitrito.

### **5.3.3. Experimento de asimilación, crecimiento y fraccionación de N por *Ulva lobata***

Siguiendo la metodología anterior, se realizó un segundo experimento con el objetivo de estudiar el efecto de la disponibilidad de N sobre el crecimiento del alga, para lo cual se determinaron las tasas de absorción, asimilación y crecimiento de especímenes expuestos a diferentes concentraciones de nitrato, amonio y una sal compuesta de nitrato de amonio. Además de las concentraciones anteriores en este experimento se probó un cuarto tratamiento con 502.5  $\mu\text{M}$  (7,035  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de amonio y 503  $\mu\text{M}$  (7,042  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de nitrato, además de 1,005  $\mu\text{M}$  (14,077  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de nitrato de amonio. La razón del cuarto tratamiento se relaciona con las máximas concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto medidas en el sistema Urías de 400  $\mu\text{M}$  (5,600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

El tiempo de exposición al nutriente fue de 9 días con recambio diario de agua, y la toma de muestras de agua para los análisis químicos se hizo cada 24 horas. Al concluir el experimento las algas fueron cuidadosamente extraídas de los frascos y pesadas con una balanza de precisión de lectura de 0.0001g.

Cálculos de las tasas

La tasa de absorción ( $v_{\text{abs}}$ ,  $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{ dw h}^{-1}$ ) se determinó con la ecuación (Pedersen, 1994):

$$v_{\text{abs}} = (S_0 * V_0) - (S_t * V_t) / (B * t)$$

donde  $S_0$  y  $S_t$ , son las concentraciones del sustrato al inicio y final de cada intervalo de tiempo de muestreo,  $V_0$  y  $V_t$  son los volúmenes de agua al inicio y al final de la toma de muestra, B es la biomasa en peso seco y t el tiempo de exposición.

La tasa de asimilación ( $v_{\text{asimil}}$ ) fue calculada con la ecuación:

$$v_{\text{asimil}} = [(N*B)_{\text{final}} - (N*B)_{\text{inicial}}]/t$$

donde:

N representa el contenido de N en el tejido del alga y B la biomasa seca en la macroalga al inicio y al final del experimento y t el tiempo de exposición.

La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) se calculó con base en la ecuación (Pedersen y Borum, 1996):

$$\mu = \ln(B_t/B_0)/t$$

donde  $B_t$  y  $B_0$  representan la biomasa en peso seco al inicio y al final del experimento, y t tiempo de duración del experimento.

A partir de la relación entre la tasa de crecimiento y el contenido de N en el alga al final del experimento, se determinó la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) (Pedersen y Borum, 1997):

$$\mu = \mu_{\text{max}} (1 - N_Q/N)$$

donde:

$N_Q$  es el contenido mínimo de N en el alga para sostener el crecimiento, N la concentración final de N en el alga. El valor de  $N_Q$  y la concentración crítica de N ( $N_c$ ) necesaria para soportar la tasa máxima de crecimiento de *U. lobata* fue calculada con la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) en función de la concentración de N en el alga.

Además se evaluó la discriminación isotópica mediante la estimación de la diferencia entre la composición isotópica del  $\delta^{15}\text{N}$  del nuevo tejido formado con el de la señal de N en las soluciones de prueba. Para esto, asumiendo que el tejido nuevo se encuentra en los últimos milímetros de las algas, se obtuvieron muestras del tejido periférico al principio y al final

de los experimentos para determinar su composición isotópica. Asimismo, se analizaron para isótopos estables las sales de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (alícuotas ~1 mg, triplicados) empleadas en los experimentos.

## 5.4. Análisis isotópico

### 5.4.1. Agua

Difusión de N para análisis isotópico de agua y en efluentes

Dependiendo de las formas inorgánicas de N dominantes en las muestras filtradas de los efluentes y del agua de la columna, se aisló por difusión el  $\text{NO}_3^-$  y/o  $\text{NH}_4^+$  usando los métodos propuestos por Sigman *et al.* (1997) y Holmes *et al.* (1998). La determinación del  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  se basa en la conversión de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  bajo condiciones alcalinas y la del  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  por la reducción total del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  seguido de la conversión alcalina a  $\text{NH}_3$ , difusión y captura en los filtros de difusión GF/D. El filtro GF/D se impregna previamente con una solución de  $\text{KHSO}_4$  por lo que el  $\text{NH}_3$  es convertido nuevamente a  $\text{NH}_4^+$ . El proceso se realiza durante 12 días bajo agitación continua a 120 rpm y a una temperatura de 40-50 °C. Transcurrido este tiempo, los filtros se lavan con agua destilada MilliQ, y se colocan en un vial de centelleo dentro de un desecador en un ambiente de HCl concentrado durante 4 horas para eliminar carbonatos. Después, los filtros son secados en una estufa a 60 °C por 2 horas y son finalmente empacados en un vial de 9 x 5 mm para su análisis isotópico.

En cada corrida para el aislamiento de  $\text{NH}_4^+$  y/o  $\text{NO}_3^-$  se incluyeron estándares preparados con agua de mar artificial y adición de las sales correspondientes a las formas químicas ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ : J.T. Baker, No. Lote A41C61 y  $\text{KNO}_3$ : Merck, No. Lote M-29093) y en los

rangos de concentraciones al de las muestras analizadas (5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Además, de un triplicado de blanco con agua Milli-Q conteniendo todos los reactivos, excepto el nutriente. Con el fin de calcular el fraccionamiento ocurrido durante el proceso de difusión, los filtros GF/D de los estándares y réplicas de 1 mg de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fueron analizados para contenido de N y composición isotópica. El cálculo del fraccionamiento por difusión ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{difusión}}$ ) está basado en una simple diferencia entre la relación isotópica original de la sal y la relación resultante en el estándar después de la difusión. La eficiencia del proceso de extracción de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  se estimó como la relación entre el contenido de N capturado el filtro GF/D y la cantidad de N en el estándar o en la muestra según su concentración. En este estudio los resultados aceptados fueron para lotes con recuperación  $>80\%$ , y los resultados se corrigieron por el factor de fraccionación por difusión ( $\epsilon = 0.2[\% \text{ recuperación}] - 19.95$ ) (Holmes *et al.* 1998).

#### **5.4.2. Macroalgas**

Las macroalgas fueron pesadas en fresco y congeladas. Posteriormente, las muestras se liofilizaron durante tres días y, una vez seca, cada muestra se pesó, se molió utilizando un mortero de porcelana previamente lavado con  $\text{HCl}$  2M y se guardó en viales de vidrio de cierre hermético, debidamente etiquetadas.

Las muestras fueron expuestas a vapores de  $\text{HCl}$  concentrado durante 4 horas a temperatura ambiente, para eliminar los carbonatos y obtener exclusivamente la señal isotópica del carbono orgánico. Posteriormente, se desecaron en una estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 2 horas para obtener el secado total de las muestras.

Una vez descarbonatadas, se pesaron 5 mg de cada muestra en viales de estaño de 6x4 mm y junto con los filtros de las muestras de agua previamente empacados en viales se colocaron en charolas rotuladas y selladas con papel parafilm para mantenerlas en su posición. Las charolas fueron enviadas al laboratorio de isotopía estable de la Universidad de California en Davis, Ca. USA.

#### **5.4.3. Medición de isótopos estables de N**

Para la detección y cuantificación de los isótopos de N se utilizó un analizador elemental Carlo Erba acoplado a un espectrómetro de masas de flujo continuo para relaciones isotópicas (20-20, Europa Scientific), las muestras se procesan de acuerdo al protocolo siguiente (Barrie y Prosser 1996): (1) preparación de la muestra, lo cual implica la producción de gas puro únicamente del compuesto o elemento de interés; (2) purificación criogénica o cromatográfica del gas; (3) introducción del gas en el espectrómetro de masas; (4) ionización para producir especies cargadas positivamente; (5) aceleración y dispersión de diferentes masas en un campo magnético a través de una deflexión; (6) Impacto y detección de masas sobre diferentes recolectores; (7) medición de las proporciones de los isótopos en el gas ionizado a través de un amplificador y registrador.

Los valores isotópicos del N son reportados con referencia al nitrógeno atmosférico, que es el estándar convenido internacionalmente. Las señales isotópicas  $\delta^{15}\text{N}$  se calculan mediante la ecuación:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{referencia}}) - 1] \times 1000$$

Donde: R = proporciones de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  en la muestra y en el material de referencia, respectivamente. La letra griega delta ( $\delta$ ), es usada para indicar el valor resultante de la

fórmula. Los resultados para las muestras sólidas se expresan simplemente como  $\delta^{15}\text{N}$ , mientras que para nitratos y amonio de las difusiones se expresan como  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  y  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ , respectivamente. La precisión reportada por el laboratorio es de aproximadamente 0.2‰.

### **5.5. Tratamiento estadístico**

Se aplicaron pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza a los datos de temperatura, salinidad y nutrientes (amonio, nitrato + nitrito, NID, NOD y NDT) en las muestras de agua. Para ello, se utilizaron las pruebas de Lilliefors y de Bartlett, respectivamente (Zar, 1984). Se hicieron comparaciones de estas variables entre épocas climáticas, y entre ambientes mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando los datos no fueron normales y homoscedásticos se aplicaron pruebas de Kruskal Wallis con pruebas confirmativas de Dunn.

Se evaluó la variabilidad de  $\delta^{15}\text{N}$  entre individuos de la misma especie (intraespecífica) y entre las especies de macroalgas (interespecífica) considerando los diferentes hábitats (lagunar, lagunar-marino y marino), las épocas climáticas (lluvias, secas cálidas y frías) y especies.

Los sitios de recolecta fueron anidados en hábitat (tres niveles: 5 sitios en el hábitat lagunar, 12 en el lagunar-marino y 3 en el marino), y las fechas de muestreo fueron anidadas en tres niveles: 2 muestreos en secas cálidas, 6 en secas frías y 5 en lluvias. Debido a que no todas las especies estuvieron presentes y/o presentaron suficiente número de muestras en los tres hábitats o épocas climáticas, algunas especies no fueron consideradas para este análisis estadístico.



Mediante un análisis factorial de tres vías se obtuvo un modelo de ajuste para estimar la influencia de otros factores, además de las fuentes, sobre la composición isotópica de N en macroalgas. El modelo fue basado en la inclusión de los efectos principales de cada factor y sus interacciones, para lo cual se incluyó al hábitat, época climática y especies como factores principales que influyen en la señal isotópica, además de los siguientes efectos combinados: “hábitat-época climática”, “hábitat-especie”, “época climática-especie” y “hábitat-época climática-especie”. El modelo se corrió bajo las siguientes consideraciones: efectos anidados, variables fijas, mínimos cuadrados estándares y efecto Leverage. El modelo genérico de tres vías MANOVA se expresa como:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{ijmn}) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_m + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{im} + (\beta\gamma)_{jm} + (\alpha\beta\gamma)_{ijm} + \epsilon_{ijmn}$$

Siendo  $\mu$  el valor del intercepto del modelo de ajuste, y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  los factores con efectos significativos sobre la señal isotópica, mientras que  $ijmn$  representan las constantes estimadas para cada factor. Algunos parámetros no fueron calculados por el modelo, sino que se establecieron exógenamente a partir de datos de campo y de experimentos de laboratorio.

Para comparar los grupos de especímenes de diferentes especies de macroalgas recolectados en el mismo hábitat y época climática y grupos de las mismas especies en diferente hábitat y/o época climática se aplicó un análisis multivariado (MANOVA) con repeticiones independientes. Cuando el análisis mostró diferencias, éstas fueron probadas mediante la prueba Tukey-Kramer HSD (Honestly significant difference). Se utilizaron los paquetes estadísticos EXCEL 2011, Statistic 7.0, SigmaStat 3.5 y JMP 9.0.

## 5.6. Estimación de las contribuciones relativas

Para estimar la contribución relativa de las fuentes de nitrógeno al contenido de N de las macroalgas se utilizó el modelo de mezcla binaria o ternaria, dependiendo el número de fuentes identificadas. En estos modelos, se consideraron entre dos y hasta tres componentes o fuentes (end-members). Se estimó la señal isotópica en el agua basado en un balance de mezcla binaria considerando la concentración de las dos formas inorgánicas de N (amonio y nitrato) y sus composiciones isotópicas según su fuente de origen. En el caso de dos fuentes de la misma forma química, pero con  $\delta^{15}\text{N}$  significativamente distinto se utilizó un modelo de mezcla de tres componentes. Además, se consideró que ciertos procesos biogeoquímicos relacionados con el ciclo del N que ocurren en el ecosistema modifican la señal isotópica de la fuente. Entre éstos, la volatilización de amonio, la desnitrificación y la asimilación de nitrógeno inorgánico tienden a incrementar la señal isotópica en la columna de agua. En este estudio, el efecto que tienen estos procesos sobre las señales isotópicas se modeló considerando la temperatura, la salinidad, el tiempo de residencia, y el tiempo transcurrido desde la descarga en el caso de fuentes temporales. La señal de predicción en el agua fue entonces comparada con la determinada en los especímenes de macroalgas estudiados.

A partir de los datos isotópicos medidos en los especímenes de macroalgas recolectadas en cada sitio de muestreo y de las señales isotópicas  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  y  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  de las fuentes en el agua, se determinó la contribución relativa de N por cada fuente en el organismo. Para tal propósito se utilizó primeramente el software IsoSource para la ecuación de mezcla de los isótopos (Phillips y Gregg, 2003). La resolución de los modelos de mezcla se realizó además con el software MixSIR (<http://conserver.iugocafe.org>) basado en estadística

Bayesiana y en la inclusión de información útil para estimar la probable distribución de las contribuciones de las fuentes de N al sistema lagunar (Moore y Semmens 2008). Mayores detalles son presentados en Ochoa-Izaguirre y Soto-Jiménez (2013).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Identificación y caracterización isotópica de las fuentes de aporte de nitrógeno al sistema lagunar Urías.**

#### **6.1.1. Identificación de fuentes de N que entran al sistema**

Se identificaron fuentes de N relacionadas con actividades humanas: N- agrícola del uso de fertilizantes N-acuicultura de efluentes de granjas que cultivan camarón, N-urbano doméstico, N-actividades industriales del procesamiento de productos pesqueros y quema de combustibles fósiles. El N atmosférico incluye la volatilización de nitrógeno principalmente en forma de amoníaco que proviene de los fertilizantes agrícolas, y amonio de excretas de animales. Algunas de estas fuentes resultan en la descarga puntual de N a través de canales y tuberías de desagüe directamente al sistema, o bien a través de descargas difusas que incluyen el depósito atmosférico y la entrada de aguas subterráneas, además, de la entrada de N de origen marino que ocurre a través de la boca del sistema.

Las cargas de N que entran a Urías se muestran en la Figura 2. Considerando una población de 160,825 ha en la subcuenca y una emisión de  $2.19 \text{ kg N año}^{-1}$  por habitante (Páez-Osuna et al., 2007), se estimó una descarga de N por descargas urbanas de  $190.2 \text{ ton de N año}^{-1}$ .

En la subcuenca de Urías ( $28.20 \text{ km}^2$ ), opera una planta de tratamiento localizada en el poblado El Castillo, con una capacidad instalada de 8.9 litros por segundo, lo que representa una cobertura menor al 10% de la población en dicha subcuenca. Las plantas que operan bajo el sistema de tratamiento secundario con reactor enzimático, producen efluentes de  $11.4 \text{ mg de N L}^{-1}$  (Ramírez Pérez, 2008), por tanto la descarga estimada al sistema Urías fue de  $5 \text{ ton año}^{-1}$ , por lo que la mayor cantidad de N generado por la población, es arrojado al sistema sin tratamiento. Siguiendo el modelo de Valiela et al.

(1997, 2002), las descargas que ocurren a <200 m de la línea de costa, presentan una pérdida del 40 % de N. De la agricultura se estimaron 97.4 ton año<sup>-1</sup> que corresponden a las aportaciones de 8,470 ha de tierras agrícolas de temporal; de las actividades acuícolas se estimaron 33 a 52 ton año<sup>-1</sup> de 400 ha de las cuales operan regularmente 300 ha, considerando que en promedio operan 120 días al año (1.68 ciclos año<sup>-1</sup>) y descargan al máximo por ciclo 65.6 kg N ha<sup>-1</sup> (Páez-Osuna et al., 2007). Del procesamiento de productos marinos se estimaron entre 6 y 12 ton año<sup>-1</sup>, basada en el procesamiento de 192 ton d<sup>-1</sup> de productos pesqueros y tomando en cuenta que esas aguas son tratadas de acuerdo a la NOM-001-ECOL-1996. El depósito atmosférico de nitrógeno fue de 203 ton.año<sup>-1</sup>, calculado multiplicando el área de la subcuenca (28,200 ha) por la tasa de depósito atmosférico estimada por Páez-Osuna et al. (2007) de 7.2 kg ha año<sup>-1</sup> para la cuenca de Mazatlán. La carga de N de origen marino, se estimó multiplicando el volumen de marea para el sistema Urías ( $7.3 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ d}^{-1} * \text{índice de descarga}$ ) por la concentración promedio N del mar adyacente (132 mg m<sup>-3</sup>). Esto da un estimado de 94.1 ton año<sup>-1</sup>. Sin embargo, la exportación es de 281 ton N año<sup>-1</sup>.

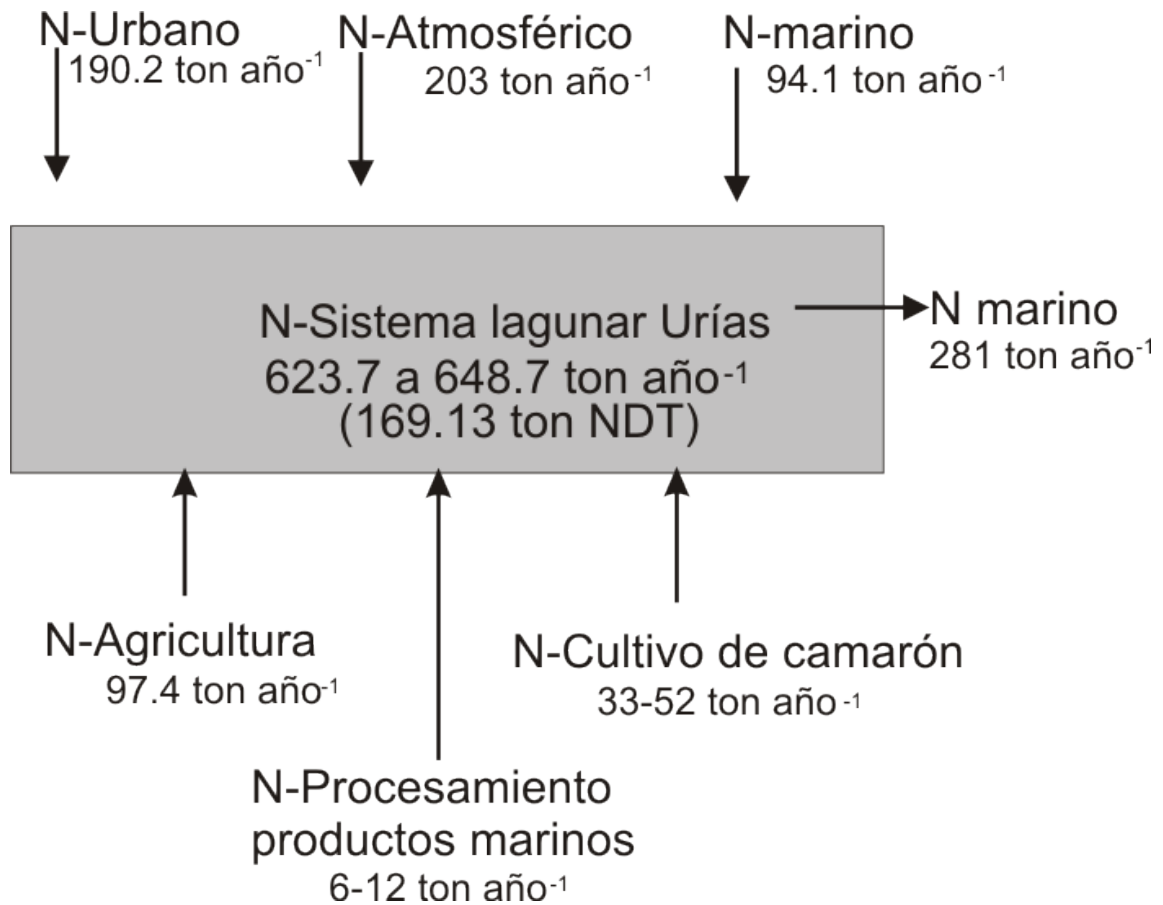


Figura 2. Entradas de N (ton año<sup>-1</sup>) al sistema lagunar Urías proveniente de las diversas actividades humanas que se desarrollan a su alrededor.

Las cargas anuales de N que entran al sistema Urías son de 315 a 364 kg de N por hectárea (1,800 ha de espejo de agua). Esta carga es inferior a la calculadas para el sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón (1,409 a 2,331 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>), el cual es un sistema altamente impactado por actividades agrícolas (191,589 ha de cultivos de temporal y 118,552 ha de agricultura de riego), ganadería intensiva (bovina, porcina, avícola), población cercana al millón de habitantes en su cuenca, así como 7,750 ha dedicadas al cultivo de camarón (Páez Osuna, 2007; García-Pagés, 2007). De acuerdo a los datos reportados por el Conservation Council of New Brunswick (2004) las aportaciones de N al

sistema Urías son superiores a los valores registrados en otros estuarios de diversos sitios de Estados Unidos de Norteamérica, que reciben cargas que varían de 3.85 a 45.78 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, en gran parte (65%) proveniente de la depositación atmosférica (Anexo 2).

### **6.1.2. Caracterización isotópica de las fuentes de N en el sistema**

Mediante un estudio realizado bajo el proyecto PAPIIT IN215206-3: “Nitrógeno en el Golfo de California y ecosistemas asociados: estudios de las fuentes, rutas y consecuencias ambientales”, se identificaron y caracterizaron química e isotópicamente las fuentes de N más importantes que descargan en ecosistemas representativos del Golfo de California (Cruz-López, en proceso), entre los cuales se incluyó a la sub-cuenca de Mazatlán y en particular al sistema lagunar Urías (Figura 3). De acuerdo a este estudio, las principales fuentes de N que llegan a diferentes ecosistemas del Golfo, incluyendo al sistema de Urías, son la atmosférica, desechos domésticos (urbana), agrícola, acuícola, y en el caso de Urías se agregan las derivadas de la industria del procesamiento de productos pesqueros. En general, estas fuentes son comunes en otros ambientes costeros del mundo como lo muestran los datos obtenidos de un grande número de reportes publicados.

La Tabla 1 presenta las señales isotópicas de las fuentes identificadas para la sub-cuenca de Mazatlán. Con base en el análisis de muestras de agua de lluvia, la fuente atmosférica, constituida por una mezcla de NO<sub>y</sub> y NH<sub>x</sub> y compuestos derivados, presentó dos señales muy contrastantes según su forma química. Para el δ<sup>15</sup>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> la señal promedió 11.8±4.3‰ y para el δ<sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> -13.8±3.9‰.

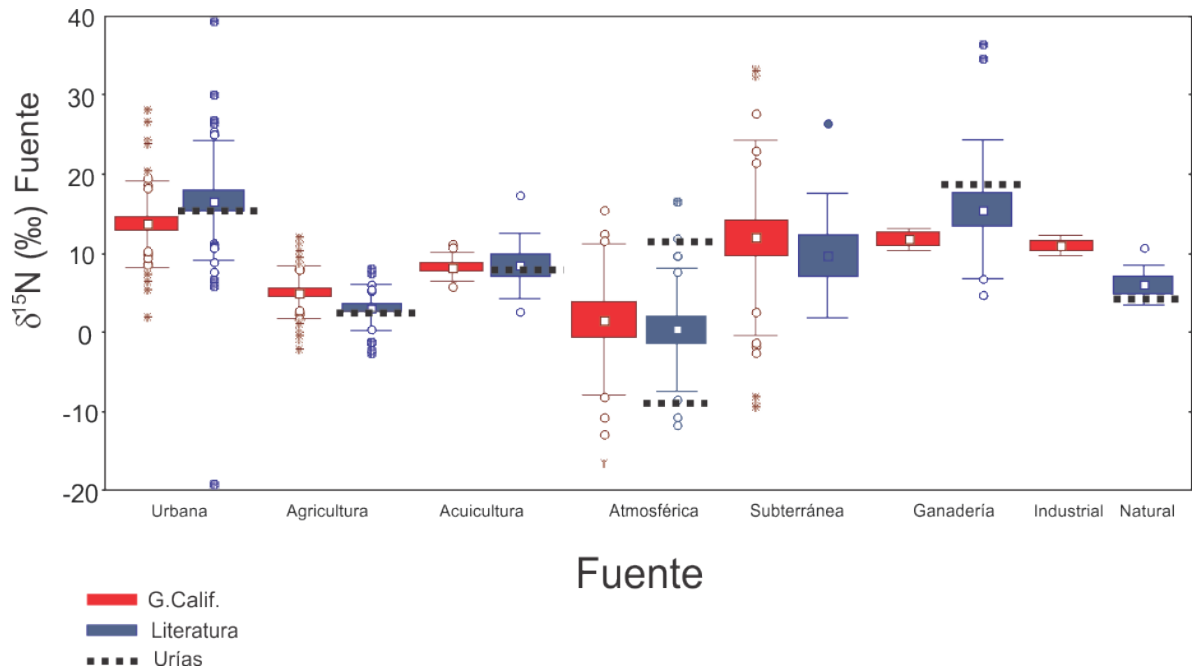


Figura 3. Valores de las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de las fuentes de aportes de nitrógeno al Golfo de California, incluyendo las fuentes medidas en el sistema Urías, y comparación con resultados publicados en otros sitios del mundo.

Tabla 1. Composición isotópica de las fuentes de N, identificadas en el sistema Urías.

Variables	Agricultura (n=6)	Efluentes urbanos (n=3)	Acuicultura (n=6)	N de origen atmosférico (n=6)	Procesamiento productos pesqueros n=3	Agua marina n=3
$\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$	—	16.1±0.3	8.0±1.0	11.8±4.3	19.1±0.68	
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$	2.1±0.7	—	—	-13.8±3.9		3.7±1.8

Las señales de los desechos domésticos presentaron diferencias entre agua residual cruda (<10 ‰) y tratada (>15 ‰) e incluso hasta en el tipo de tratamiento seguido. En este estudio el valor promedio fue de 16.1 ‰ con una predominancia de PON, DON y amonio. Los efluentes de actividades del procesamiento pesquero, específicamente del enlatado de atún y producción de harina de pescado, tuvieron una caracterización química e isotópica



muy similar al de las aguas residuales domésticas tratadas (alto en DON y amonio) y con señal promedio de 19.1 ‰.

Los desechos acuícolas en fuentes que descargan al Golfo de California variaron en un rango más estrecho, desde 7 a 12 ‰. Asimismo la variabilidad de los efluentes derivados de la agricultura osciló entre -2 a +12 ‰. Sin embargo, se observó que la señal derivada de los lixiviados de la microcuenca de Urías (28 km<sup>2</sup>) varió en un rango más estrecho de 1.4 a 2.8‰ dependiendo de los terrenos que fueron lavados. Muestras de aguas subterráneas recolectadas cercanas a las áreas costeras del Golfo de California presentan un amplio rango de variación, desde -10 hasta 35 ‰. La enorme variación se debe principalmente al origen del N y a la intensidad con la que se realiza el proceso de desnitrificación en los acuíferos.

La presencia de <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la depositación atmosférica sugiere dos fuentes distintas. El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se deriva principalmente por emisiones de NH<sub>3</sub> de los campos agrícolas, de la crianza de ganado, y de la descomposición de materia orgánica. El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> resulta de la emisión de gases NxO y de la quema de combustibles fósiles por el funcionamiento de una planta termoeléctrica en el sitio, por el consumo de gasolinas y diesel por vehículos, y de emisiones diversas de otras actividades de transformación. Las muestras de agua de lluvia colectadas en diferentes regiones del Golfo de California y de otras regiones del mundo muestran también un amplio intervalo de variación entre las señales isotópicas del N atmosférico.

En este estudio no se cuantificó el N descargado al sistema Urías vía aguas subterráneas, y no se colectaron muestras cercanas a la descarga del acuífero en la zona costera. No obstante, se considera que la fuente principal al acuífero es el N atmosférico, y en menor

proporción la agricultura practicada en la sub-cuenca de Mazatlán y los desechos domésticos de sistemas de letrinas en asentamientos suburbanos y rurales. Sin embargo, para fines de discutir la importancia de esta fuente utilizamos los resultados encontrados en la zona de descarga del acuífero del río Culiacán al sistema Altata Ensenada del Pabellón. Los valores variaron en el rango de +6.5 a +33.0 %.

## 6.2. Caracterización física, química e isotópica del agua

### 6.2.1. Caracterización física y química

#### 6.2.1.1. Temperatura, salinidad, precipitación y evaporación

La temperatura promedio del sistema registró valores mínimos de  $24.3 \pm 1.8$  °C en febrero de 2010 y máximos de  $33.2 \pm 1.1$  °C en julio de 2009 (Figura 4). Valores inferiores a estos promedios se registraron en el hábitat lagunar con  $21.5 \pm 1.3$  °C en febrero 2010, mientras que en el lagunar-marino se registraron valores superiores al máximo ( $33.7 \pm 0.57$  °C) en julio de 2009.

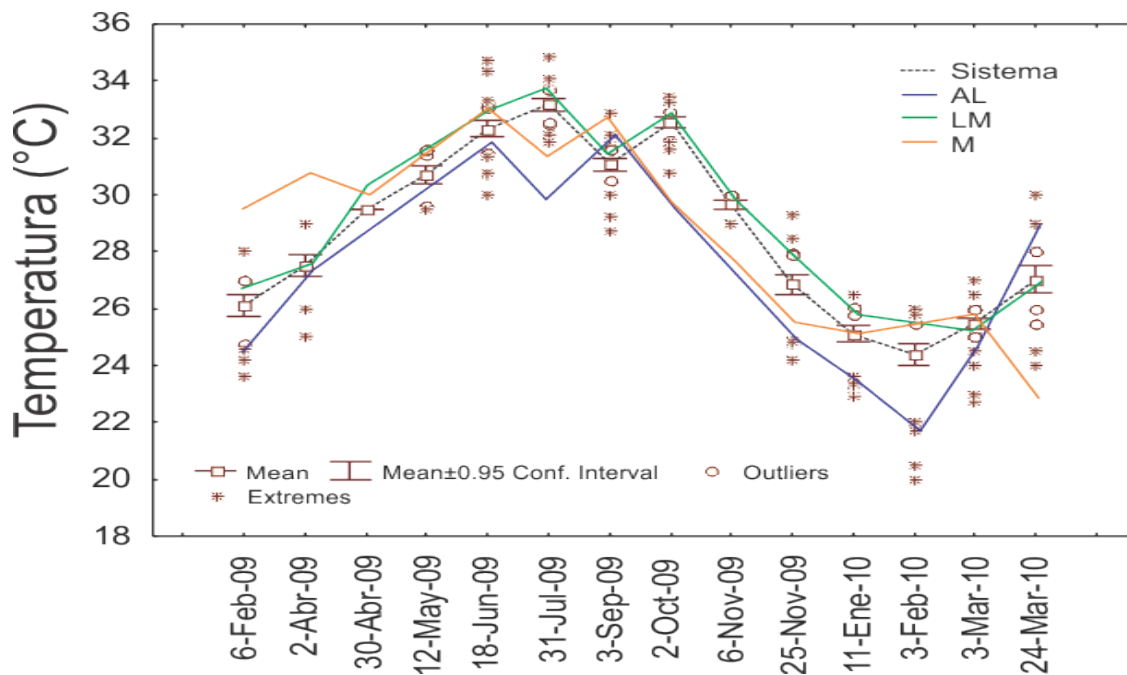


Figura 4. Variación mensual de la temperatura en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

La salinidad en el sistema registró mínimos de  $31.7 \pm 1.9$  ups en febrero 2010 y máximos de  $37.9 \pm 1.2$  ups en julio 2009 (Figura 5). Se registraron valores inferiores al promedio general con  $21.6 \pm 1.9$  ups en febrero 2010 y un máximo de 41 ups en marzo 2010, ambos en el hábitat lagunar.

Se utilizó el modelo propuesto por Montaño-Ley et al. (2008) para calcular los tiempos de residencia en las diferentes zonas del sistema. Los tiempos calculados van desde 1 a 3 días en la región marina, 7 a 10 días en la zona de transición lagunar marina, y 30 a 60 días en la parte más alejada de los canales de marea en la cabeza lagunar.

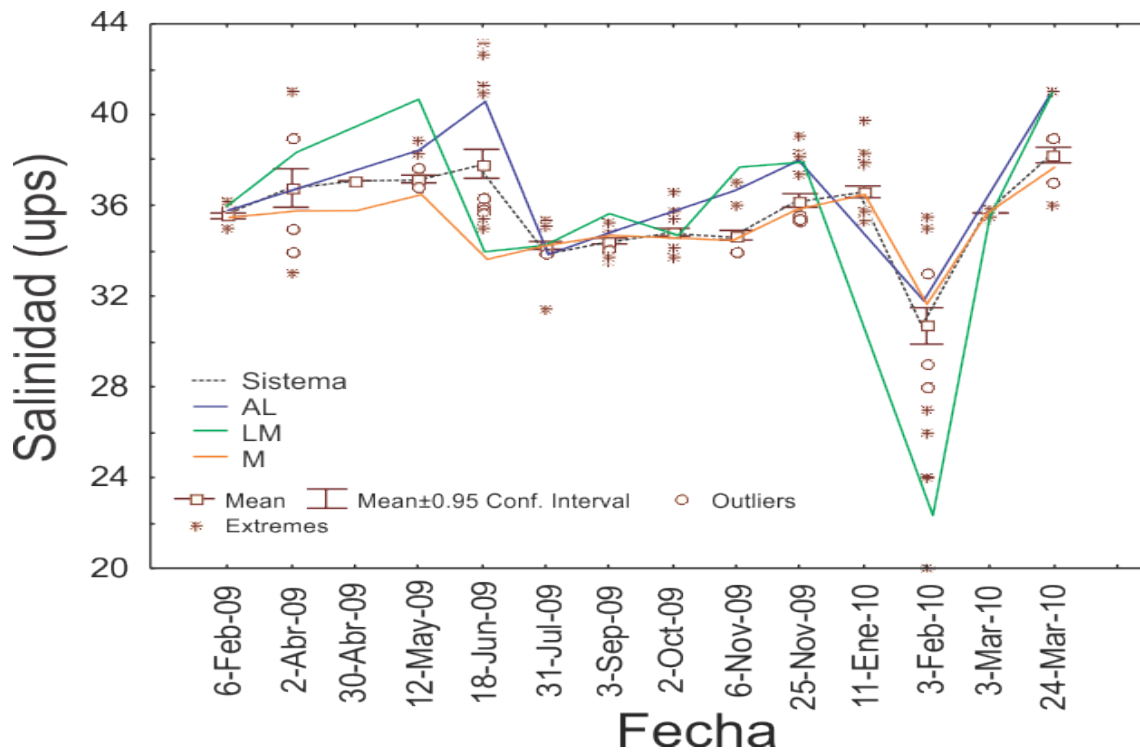


Figura 5. Variación mensual de la salinidad en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

Probablemente por efecto de las aguas sobrecalentadas que descarga en el hábitat lagunar-marino la planta termoeléctrica que se ubica en este ambiente, la temperatura media en el periodo de muestreo fue significativamente ( $p < 0.001$ ) mayor de la registrada en los hábitats lagunar y marino (Anexo 3), mientras que la salinidad registrada en el hábitat lagunar fue significativamente mayor a la del lagunar-marino ( $p < 0.001$ ).

El mínimo de temperatura fue en secas frías (Anexo 3), con  $25.9 \pm 1.2$  °C y el máximo en lluvias con  $31.7 \pm 1.4$  °C. Contrariamente, los valores de salinidad fueron menores en lluvias con  $34.4 \pm 0.63$  ups, pero estos resultaron mayores en secas cálidas con  $36.7 \pm 2.34$  ups. Los valores de temperatura registrados en secas frías fueron significativamente menores ( $p < 0.001$ ) a los de secas cálidas y lluvias. En cambio, los valores medios de salinidad resultaron diferentes en todos los casos ( $p < 0.001$ ). El valor mínimo de precipitación en el área de Mazatlán fue de 0.3 mm en marzo 2010 y el máximo de 204.4 mm en septiembre 2009. La evaporación mínima se registró en el mes de febrero 2009 con 78.4 mm, y la máxima en agosto 2009 con 195.3 mm (Anexo 4).

Las variaciones de temperatura y salinidad registradas en este estudio coinciden con las observadas por Ochoa-Izaguirre (1999) y Del Río-Chuljak (2004) para este sistema lagunar y corresponden con los cambios estacionales que se esperan en aguas tropicales y subtropicales (De la Lanza, 1994), con altas temperaturas en verano y mínimas en invierno, y altos valores de salinidad en época de secas cálidas y bajos en lluvias.

Las notables diferencias de temperatura y salinidad entre sitios de muestreo localizados parecen responder a condiciones locales que presenta el sistema (variabilidad de la profundidad, influencia de mareas, corrientes, tiempos de residencia, zonas cubiertas por manglar y la influencia de la planta termoeléctrica). Ochoa-Izaguirre (1999) registró un

gradiente positivo de temperatura hacia los sitios cercanos a la planta termoeléctrica durante las tres épocas climáticas. En otros estudios, Álvarez-León, (1977), Cortés-Altamirano, (1982, 1984) y Villalba-Loera, (1986) registraron un gradiente positivo de temperatura hacia la cabecera del sistema en época de secas cálidas. En esos estudios, el comportamiento de la salinidad fue similar al registrado por Quiñónez-Gallardo (2008) con salinidades más altas hacia la parte lagunar. Páez-Osuna (2007) señala que la cabecera lagunar se comporta como un antiestuario en la época de estiaje, con valores de salinidad que alcanzan hasta 44 ups. En este estudio la salinidad promedio en la cabecera fue de 41.1 ups. Contrariamente, Ochoa-Izaguirre (1999), también registró las salinidades más altas en esta época pero en sitios cercanos a la planta termoeléctrica, que atribuyó a una alta evaporación y al consiguiente aumento de salinidad.

#### **6.2.1.2. Oxígeno disuelto y pH**

El valor promedio mínimo de oxígeno disuelto fue de  $2.49 \pm 0.35 \text{ mg L}^{-1}$  en junio 2009 y el máximo de  $10.31 \pm 0.43 \text{ mg L}^{-1}$ , ambos en el hábitat lagunar (Figura 6). De acuerdo a las épocas climáticas la concentración promedio mayor se registró en secas frías ( $7.25 \pm 1.73 \text{ mg L}^{-1}$ ), en las épocas de secas cálidas y lluvias los valores fueron similares ( $5.27 \pm 2.29$  y  $5.46 \pm 1.55 \text{ mg L}^{-1}$ ) respectivamente. Sin embargo en sitios cercanos al estero del Infiernillo (hábitat lagunar-marino) se registraron valores de  $0.77 \text{ mg L}^{-1}$  en el mes de septiembre 2009.

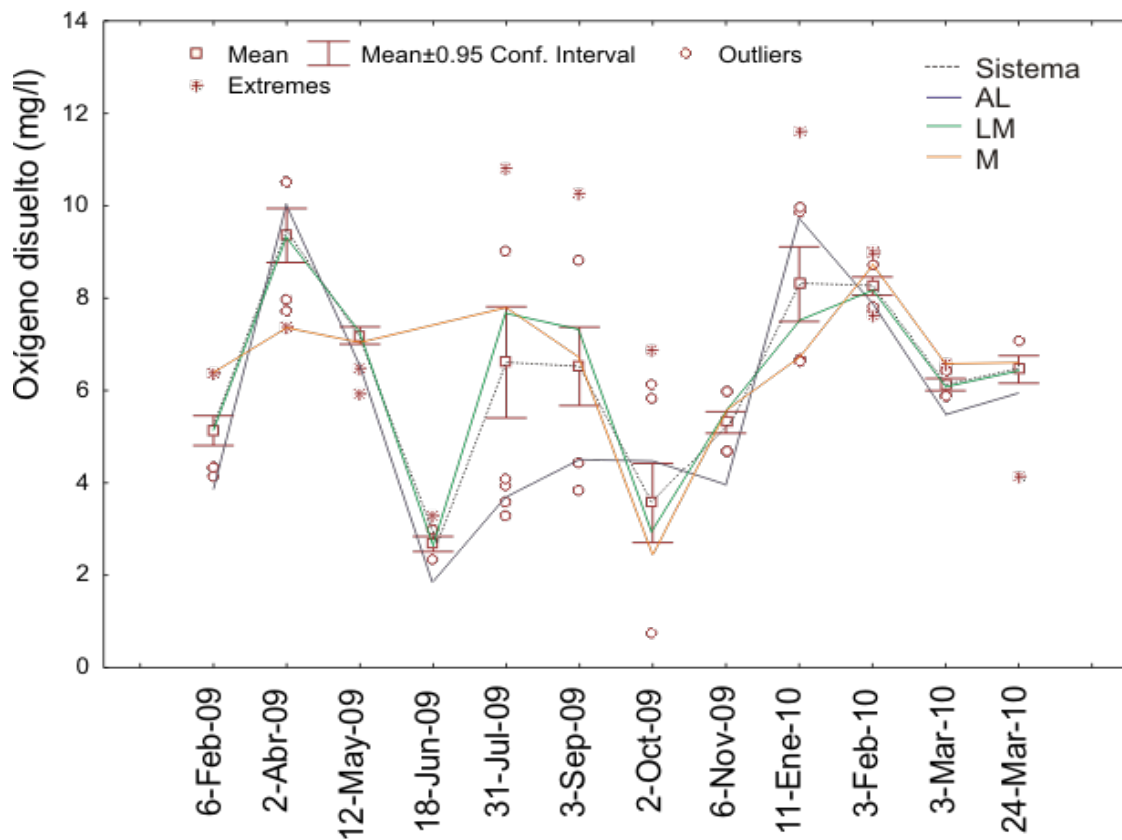


Figura 6. Variación mensual del oxígeno disuelto en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

El pH registró el valor promedio más bajo en febrero 2009 con  $7.43 \pm 0.07$  en el habitat lagunar y el mayor en mayo con  $8.25 \pm 0.06$  en el hábitat marino (Figura 7). En la época de secas cálidas se registró el valor promedio más alto ( $8.06 \pm 0.14$ ) y el menor en secas frías ( $7.78 \pm 0.22$ ).

El oxígeno disuelto es un indicador de la calidad del agua de un ecosistema y de su funcionamiento, sin embargo, la exposición de la biota a concentraciones menores de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  resulta en alteraciones del comportamiento y reducción del crecimiento (Piñón-

Gimate, 2008). En el sistema Urías a pesar de que los valores promedio por hábitat y época estuvieron por encima de los  $5.0 \text{ mg.L}^{-1}$  en algunos sitios donde se registraron blooms de macroalgas (E8,E9,E10), durante el mes de junio se registraron valores menores a  $3 \text{ mg L}^{-1}$  los cuales se relacionan con la descomposición de las biomásas macroalgales.

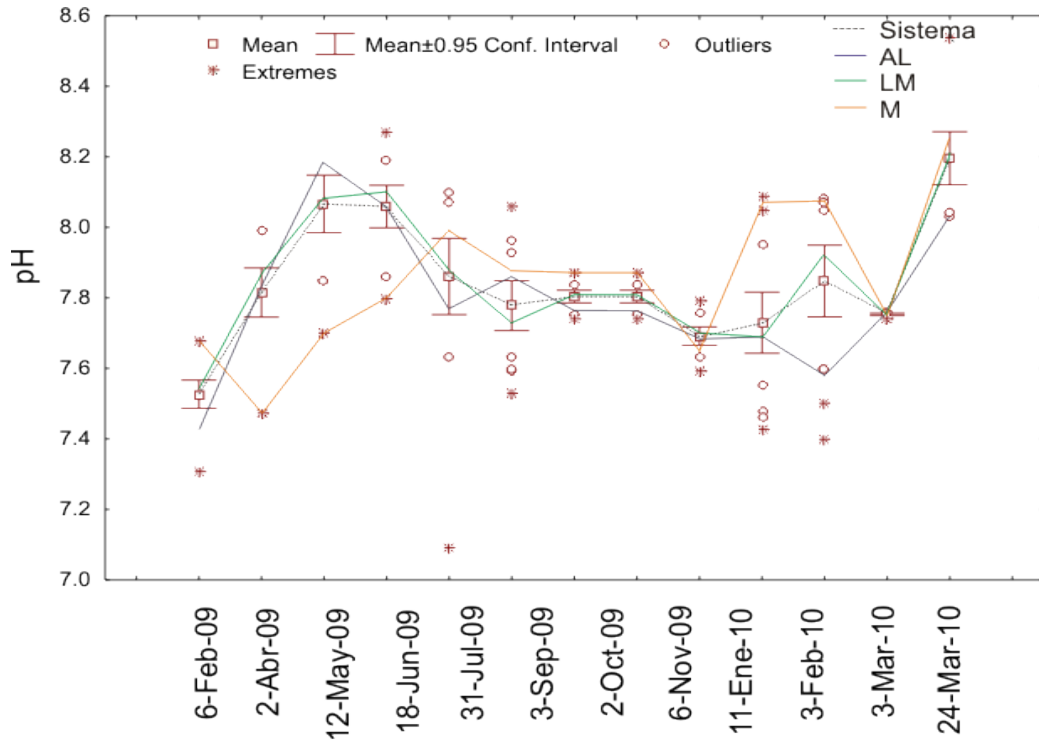


Figura 7. Variación mensual del pH en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

### 6.2.1.3. Nitrógeno y sus especies químicas

#### 6.2.1.3.1. Amonio

Las concentraciones promedio de amonio oscilaron entre  $19.5 \pm 17.1 \mu\text{g L}^{-1}$  en marzo 2010 a máximos de  $125.8 \pm 51.4 \mu\text{g L}^{-1}$  en el mes de julio 2009 (Figura 8). Sin embargo, en el sitio E9 se midieron valores más elevados ( $\geq 1,180 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de amonio en el agua adyacente

a la planta harinera (E9). Estas concentraciones estuvieron muy por encima de los registrados en el resto del sistema. Otro sitio (E3) ubicado en la entrada a un estero tributario que recibe descargas de una granja camaronera y desechos domésticos de la Isla de la Piedra (~ 5,000 habitantes), registró valores máximos de  $354.2 \mu\text{g L}^{-1}$  en el mes de agosto 2009. En contraste, los sitios ubicados en la boca del sistema registraron concentraciones promedio de  $26.0 \pm 26.8 \mu\text{g L}^{-1}$ .

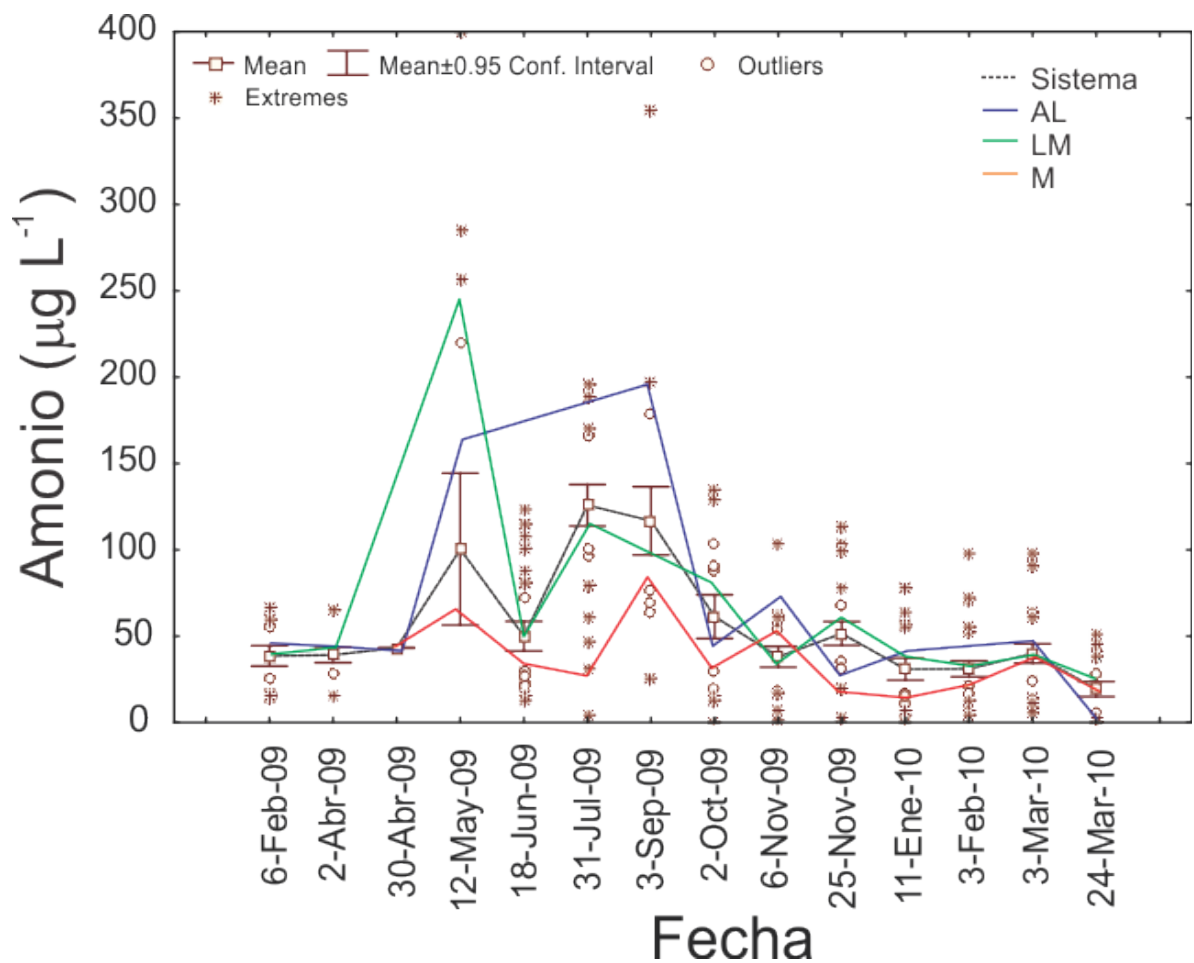


Figura 8. Variación mensual de amonio en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).



Se compararon las concentraciones de amonio obtenidas en los tres hábitats (Anexo 3) y se observó que los valores más bajos se obtuvieron en el hábitat marino con  $42.9 \pm 52.7 \mu\text{g L}^{-1}$  en tanto que los mayores fueron para el hábitat lagunar con  $64.9 \pm 63.1 \mu\text{g L}^{-1}$ . El análisis estadístico mostró que en el valor medio obtenido en el hábitat marino fue significativamente menor al registrado en los hábitats lagunar y lagunar-marino ( $P < 0.001$ ). En secas frías el valor promedio ( $39.2 \pm 24.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) resultó ser menor al resto de las épocas. El análisis estadístico mostró que los valores promedio obtenidos en las tres épocas climáticas fueron significativamente diferentes entre ellos. ( $P < 0.001$ ).

#### **6.2.1.3.2. Nitrato + Nitrito**

La concentración de nitratos + nitritos (Figura 9) promedió desde  $19.5 \pm 8.3 \mu\text{g L}^{-1}$  en marzo de 2010 hasta un máximo de  $177.9 \pm 90.9 \mu\text{g L}^{-1}$  en enero de 2010. En el hábitat lagunar-marino se registraron los máximos valores en noviembre de 2009 con  $199.9 \pm 75.0 \mu\text{g L}^{-1}$  y los mínimos en el hábitat marino en marzo de 2010 con  $6.2 \pm 1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ . La concentración promedio del hábitat marino fue significativamente menor al resto de los hábitats ( $P = 0.005$ ) (Anexo 3).

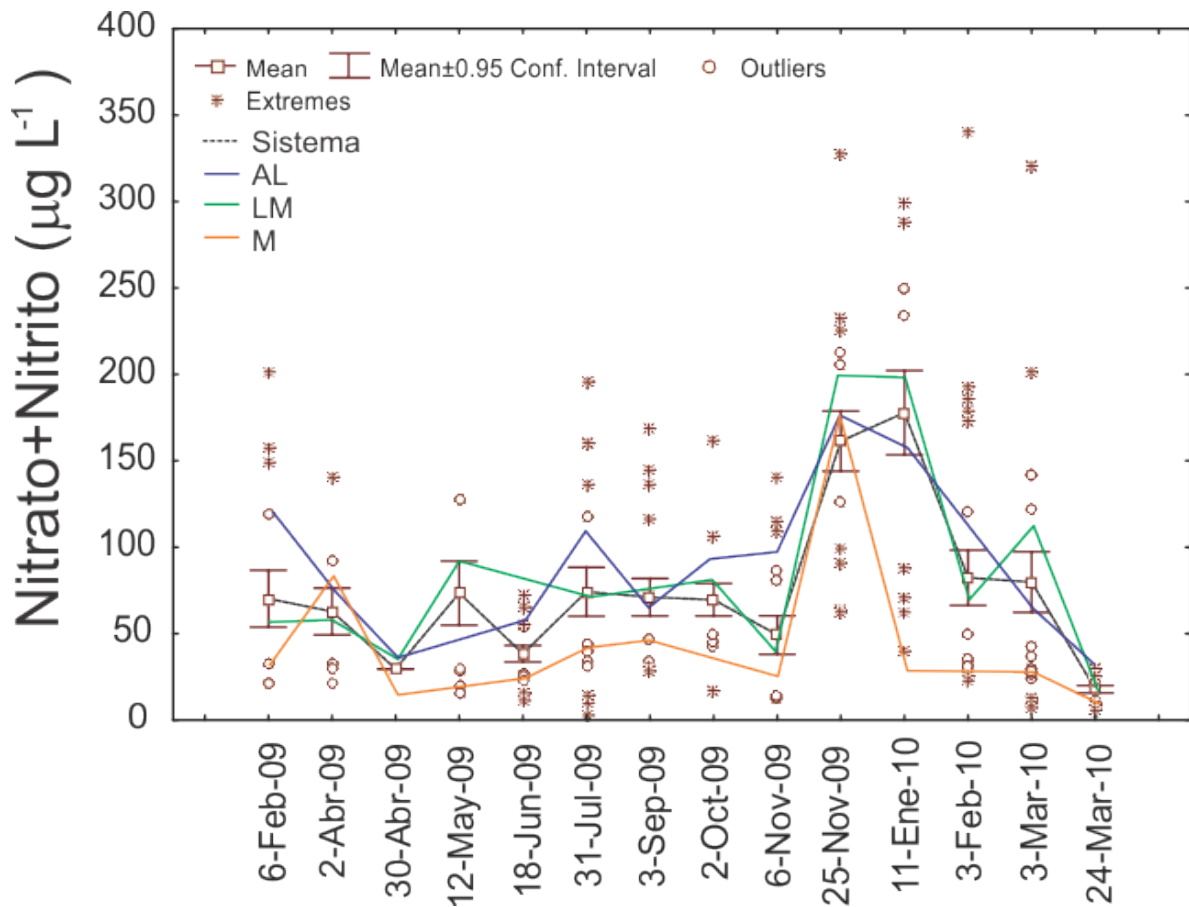


Figura 9. Variación mensual de nitrato + nitrito en el sistema Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

Las concentraciones de nitrato más altas fueron registradas en los sitios de la parte media (E6 a E9) aledaños a la planta termoeléctrica. En esta área se reciben las mayores descargas de aguas residuales provenientes del procesamiento de productos pesqueros (planta harinera) y los derivados de la quema de combustibles fósiles. La excepción fue el sitio E1 que registró una amplia variabilidad ( $109.2 \pm 119.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ), debido a que en el mes de diciembre obtuvo el más alto valor de nitrato registrado en el sistema ( $459.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), lo cual pudo estar relacionado con las actividades de una granja camaronícola (San Jorge) que descarga sus efluentes en un área cercana a esta estación.

La época de secas frías mostró una alta variabilidad, con concentraciones promedio de  $105.0 \pm 89.1 \mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que en secas cálidas y lluvias los valores promedio fueron  $36.7 \pm 18.3$  y  $71.9 \pm 44.2$ , respectivamente (Anexo 3). El valor medio de la época de secas cálidas fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ) al resto de las épocas.

#### **6.2.1.3.3. Nitrógeno disuelto total (NDT)**

El NDT también presentó una amplia variabilidad. Considerando todo el sistema el valor máximo se registró en el mes de septiembre 2009 con  $2,261.3 \pm 984.0 \mu\text{g L}^{-1}$  y el más bajo en el mes de marzo 2010 ( $251.0 \pm 101.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figura 10). Los sitios con mayor variabilidad fueron los ubicados en la parte media del sistema (E8, E11, E12 y E13). El máximo valor promedio se registró en el hábitat lagunar-marino con  $2,835.7 \pm 1,230.5$  y el mínimo en el marino con  $141.3 \pm 48.4 \mu\text{g L}^{-1}$ , que resultó significativamente menor y donde también se registró la mayor variabilidad ( $586.5 \pm 611.39 \mu\text{g L}^{-1}$ ), aunque también se observó una alta variabilidad en las estaciones del hábitat lagunar-marino donde se obtuvieron los valores más altos ( $769.6 \pm 791.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Anexo 3).

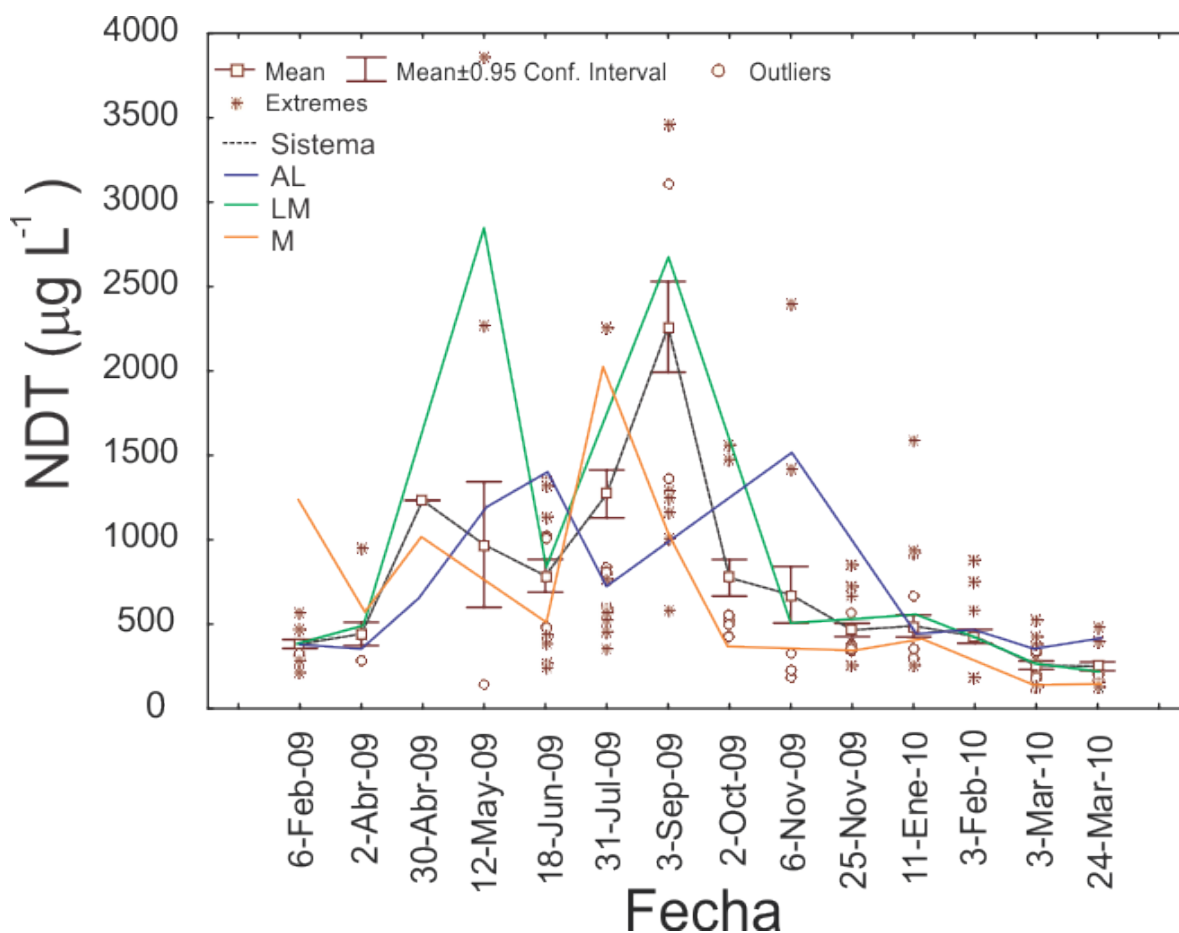


Figura 10. Variación mensual de nitrógeno disuelto total (NDT) en Urías, global y por hábitats: lagunar (AL), lagunar-marino (LM) y marino (M).

El máximo valor se obtuvo en secas cálidas ( $1,133.3 \pm 811.7 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y el mínimo en secas frías ( $396.8 \pm 205.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La comparación estadística indicó que el valor medio del periodo de secas frías fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ).

#### 6.2.1.3.4. Nitrógeno orgánico disuelto (NOD)

El nitrógeno orgánico disuelto representó el mayor porcentaje (~80%) del nitrógeno disuelto total medido en el sistema (Figura 11), probablemente debido a los aportes de materia orgánica de las diversas actividades (principalmente del procesamiento de

productos pesqueros y de actividades acuícolas) que se desarrollan a su alrededor. El valor promedio máximo se obtuvo en el mes de septiembre de 2009 con  $2,073.35 \pm 998.9 \mu\text{g L}^{-1}$ , más de un orden de magnitud superior al valor del nitrógeno inorgánico disuelto determinado ese mes, que fue de  $187.9 \pm 101.0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

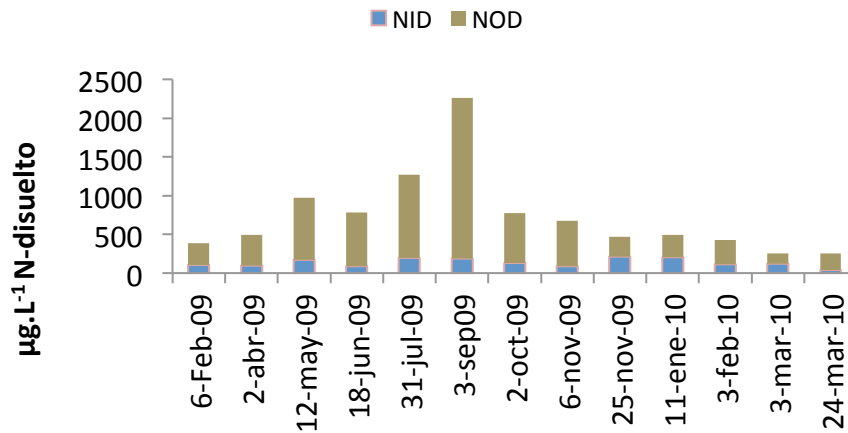


Figura 11. Variación mensual de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y orgánico disuelto (NOD) en el sistema Urías.

Las formas químicas dominantes del nitrógeno inorgánico en aguas marinas costeras son el amonio, nitrito y nitrato y su variación natural depende de los procesos biogeoquímicos ocurriendo en el sistema (Ochoa-Izaguirre y Soto-Jiménez, 2013). Las altas concentraciones de amonio registradas en el mes de mayo de  $244.6 \pm 171.6 \mu\text{g L}^{-1}$  (hasta  $1,180 \mu\text{g L}^{-1}$  en el agua adyacente a la planta harinera), y de nitrato + nitrito en el mes de noviembre ( $199.9 \pm 75.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), en sitios ubicados en el hábitat lagunar-marino (como E8 y E10), se asocian con la descarga de efluentes del procesamiento de productos pesqueros que se desarrollan en esa zona. Estas descargas han sido señaladas como responsables de florecimientos macroalgales a su alrededor, cuya descomposición se presenta en el mes de

abril-mayo para las especies de *Ulva* y en octubre-noviembre para *Gracilaria vermiculophylla* (Ochoa-Izaguirre, 1999).

De acuerdo a Contreras et al. (1996), el intervalo promedio de amonio en lagunas costeras es de 5 a 10  $\mu\text{g-at L}^{-1}$  y para nitritos + nitratos es de  $<0.01$  a 5.0  $\mu\text{g at L}^{-1}$ . Estos valores son entre 1-2 órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en este estudio que revela que el ciclo del nitrógeno dentro del sistema ha sido alterado. De acuerdo a la escala propuesta por Ignatiades et al. (1992), las aguas eutróficas contienen 1.68  $\mu\text{g-at N L}^{-1}$  de NID, por lo que el sistema Urías queda por encima de estos valores, considerándose como un sistema eutrofizado.

Por otro lado las bajas concentraciones de ambas formas químicas en la boca del sistema en las tres épocas climáticas se relacionan con la entrada de agua marina con bajas concentraciones del nutriente. Asimismo, las diferencias en los valores medidos de NDT sugieren que existen variaciones de las descargas al sistema a lo largo del año, las cuales dependen de varios y diferentes factores, como el lixiviado de los suelos en la época de lluvias, las épocas de cosecha en las granjas, y la intensidad del procesamiento de algunos productos marinos que depende de las capturas a lo largo del año y las variaciones de la densidad de población de la zona turística de la ciudad de Mazatlán.

## **6.2.2. Caracterización isotópica del N disponible en el sistema**

### **6.2.2.1. Modelación de la variación isotópica del N disponible**

El N adicionado por las múltiples fuentes al sistema experimenta mezclas y una serie de transformaciones biogeoquímicas que alteran su concentración, sus formas químicas y hasta su composición isotópica. La determinación de la fraccionación del N en la columna

de agua no es problema menor y aunque sale del objetivo de esta investigación, se intentó estimarla y modelar la variación espacio temporal de las señales isotópicas en la columna de agua de Urías.

En una primera aproximación se utilizó un modelo de intercambio físico (de mezcla simple; Phillips y Gregg, 2003) y después uno acoplado con los procesos más conocidos de transformaciones biogeoquímicas que ocurren en la columna de agua y en los sedimentos (Moore y Semmens 2008). Entre los procesos considerados está la descomposición de materia orgánica con su consecuente producción de amonio, la volatilización de amonio, la asimilación de N, la nitrificación y la desnitrificación. Estos modelos permiten simular numéricamente la variación isotópica del NID en el agua.

La fraccionación isotópica del N es frecuente en la naturaleza, y se produce por la diferencia en las velocidades de reacción entre los isótopos  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$  que se define como factor de fraccionamiento isotópico ( $\alpha$ ). Debido a que las proporciones de los isótopos más ligeros se transforman a mayor velocidad que los pesados, el factor de fraccionación isotópica es por lo general superior a 1. En los procesos de intercambio físico no hay fraccionación, simplemente la señal se mueve entre los valores de las fuentes mezcladas (Phillips y Gregg, 2003). Sin embargo, en la mayoría de los procesos biogeoquímicos ocurre una fraccionación, y el efecto isotópico ( $\epsilon = (\alpha - 1) \times 1000$ ) por lo general varía de 0 a 35‰, dependiendo de las especies de nitrógeno involucradas y de las transformaciones (Kendall, 1998). A continuación se mencionan los valores de los efectos isotópicos de los procesos considerados en el modelo usado en este trabajo. Para la desnitrificación normalmente en el intervalo de 25 a 30‰ ( $\alpha=1.028$ ) (Sigman et al., 2001; Swart et al., 2008), en la primera reacción de la nitrificación (amonio a nitrito por las bacterias del

género *Nitrosomonas*) y la volatilización de amonio se tiene un efecto de 20‰ ( $\alpha=1.02$ ) (Swart et al. 2008), y la asimilación ya sea de amonio o nitratos del 2 a 4‰ ( $\alpha=1.002-1.004$ ) (Swart et al. 2008). La amonificación no tiene ningún efecto ( $\alpha=1.000$ ) (Swart et al., 2008). La fijación biológica de N y la oxidación anaeróbica del amonio (anammox) no fueron incorporadas al modelo, aunque se reconoce que ocurren (Lan Hu et al., 2011). Sin embargo, la fijación biológica no tiene efecto ( $\alpha =1.000$ ) mientras que anammox se espera que tenga un efecto sobre la fraccionación isotópica, pero no se disponen de datos.

Entre los parámetros utilizados para alimentar al modelo se consideraron datos de salinidad, temperatura, precipitación, tiempo estimado de residencia, concentración de amonio y nitrato y de sus señales isotópicas de acuerdo a las fuentes que inciden en cada sitio al momento del muestreo. Aunque el NOP, y su producto inicial el NOD, son la principal fuente de nitrógeno para la columna de agua estos no se incluyeron como parámetros al modelo. La razón es que a diferencia de las especies del NID, el NOP es una fracción del N que no forma parte del N disponible para los productores primarios, sino que está sujeta a ser depositado en los sedimentos y a través de una serie de procesos de descomposición dar lugar al NOD y su posteriores productos amonio, nitrito y nitrato. Por otro lado, se asumió que el consumo del NOD por parte de los productores primarios es despreciable, considerando las elevadas concentraciones de las formas químicas inorgánicas disponibles en la columna de agua.

El modelo fue aplicado considerando condiciones de estado estable, por ser más sencillo. Sin embargo, se reconoce que las fuentes de N y los procesos pueden variar en tipo e intensidad según la localidad y época climática. Por ejemplo, durante la época de secas frías las condiciones ambientales y de concentración de nutrientes del sistema son más



estables, sin fuentes extraordinarias de N y con procesos biogeoquímicos tales como la descomposición y desnitrificación son menores. Por otro lado, la época de lluvias fue la más representativa de la llegada de fuentes extraordinarias de N derivado del lavado de tierras y de las aguas de lluvias de las áreas urbanas y suburbanas. En esta temporada ocurre el lavado de la subcuenca de Urías que arrastra N de fertilizantes de las tierras agrícolas, de materia orgánica, y el acumulado por el depósito atmosférico seco que ocurre durante el año. Además, si bien las descargas de aguas residuales sin tratar, tratadas y descargas clandestinas ocurren durante todo el año, es en la época de lluvias cuando se da un mayor aporte con las aguas fluviales de las zonas urbanas. En tanto que en la época de secas cálidas se tiene un incremento en la descomposición de la materia orgánica autóctona y alóctona dentro del sistema.

#### **6.2.2.2. Observaciones de campo y validación del modelo**

Para la validación del modelo y su capacidad de reproducir datos confiables de la señal isotópica en la columna de agua, se realizaron determinaciones de campo y se comparó con datos reportados en la literatura.

Los datos de  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  revelan un aumento en la señal en las zonas, con probables eventos de anoxia. Por ejemplo, las muestras recolectadas en los sitios más remotos de la cabecera lagunar presentaron  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  mínimos de 2‰, asociados con el lavado de terrenos agrícolas durante las lluvias hasta máximos de 12.9-14‰. Estos cambios se observaron varias semanas y hasta 1-2 meses después de recibidos los aportes de los efluentes agrícolas. Las condiciones de aislamiento de las mareas y la disminución de oxígeno

resultan en procesos de desnitrificación con un efecto sobre la fraccionación de hasta 12 ‰ ( $\alpha=1.012$ ).

Por otro lado en la parte central de la laguna, donde los sitios muestreados presentan aguas someras (10 cm a <1 m), baja velocidad de flujo y extensas zonas de estancamiento, se produce el depósito de materia orgánica proveniente de diferentes fuentes de N (naturales y antropogénicas). En estas áreas las concentraciones de amonio fueron muy elevadas, pero también se observaron los máximos de  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ . La alta producción de amonio aunado al calentamiento de las aguas que se produce durante el día, y en especial en los meses de verano (con máximos de hasta 40 °C), propicia una mayor volatilización de esta forma química de N resultando en un incremento de la señal. La materia orgánica depositada en estas áreas tiene valores máximos de 7.2‰ (Quiñónez-Gallardo, 2008), por lo que el NOD y el correspondiente amonio tendrían señales comparables. Sin embargo, en nuestros análisis isotópicos encontramos máximos de hasta 18.3-21.5‰, una diferencia de hasta 13‰ ( $\alpha=1.013$ ).

Respecto a la fraccionación por asimilación de amonio y nitrato, no fue posible evaluarla directamente en el área. Sin embargo, mediante estudios experimentales que son descritos en capítulos subsecuentes, encontramos factores de enriquecimiento de 1.1 a 2.7‰ ( $\alpha=1.001-1.003$ ), sin diferencias entre especies químicas.

Tampoco es sencilla la determinación del fraccionamiento isotópico durante la nitrificación en el medio natural, debido a las mezclas de estas formas oxidadas de diferentes fuentes con el proceso de nitrificación. Sin embargo, se hizo una estimación en aquellos sitios donde se encontraron altas concentraciones de amonio y presencia de nitritos y nitratos, pero sin ninguna fuente directa de las formas oxidadas. Esto incluye los sitios 3-5, cercanos

a la cabecera, en épocas de secas. Por tanto se asume que fueron producidos por nitrificación. En estos sitios el  $\delta^{15}\text{N-NID}$  final (12.8‰) tuvo valores significativamente más bajos al  $\delta^{15}\text{N-alga}$  ( $14.6 \pm 1.4\%$ ), lo que sugiere que el N disponible se enriquece en cerca de 2‰. Aunque esto resulta en un efecto mucho menor al esperado ( $\alpha=1.002$  vs 1.02). Se espera que en estas aguas con tasas de oxidación de amonio elevadas, la señal isotópica del nitrato producido tienda a incrementarse a medida que la reserva de amonio se consume. Sin embargo, al no tratarse de un sistema cerrado ni con condiciones de estado estable, las concentraciones de amonio no se agotan por completo y además debido a la mezcla con N más ligero, no se alcanzan los máximos efectos de la fraccionación. Una mejor medición sería en experimentos en laboratorio.

En general, los factores de fraccionación estimados para el nitrato por desnitrificación y para el amonio por volatilización se encuentran dentro de los rangos inferiores reportados en la literatura, generalmente basados en experimentos de laboratorio bajo sistemas cerrados. Sin embargo, en un sistema natural es difícil medir la culminación de los procesos mencionados debido a que los flujos son continuos (sistema abierto). No es el propósito de este trabajo, pero se pudiera revisar el progreso de las reacciones usando la ecuación de Rayleigh; por ejemplo, para la desnitrificación se pueden usar los valores del  $\delta^{15}\text{N}$  del nitrato residual para un factor de fraccionamiento de 1.012 a 1.028, el primero es el alcanzado dentro del sistema y el segundo el máximo efecto al agotarse el nitrato.

Por otro lado, se asume que el proceso anammox puede también ocurrir y alterar la concentración y composición isotópica del N en sistemas acuáticos con bajas de oxígeno (Hulth et al., 2005), como en estas secciones del sistema Urías. Sin embargo, no se dispone

de datos publicados acerca de su fraccionación debido a que su determinación es aún muy compleja (Brandes et al., 2007).

De acuerdo con el análisis de varianza realizado, solo las concentraciones de amonio, nitrato + nitrito y NOD, así como las señales isotópicas del amonio y nitratos en el agua resultaron ser parámetros significativos para el modelo (Tabla 2). El modelo matemático para la predicción es  $\delta^{15}\text{N-NID} = 1.529 + 0.394[\delta^{15}\text{N-NH}_4^+] + 0.54[\delta^{15}\text{N-NO}_3^-] + 0.0201[\text{NH}_4^+] - 0.0175[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-] + 3.3 \times 10^{-4}[\text{NOD}, \mu\text{g/l}]$ . Haciendo un análisis de correlación con los datos determinados en el área de estudio y los del modelo encontramos una alta asociación ( $R^2$  de 0.76, error cuadrático medio de predicción 1.49, respuesta media 13.17; N=730) (Figura 12). Es probable que la introducción al modelo de otros parámetros como tiempo de residencia, profundidad, tipo de sustrato, etc., pudieran mejorar aun más el ajuste. Sin embargo, el análisis isotópico de ambas formas químicas en el agua es una tarea muy compleja y costosa de realizar. El aislamiento por difusión y la posterior captura en las trampas de filtros ya sea del amonio o del nitrato consume mucho tiempo y esfuerzo además del costo en el uso de reactivos y posterior análisis isotópico. Así que lo hace poco viable para su implementación. Para resolver este problema, probamos un segundo modelo basado en los mismos parámetros anteriores pero usando los  $\delta^{15}\text{N}$  del amonio y del nitrato de las fuentes identificadas (Figuras 13 y 14). Basado en lo anterior el modelo 2 (Tabla 3) resultante es  $\delta^{15}\text{N-NID} = 4.121 + 0.276[\delta^{15}\text{N-NH}_4^+] + 0.535[\delta^{15}\text{N-NO}_3^-] + 0.0216 [\text{NH}_4^+] - 0.016 [\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-] + 2.9 \times 10^{-4}[\text{NOD}, \mu\text{g/l}]$ . También mostró una buena asociación con los valores de campo, aunque un poco menor a la del modelo 1 ( $R^2$  de 0.71, error cuadrático medio de predicción 1.65, respuesta media 13.17; N=730).

Tabla 2. Parámetros estimados en base a las concentraciones de amonio, nitrato + nitrito y NOD, así como las señales isotópicas del amonio y nitrato en el agua para aplicación del Modelo 1.

<b>Variable</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Std</b>	<b>Valor t</b>	<b>Prob&gt; t </b>
Intercepto	1.5298382	0.380492	4.02	<.0001*
Amonio (µg/l)	0.0201425	0.001169	17.24	<.0001*
Nitrato + Nitrito (µg/l)	-0.017563	0.000787	-22.31	<.0001*
NOD (µg/l)	0.0003293	0.000093	3.54	0.0004*
$\delta^{15}\text{N}$ amonio A	0.3945516	0.019629	20.10	<.0001*
$\delta^{15}\text{N}$ nitrato A	0.5399118	0.013755	39.25	<.0001*

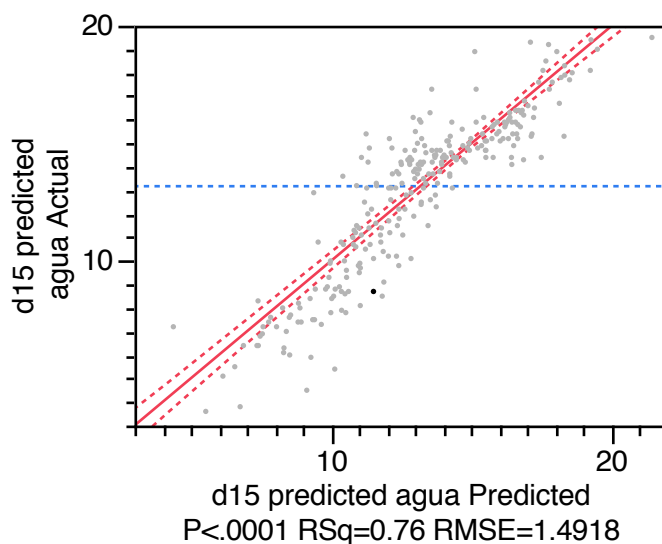


Figura 12. Análisis de correlación entre las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ -NID en el agua estimadas con el modelo 1 y las señales  $\delta^{15}\text{N}$ -NID medidas en el agua del sistema Urías.

Tabla 3. Parámetros estimados en base a las concentraciones de amonio, nitrato + nitrito y NOD, así como las señales isotópicas del amonio y nitrato de las fuentes identificadas para aplicación del Modelo 2.

Variable	Estimado	Error Std	Valor t	Prob> t
Intercepto	4.1206592	0.36009	11.44	<.0001*
Amonio ( $\mu\text{g/l}$ )	0.0216415	0.001301	16.63	<.0001*
Nitrato + Nitrito ( $\mu\text{g/l}$ )	-0.016156	0.000872	-18.53	<.0001*
NOD ( $\mu\text{g/l}$ )	0.0002915	0.000104	2.81	0.0052*
$\delta^{15}\text{N}$ amonio fuente	0.2757623	0.019514	14.13	<.0001*
$\delta^{15}\text{N}$ nitrato fuente	0.5347578	0.015253	35.06	<.0001*

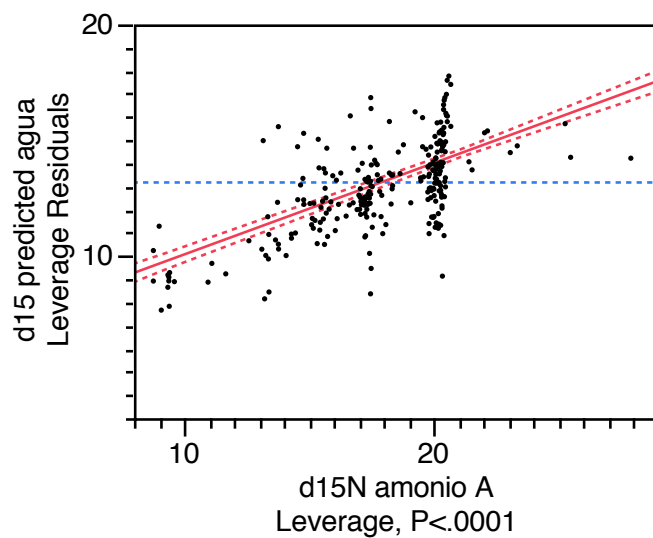


Figura 13. Correlación entre las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ -NID estimadas con el modelo 2 y las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4^+$  medidas en el agua del sistema de Urías.

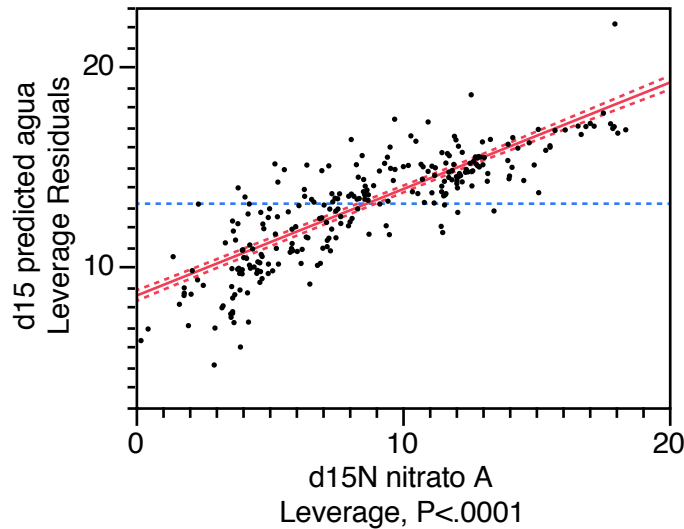


Figura 14. Correlación entre las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ -NID estimadas con el modelo 2 y las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NO}_3^-$  medidas en el agua del sistema de Urías.

Se analizó la asociación entre la variabilidad de la señal isotópica del NID y las composiciones isotópicas y concentraciones de ambas formas químicas inorgánicas (Figuras 15 y 16). Al correlacionar las señales encontradas en ambas formas químicas con la estimada en el agua, se observó que el nitrato ( $r=0.59$ ;  $p<0.05$ ) explica mejor la señal isotópica del NID que el amonio ( $r=0.38$ ;  $p<0.05$ ). Se observó una tendencia significativa a disminuir el valor  $\delta^{15}\text{N}$ -NID en función de la concentración de nitrato + nitrito. En cambio con el amonio se observó una tendencia contraria. El descenso en la señal con el incremento en concentración de nitratos se debe a que las fuentes de aporte de nitratos naturales (marina) y antropogénicas (e.g. agricultura y depósito atmosférico) presentan bajas señales. Las bajas señales del nitrato están relacionadas con el origen del lavado de

suelos que se da en función de la precipitación, por lo que a mayor cantidad de agua lavando terrenos se tendrá una mayor llegada de N con baja señal. Durante la temporada de secas la señal del nitrato se enriquece en la columna de agua. En cambio las fuentes del amonio tienen señales significativamente mayores, por lo que el  $\delta^{15}\text{N-NID}$  se incrementa con el aumento de su concentración. No se encontró ninguna asociación significativa entre  $\delta^{15}\text{N-NID}$  y sus especies con la temperatura, salinidad y otras variables ambientales en el total de los datos.

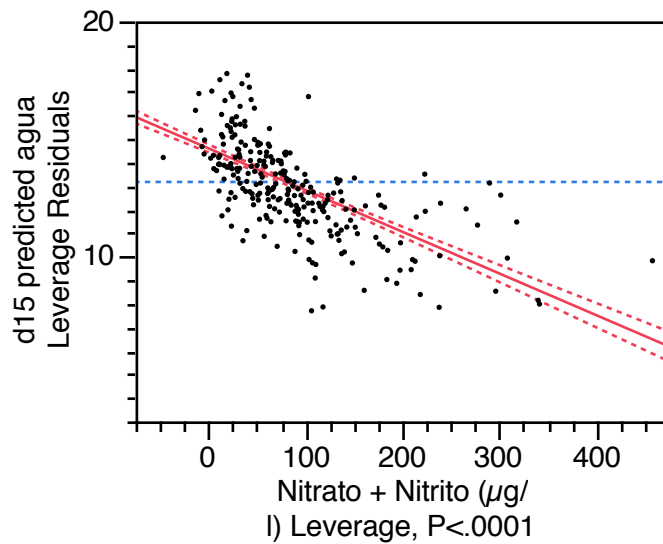


Figura 15. Correlación entre las señales de  $\delta^{15}\text{N-NID}$  y las concentraciones de nitrato + nitrito en el agua del sistema de Urías.



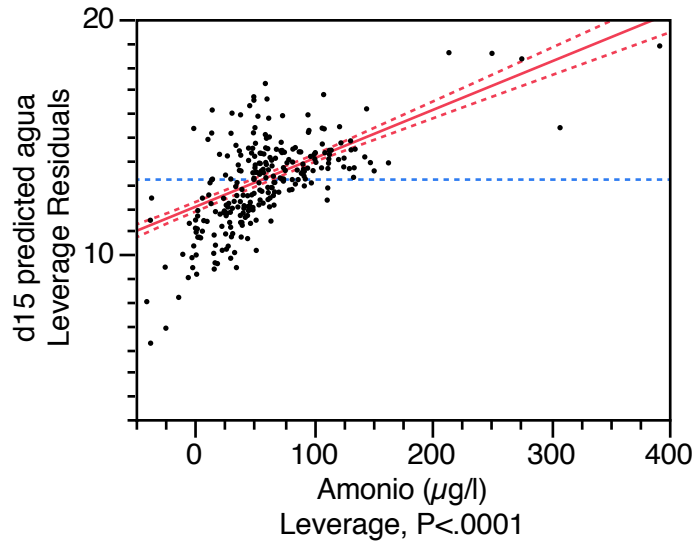


Figura 16. Correlación entre las señales de  $\delta^{15}\text{N-NID}$  y las concentraciones de amonio en el agua del sistema de Urías.

### 6.2.2.3. Variabilidad espacial y temporal de las señales isotópicas de N disponible en el agua.

La Figura 17 muestra la variabilidad espacial y temporal de la señal isotópica del NID estimada en el agua. Se observa un incremento desde valores promedio de 9 a 12‰ en la cabecera lagunar y con un ligero incremento hasta ~15‰ en la parte central del sistema (kilómetro 7 al 12) y posteriormente un descenso a 12‰ que permanece entre 12 y 13‰ hacia la zona marina (Fig. 17a). Por otro lado, durante la época de secas cálidas (mayo de 2009) se observa un promedio máximo en la señal de 15‰ con un descenso gradual durante la época de lluvias hasta alcanzar un mínimo de 10‰ a finales de noviembre, y un posterior incremento hacia las secas frías.

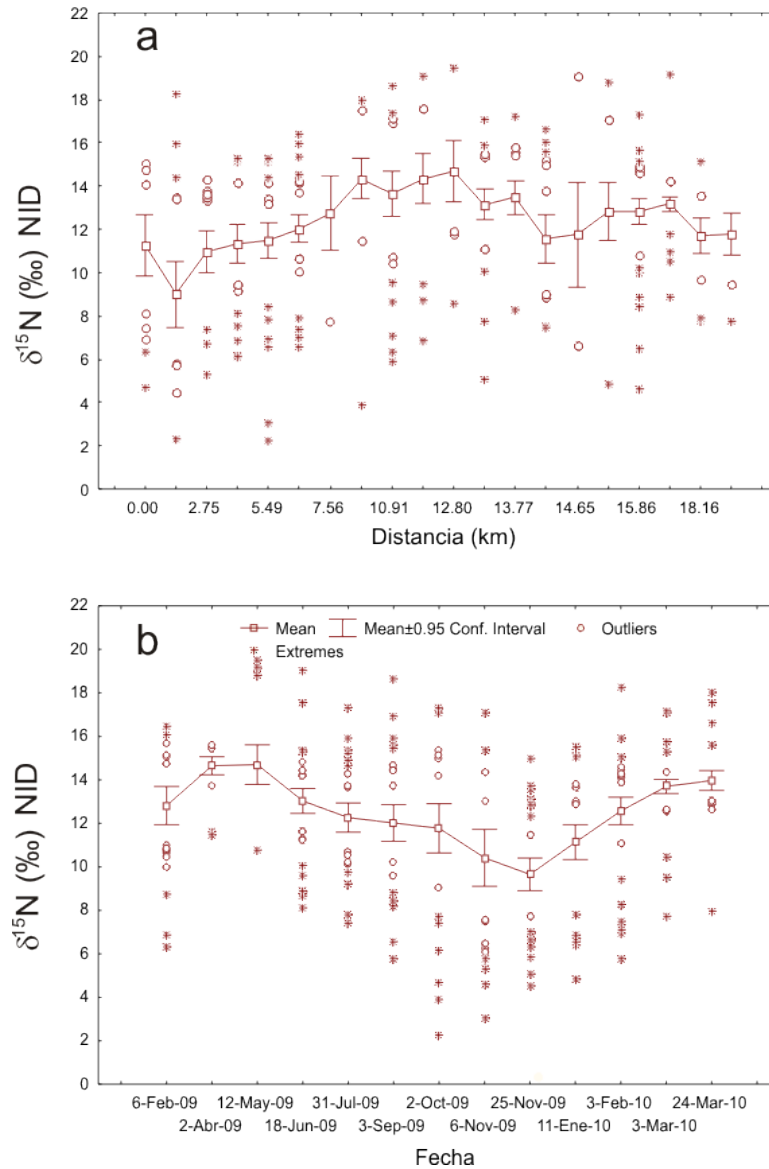


Figura 17. Variación espacial (a) y temporal (b) de las señales de  $\delta^{15}\text{N}$ -NID en el sistema Urías.

La variación espacial por especie química se muestra en la Figura 18. El amonio en el agua se incrementó desde un promedio mínimo de 9‰ hasta máximos de 19‰ en toda la zona de transición y un ligero descenso hacia la boca del sistema hasta 14‰ (Figura 18a).

El nitrato presentó señales bajas ( $\leq 8\%$ ) en la cabecera lagunar y alrededor de la desembocadura del Estero del Infiernillo (kilómetro 12-15) e incrementos  $\geq 10\%$  hacia la parte central (km 8 a 12) y boca del sistema (Figura 18b).

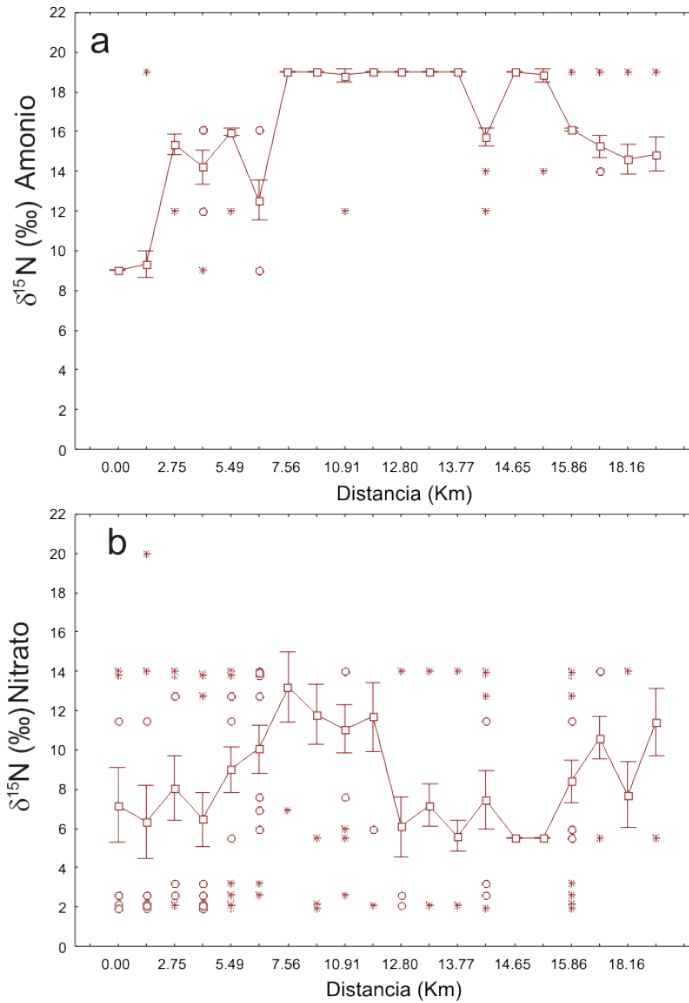


Figura 18. Variación espacial de las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  de amonio (a) y  $\delta^{15}\text{N}$  de nitrato (b) en el sistema de Urías.

En relación a la variación temporal se observó que el amonio permaneció alto y prácticamente constante todo el año dentro del sistema (de 15 a 20‰) (Figura 19a).

En cambio, el nitrato alcanzó sus valores máximos (~14‰) al final de la época de secas frías (marzo) y desciende hasta alcanzar sus mínimos (4 a 5‰) en los meses de lluvias (julio, agosto, septiembre noviembre) para incrementarse de nuevo a valores >10 ‰ hacia las secas frías (Figura 19b).

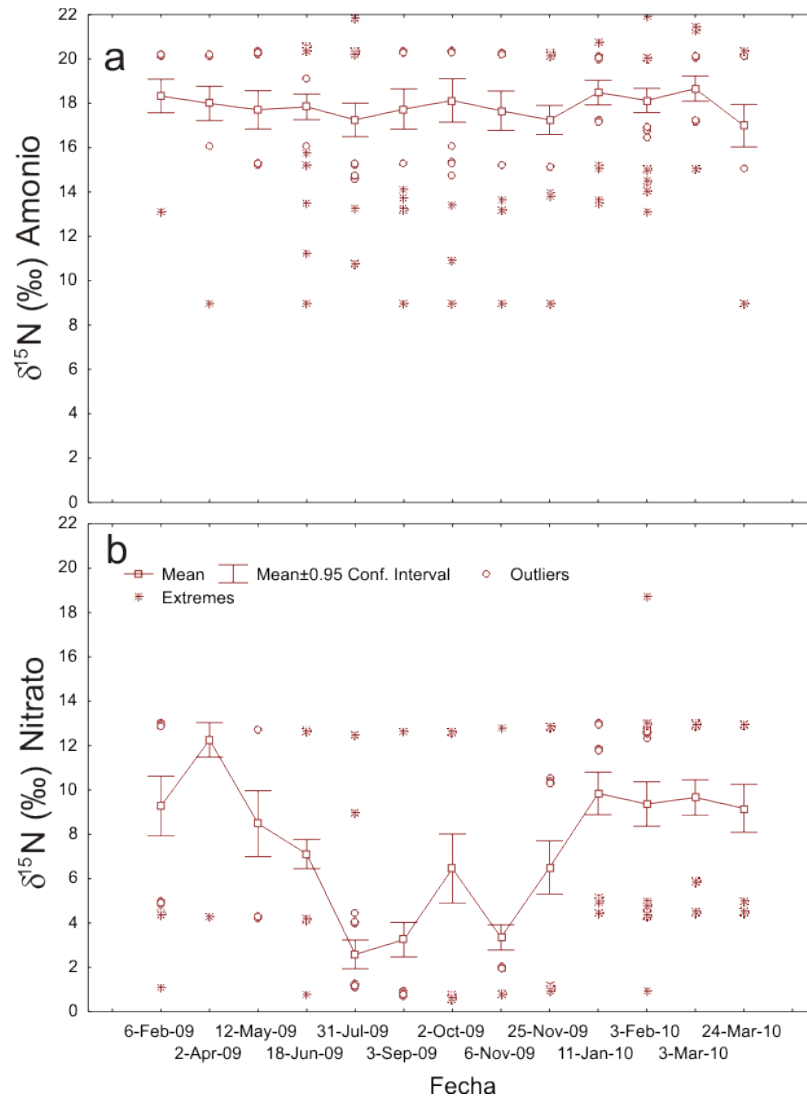


Figura 19. Variación temporal de las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  de amonio (a) y nitrato (b) en el sistema Uruías.

La variación espacial de las señales isotópicas del NID con señales más bajas en la cabecera (1-2 km) se relacionan con la entrada de lixiviados terrestres que provienen del lavado de suelos agrícolas con señales bajas (~2‰), como las registradas en la época de lluvias. Además la variabilidad de las señales en esta zona con valores altos en secas cálidas se asocia a procesos biogeoquímicos como la desnitrificación, degradación de materia orgánica que tienden a enriquecer las señales isotópicas (Mariotti et al., 1988; Kendall, 1998). Por otro lado, en esta zona el tiempo de residencia del agua es alto (Montaño-Ley et al., 2008), que propicia las condiciones para estos procesos. En consecuencia las señales de amonio y nitratos en la cabecera lagunar tienden a variar en función de la magnitud de estos procesos biogeoquímicos que se intensifican en ciertas épocas del año. En tanto que en la parte central del sistema las señales de amonio permanecen relativamente más constantes debido a que en esta zona las señales provienen de fuentes continuas a lo largo del año con señales muy similares (doméstica con 16.1 ‰ y del procesamiento de productos pesqueros con 19.1‰), con un ligero descenso hacia la boca por la entrada de aguas marinas con señales bajas de nitrato. Otra zona del sistema donde se registraron señales de nitratos bajas es en la parte media entre el km 12-15 debido a la influencia de agua dulce que descarga el estero El Infiernillo en época de lluvias, al lixiviado de N atmosférico del área urbana y suburbana que constituyen su cuenca de captación.

### **6.3. Caracterización de la flora ficológica de Urías**

Se identificaron 45 especies de macroalgas, pertenecientes a las Divisiones Chlorophyta con 17 especies, Phaeophyta con 6 especies y Rhodophyta con 22 especies (Anexo 5). Las

especies encontradas con mayor regularidad fueron *Ulva intestinalis*, *Caulerpa sertularioides*, *Gracilaria vermiculophylla* y *Ulva expansa*, que se encontraron al menos en una estación durante todos los muestreos y aunque no se midieron las respectivas biomásas, se observó que estas especies fueron las más abundantes.

En la época de secas frías se registró el mayor número de especies (41), que disminuyó hasta 21 en la época de lluvias. Algunas se encontraron como características de diferentes tipos de hábitats: por ejemplo; *Ulva compressa*, *Ceramium equisetoides*, *Hypnea pannosa*, *H. johnstonii*, *Pleonosporium* sp. y *Padina durvillaei*, solo estuvieron presentes en el hábitat marino (boca del sistema), mientras que la distribución de otras como las de los géneros *Caloglossa*, *Bostrychia* y *Rhizoclonium*, se concentró hacia la parte lagunar (cabecera).

La división Rhodophyta estuvo representada por 22 especies muchas de las cuales se encontraron a lo largo del sistema y en las tres épocas climáticas. Entre estas, *Gracilaria vermiculophylla* fue la que presentó la mayor presencia espacio temporal.

Por otro lado, el género *Ulva* de la división Chlorophyta presentó el mayor número de especies (8), de las cuales las especies con morfología foliácea como: *U. lactuca*, *U. lobata* y *U. fasciata* se encontraron distribuidas desde hábitat lagunar marino hacia el marino, y solo *U. expansa* se encontró distribuida desde el hábitat lagunar-marino hacia la cabecera lagunar, en tanto que especies de tipo filamentoso como *Ulva flexuosa* y *U. intestinalis*, se encontraron a lo largo de todo el sistema.

El número de especies encontradas es similar al registrado por Ochoa Izaguirre (1999) para este sistema (44 spp.) y la composición específica indica que la flora ficológica de este sistema está compuesta por especies adaptadas a las variaciones ambientales espacio-

temporales. La mayoría de los géneros (*Ulva*, *Rhizoclonium*, *Gracilaria*, *Cladophora*, *Polysiphonia*, *Bostrychia* y *Caloglossa*) distribuidos hacia la cabecera del sistema en el área de manglar, son típicas de ambientes estuarinos y se caracterizan por ser tolerantes a un amplio rango de condiciones ambientales (Richardson, 1987, Orozco-Vega y Dreckmann, 1995; Perderson y Borum 1996) y a otros factores como sustrato, penetración de luz, emersión y corrientes (Santelices, 1977; Carpenter, 1990). Entre estas especies *G. vermiculophylla*, que se encontró en las tres épocas climáticas, es considerada pseudoperenne de amplia distribución (Núñez-López, 1996).

Otras especies de los géneros *Grateloupia*, *Ceramium*, *Pleonosporium*, *Hypnea*, *Callithamnion* y *Padina* se encontraron distribuidas desde la zona de transición de los hábitats lagunar-marino y marino hasta el marino. Previos estudios han reportado la distribución de algunas de estas especies en la zona transicional entre el medio estuarino y marino y en el medio marino (Ochoa-Izaguirre et al., 2002; Carballo et al., 2002). El mayor número de especies de algas rojas encontradas en este sistema confirma que la presencia de este grupo taxonómico responde a formas de vida y estrategias reproductivas más eficientes como la dispersión de diversos tipos de esporas que les permiten manifestarse durante todo el año (Darley, 1987). Por otro lado, el mayor número de especies encontradas en la época de secas frías ha sido ya evidenciado en otros estudios para los sistemas lagunares y para ambientes marinos de estas latitudes (Ochoa-Izaguirre; 2000; Carballo et al., 2002; Hernández-Tovalín, 2007) y podría estar relacionado a condiciones ambientales más favorables y/o mayor disponibilidad de nutrientes.

#### 6.4. Variabilidad espacial y temporal del $\delta^{15}\text{N}$ de las especies de macroalgas.

Las macroalgas recolectadas presentaron un rango muy amplio de  $\delta^{15}\text{N}$ . En general, los valores variaron de 0.41 a 22.7‰, con un coeficiente de variación de 4 a 42% (Figura 20). El valor medio osciló desde  $3.6\pm 0.44\%$  en *Halymenia megaspora* a  $15.2\pm 2.5\%$  en *Chaetomorpha linum*. En general, se observó una alta variación intraespecífica (9 a 11‰), mientras que la variabilidad interespecífica fue de 8 a 14‰.

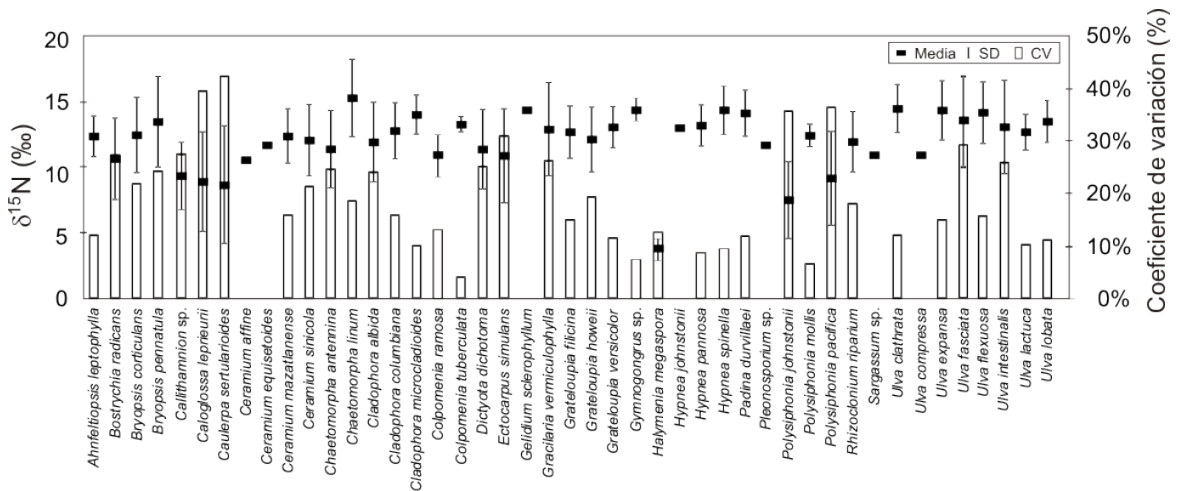


Figura 20. Valores promedio $\pm$ ds y coeficiente de variación de los valores  $\delta^{15}\text{N}$  en 45 especies de macroalgas recolectadas en el sistema Urías durante un año de muestreo.

El valor medio mínimo de la división Chlorophyta fue de  $9.6\pm 4.1\%$  para la especie *C. sertularioides* y el máximo de  $15.2\pm 2.5\%$  para *C. linum*, de la división Phaeophyta se registró un mínimo de  $10.8\pm 0.0\%$  para *Sargassum* sp. y máximo de  $13.4\pm 0.55\%$  para *C. tuberculata*, en tanto que en la división Rhodophyta se obtuvo un valor mínimo de  $3.6\pm 0.44\%$  para *H. megaspora* y el máximo de  $14.9\pm 1.4\%$  para *H. spinella* (Anexo 6). Los máximos valores se encontraron en secas cálidas ( $13.7\pm 2.7\%$ ) y los mínimos en lluvias ( $11.2\pm 3.8\%$ ) (Anexo7). Se observó una tendencia a aumentar los valores isotópicos de las



macroalgas del ambiente lagunar al marino de  $10.3 \pm 3.7$  a  $13.6 \pm 1.8$ ‰ respectivamente. La comparación estadística mostró que las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas recolectadas en época de lluvias fueron significativamente menores a las de épocas de secas, mientras que las del hábitat lagunar fueron significativamente menores al resto de los hábitats ( $P < 0.05$ ). Para analizar la variabilidad espacial y temporal de los especímenes de las diferentes especies de macroalgas, se formaron grupos de especímenes de una misma especie recolectada en un mismo hábitat y época climática. Dado que no se obtuvo un número suficiente de muestras para todas las especies se seleccionaron solamente las especies presentes en dos o más de estos grupos, resultando un total de 21 especies de macroalgas (Tabla 4).

Las señales más bajas ( $< 6$ ‰) y significativamente menores ( $p < 0.05$ ) al resto de las especies encontradas en el mismo hábitat y/o época climática fueron las registradas para *Caulerpa sertularioides*, *Dictyota dichotoma* y *Ulva intestinalis* recolectadas en la época de lluvias, mientras que *Ulva expansa* ( $15.2 \pm 1.2$ ‰), *U. intestinalis* ( $20.1 \pm 0.06$ ‰) y *Gracilaria vermiculophylla* ( $15.0 \pm 3.5$ ‰), recolectadas en la época de secas cálidas obtuvieron los valores promedio más altos.

*U. expansa* ( $15.8 \pm 3.9$ ‰) y *G. vermiculophylla* ( $16.1 \pm 2.5$ ‰), junto con *Bryopsis corticulans* ( $15.1 \pm 1.5$ ‰) fueron las especies con los valores significativamente ( $p < 0.05$ ) más altos en secas frías

Los especímenes recolectados en los hábitats extremos (como el hábitat lagunar) que reciben pulsos de agua dulce y/o efluentes, y que están expuestos a una alta evaporación o más lejanos de la influencia de las mareas, contribuyeron a la alta variabilidad. Como ejemplo de esta variabilidad espacial, tenemos las diferencias intraespecíficas en las señales

isotópicas de 13-19‰ en especies recolectadas en el hábitat lagunar como *G. vermiculophylla* (5.6-19.1‰), *C. sertularioides* (0.41-15.6‰), y *U. intestinalis* (2.4-20.0‰), mientras que los especímenes de especies como *Grateloupia howeii* (10.04-15.01‰), *G. versicolor* (13.0-16.3‰), *Chaetomorpha antennina* (10.8-14.4‰) y *U. flexuosa* (12.2-16.7‰) recolectadas en el hábitat marino, registraron una variabilidad <5‰.

Tabla 4. Composición isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  (media  $\pm$ ds, ‰) para las especies de macroalgas más frecuentes recolectadas en hábitats del sistema Urías, durante las diferentes épocas climáticas.

Especie/época	Secas frías			Secas cálidas			Lluvias		
	Lagunar	Lagunar-marino	Marino	Lagunar	Lagunar-marino	Marino	Lagunar	Lagunar-marino	Marino
<i>Bryopsis</i>									
<i>corticulans</i>		15.1 $\pm$ 1.5 <sup>d</sup>						11.5 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	13.2 $\pm$ 1.4 <sup>f</sup>
<i>Bryopsis</i>									
<i>pennatula</i> *	13.7 $\pm$ 1.2 <sup>c,d</sup>	14.6 $\pm$ 1.6 <sup>d</sup>	13.1 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	12.7 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>			10.0 $\pm$ 3.2 <sup>b,c</sup>	9.5	11.0
<i>Caulerpa</i>									
<i>sertularioides</i> *	11.2 $\pm$ 2.7 <sup>b,c</sup>	12.4 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>		11.0 $\pm$ 0.4 <sup>b,c</sup>	13.4 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>		4.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	
<i>Cladophora</i>									
<i>columbiana</i>	11.7 $\pm$ 1.9 <sup>b,c</sup>	14.9 $\pm$ 2.2 <sup>c,d</sup>						12.7 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	
<i>Rhizoclonium</i>									
<i>riparium</i>	13.2 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	13.4 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>						10.4 $\pm$ 3.5 <sup>b,c</sup>	
<i>Ulva</i>									
<i>expansa</i>	15.8 $\pm$ 3.9 <sup>d</sup>	14.7 $\pm$ 2.3 <sup>c,d</sup>			15.2 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>				
<i>Ulva</i>									
<i>flexuosa</i> *	13.2 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	13.4 $\pm$ 2.4 <sup>c,d</sup>	14.9 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>					14.3 $\pm$ 2.0 <sup>c,d</sup>	15.4 $\pm$ 1.9 <sup>d</sup>
<i>Ulva</i>									
<i>intestinalis</i> *	13.8 $\pm$ 1.9 <sup>c,d</sup>	14.5 $\pm$ 1.3 <sup>c,d</sup>		12.4 $\pm$ 2.3 <sup>b,c</sup>	13.2 $\pm$ 3.2 <sup>c,d</sup>	20.12	2.40	12.0 $\pm$ 4.0 <sup>c,d</sup>	14.9 $\pm$ 2.0 <sup>cd</sup>
<i>Ulva lactuca</i>		13.0 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>						12.2 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	
<i>Ulva lobata</i> *		12.6 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	13.9 $\pm$ 1.3 <sup>cd</sup>			12.9 $\pm$		13.8 $\pm$ 2.1 <sup>c,d</sup>	14.1 $\pm$

Especie/época	Secas frías		Secas cálidas		Lluvias	
				1.9 <sup>c</sup>		4 <sup>c,d</sup>
<b>Phaeophyta</b>						
<i>Dictyota</i>						
<i>dichotoma</i> *	11.1±1.5 <sup>b,c</sup>	13.8±0.9 <sup>c,d</sup>	12.0±0.3 <sup>c</sup>	10.45	5.9±1.3 <sup>a</sup>	5.7
<b>Rhodophyta</b>						
<i>Ahnfeltiopsis</i>						
<i>leptophyllus</i>		11.7±2.3 <sup>b,c</sup>	12.9±0.9 <sup>c</sup>		12.9±0.3 <sup>c</sup>	
<i>Bostrychia</i>						
<i>radicans</i> *	11.1±2.3 <sup>b,c</sup>	14.6±0.8 <sup>d</sup>			8.5±3.3 <sup>ab</sup>	
<i>Caloglossa</i>						
<i>leprieurii</i>	9.2±2.0 <sup>b</sup>	13.8±1.0 <sup>c,d</sup>			7.8±2.8 <sup>ab</sup>	
<i>Ceramium</i>						
<i>mazatlanense</i>		12.6±2.2 <sup>c</sup>	13.0±1.1 <sup>c</sup>			11.0±0.55 <sup>c</sup>
<i>Ceramium</i>						
<i>sinicola</i>		11.5±2.9 <sup>b,c</sup>	14.1±0.9 <sup>c,d</sup>			12.8±2.4 <sup>f</sup>
<i>Gracilaria</i>						
<i>vermiculophylla</i> *	16.1±2.5 <sup>d</sup>	14.2±1.7 <sup>c,d</sup>	15.1±3.5 <sup>d</sup>	14.9±3.5 <sup>c,d</sup>	7.5±1.3 <sup>ab</sup>	12.1±2.7 <sup>c</sup>
<i>Grateloupia</i>						
<i>filicina</i> *		13.1±1.5 <sup>c</sup>	13.9±1.0 <sup>c,d</sup>		13.2±1.	11.2±2.0 <sup>c</sup>
					1 <sup>c</sup>	6 <sup>c,d</sup>
<i>Grateloupia</i>						
<i>howeii</i>		10.1±1.2 <sup>b</sup>	14.2±0.9 <sup>f</sup>			12.9±2.9 <sup>e</sup>
<i>Grateloupia</i>						
<i>versicolor</i>			13.2±1.2 <sup>c</sup>			11.8±0.2 <sup>c</sup>
<i>Polysiphonia</i>						
<i>pacifica</i>	9.4±2.5 <sup>b</sup>					5.9±2.0 <sup>a</sup>

a<b<c<d

Para evaluar más detalladamente esta variabilidad se seleccionaron nueve especies (n=426) que estuvieron presentes más frecuentemente en un mayor número de sitios de muestreo y a lo largo del año (marcadas con asterisco en la Tabla 4), las cuales pertenecen a las tres divisiones de macroalgas identificadas en este estudio. *Bostrychia radicans* (una especie

típica del manglar), *Dictyota dichotoma* y *Bryopsis pennatula* distribuidas desde el hábitat lagunar hacia el lagunar-marino, mostraron una clara tendencia estacional, con altos valores en secas cálidas y bajos en lluvias (Figura 21a). En cambio, el mínimo valor de *B. pennatula* (ampliamente distribuida desde el hábitat lagunar hasta el lagunar-marino) se encontró en secas frías (febrero de 2009) con 4.7‰ y el máximo en secas cálidas (mayo de 2009) con 20.54‰.

El análisis mensual de otro grupo de especies (*U. intestinalis*, *C. sertularioides* y *Gracilaria vermiculophylla*) (Figura 21b) de la parte lagunar-marina del sistema, donde a lo largo del año se forman los florecimientos macroalgales, mostró una alta variabilidad con valores más bajos de la señales  $\delta^{15}\text{N}$  en la época de lluvias. En el caso de *G. vermiculophylla* el valor medio mínimo fue  $8.8 \pm 1.8$ ‰ (octubre/2009) y máximo de  $16.6 \pm 2.7$ ‰ en secas cálidas (junio/2009) y los valores más bajos fueron los registrados para *C. sertularioides* en época de lluvias con  $2.3 \pm 1.9$ ‰ (agosto/2009), mientras que el máximo, comparable a otras especies, se encontró en secas frías (abril/09) con  $15.22 \pm 0.37$ ‰. *U. intestinalis* también obtuvo el mínimo en lluvias (agosto/2009) con 8.9‰ y el máximo fue en secas cálidas (mayo/2009) con  $16.6 \pm 3.3$ ‰ (Figura 21b). El análisis estadístico mostró que en épocas de secas frías y lluvias, la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de especímenes de *C. sertularioides* fueron significativamente menores ( $p < 0.001$ ) a los de *G. vermiculophylla* y *U. intestinalis*.

Otro grupo de especies (*G. filicina*, *U. flexuosa* y *U. lobata*) distribuidas desde el hábitat lagunar marino hacia el marino (Figura 21c), mostraron baja variabilidad a lo largo del año sin una tendencia clara en sus señales  $\delta^{15}\text{N}$ . En este caso, *G. filicina* fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a *U. flexuosa* y *U. lobata* es las épocas de secas cálidas y lluvias.

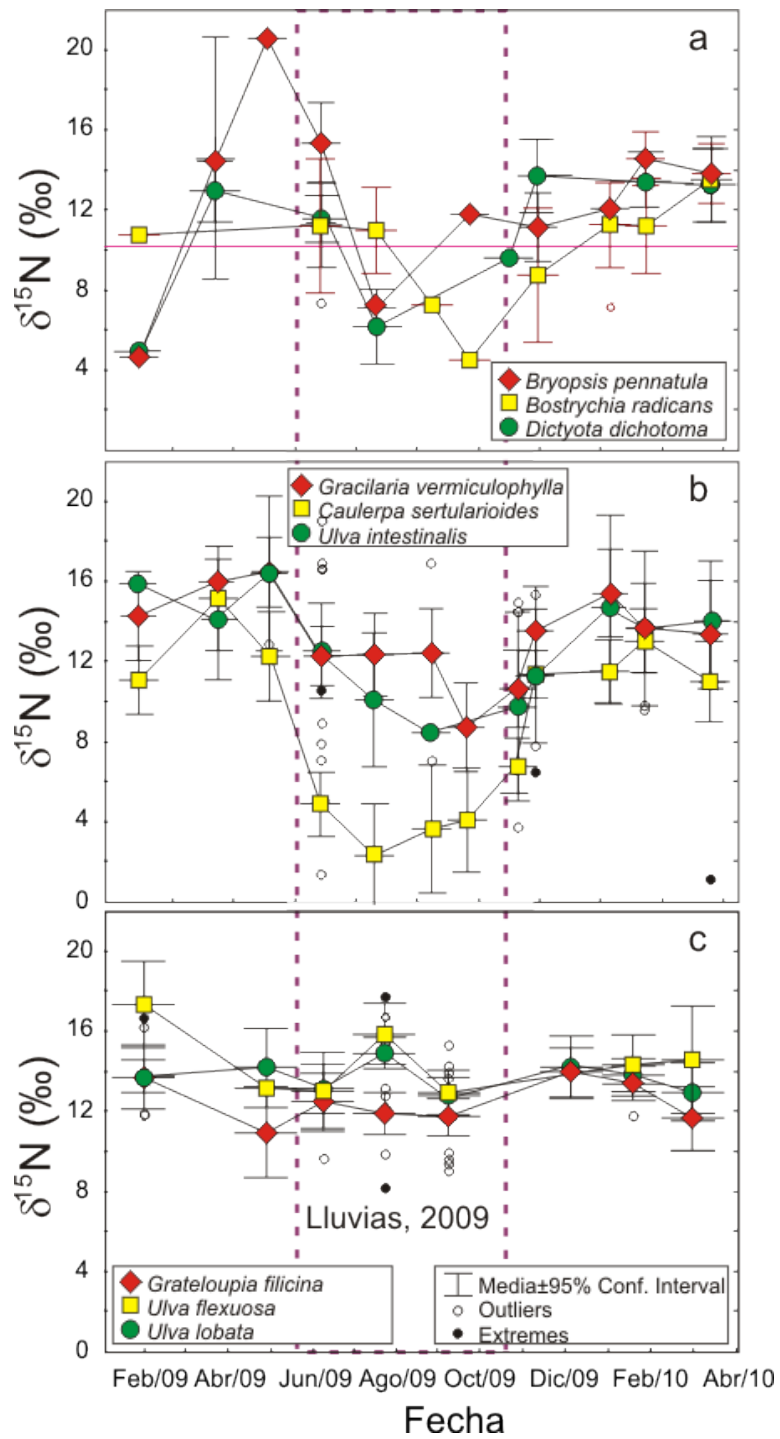


Figura 21. Variabilidad temporal de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en nueve especies selectas de macroalgas representativas del sistema Urías.

También se compararon los valores medios de las señales isotópicas de los especímenes juveniles y adultos de las especies de macroalgas presentes en el mismo sitio y fecha de muestreo, sin encontrar una tendencia clara o diferencias significativas entre estadios de crecimiento (Figura 22).

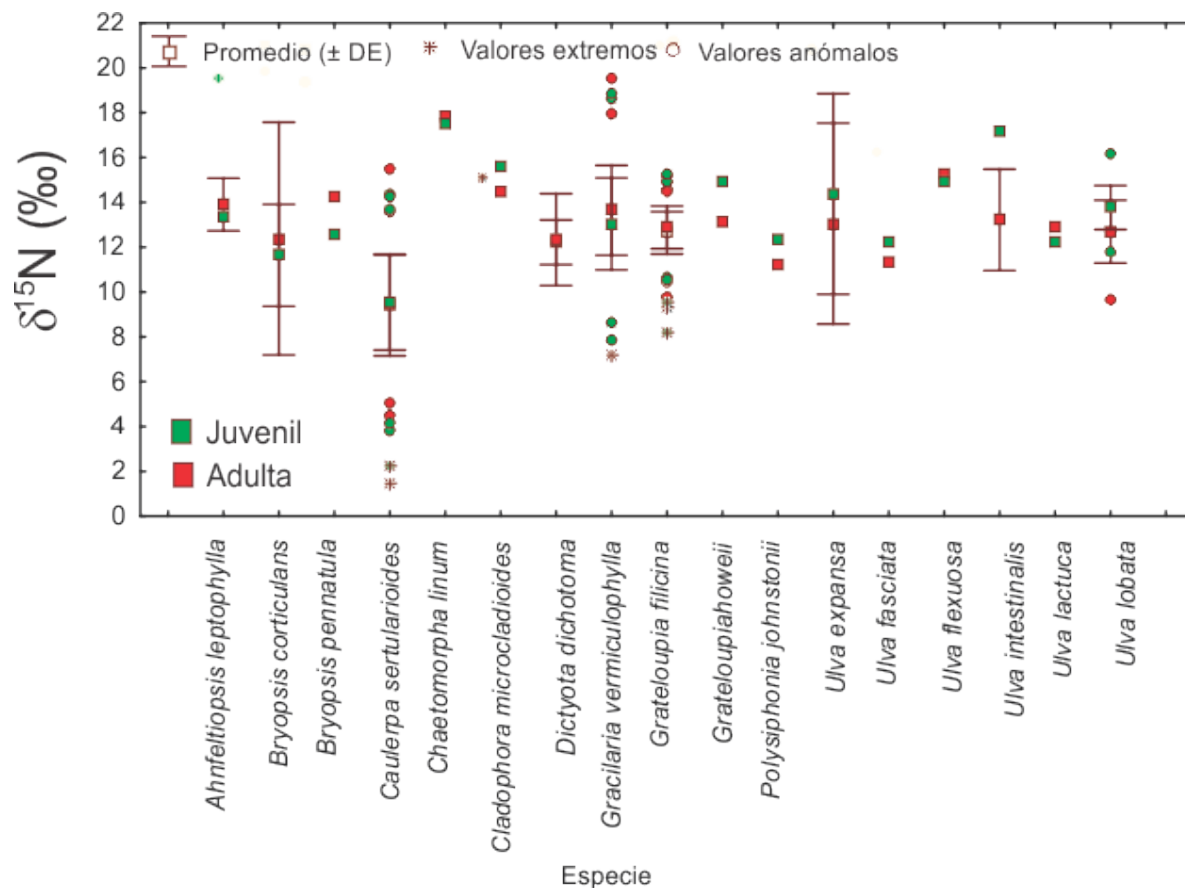


Figura 22. Comparación de las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  entre especímenes juveniles y adultos de las mismas especies recolectadas en el mismo sitio y fecha de muestreo.

La alta variabilidad del  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas analizadas en este estudio puede ser derivado de la combinación de diversos factores. El primero está relacionado a las múltiples fuentes de N que recibe el sistema y que varía espacialmente en los diferentes hábitats y a lo largo del año dependiendo del tipo e intensidad de las actividades humanas realizadas en la cuenca de captación del sistema. Además, los procesos biogeoquímicos

dentro del mismo pueden modificar la señal de las fuentes en el espacio y el tiempo y en consecuencia reflejar variaciones en las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas (Kendall y Caldwell, 1998; Dailer et al., 2010). Por otra parte, las variaciones estacionales de las características ambientales (e.g. temperatura y salinidad) y otros factores abióticos localizados (e.g. tiempo de residencia, geomorfología, corrientes, tipos de sustrato) (Trono, 1988; Lapointe, 1989; Carpenter, 1990; Fong et al., 1996; Pedersen y Borum, 1996) conforman diferentes hábitats y juntos provocan variaciones de las concentraciones y formas químicas disponibles del DIN dentro del sistema.

También el grupo taxonómico tiene un rol importante debido a las diferencias morfológicas y fisiológicas entre las especies que resultan en la capacidad para absorber las formas químicas disponibles, así como las concentraciones a las cuales se encuentran disponibles (Valiela et al., 1997; Pedersen y Borum, 1996; Dailer, 2010).

La mayor parte de los valores  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas registrados en este estudio para el sistema de Urías (Figura 23) se ubicaron en el rango de los valores  $\delta^{15}\text{N}$  reportados para otros sitios del mundo impactados con las mismas fuentes (atmosférica, agrícola, acuícola, y de desechos urbanos) (Riera et al., 2000; Umezawa et al., 2002; Lin et al., 2007; Deutsch y Voss, 2006; Thornber et al., 2008; Piñón-Gimate et al., 2009; Dailer et al., 2010; Teichberg et al., 2010). No obstante, en este sistema se tiene la influencia de más de una fuente en cada sitio de muestreo que varían a lo largo del año, lo cual es reflejado en la variabilidad que presentan las señales de las macroalgas cuando se asocian estas fuentes, más el efecto de otros procesos (e.g. desnitrificación, volatilización, asimilación). Las señales de las macroalgas que son influenciadas por fuentes asociadas mostraron que en las mezclas de fuentes agrícolas y acuícolas, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas son

comparables a los registrados en ecosistemas del Golfo de California (Cruz-López, en proceso), pero son mayores a los publicados en la literatura cuando son reportados por separado. Las señales para las mezclas de fuentes agrícolas y urbanas en este estudio también son comparables a las de ecosistemas del Golfo de California pero con mayor variabilidad para las de Urías. Diversos estudios señalan que las macroalgas con señales  $\delta^{15}\text{N}$  menores a 9‰ reflejan señales de fertilizantes agrícolas y efluentes de granjas de peces y camarón (Burford et al., 2003; Costanzo et al., 2004; Vizzini y Mazzola, 2004; Lin y Fong, 2008; Piñón Gimante et al., 2009; García Sanz et al., 2011; Carballeira et al., 2012).

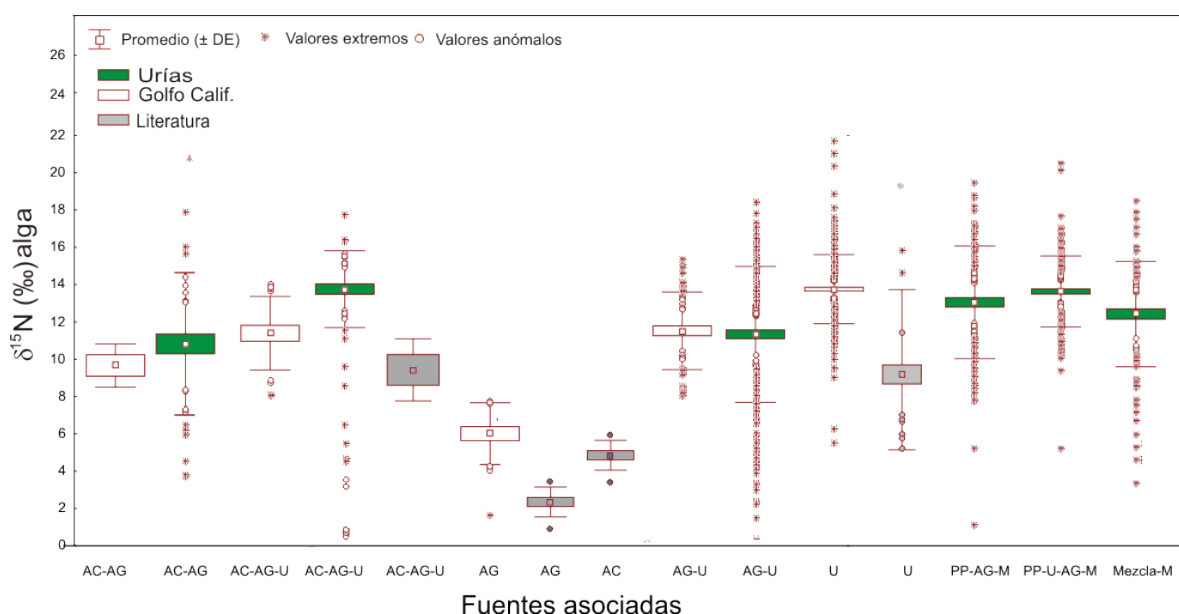


Figura 23. Valores de la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas expuestas a diferentes mezclas de fuentes en el sistema Urías, y una comparación con resultados registrados en el Golfo de California y datos publicados de otros sitios del mundo. (AC=acuícola, AG=agrícola, U=Urbana, PP= Productos pesqueros, M=marina).



La alta variabilidad temporal de la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las especies. *C. sertularioides*, *U. intestinalis*, *D. dichotoma*, *B. radicans* y *G. vermiculophylla* recolectados en el hábitat lagunar en lluvias con señales de  $<10\text{‰}$  (ver tabla 4) sugiere la incidencia de fuentes de nitrógeno con señales bajas como la de efluentes agrícolas (2.1‰) y de granjas camaronícolas (7-9‰) que operan en esta parte del sistema. En contraste, estas mismas especies recolectadas en época de secas cálidas y frías en este mismo hábitat, obtuvieron valores  $\delta^{15}\text{N}$  de 9-16‰, los cuales se asocian a fuentes urbanas (16.1‰) ó a procesos biogeoquímicos (e.g. degradación de materia orgánica, amonificación y desnitrificación) que pueden incrementar el  $\delta^{15}\text{N}$  de la fuente disponible y consecuentemente la señal isotópica de las macroalgas (Cohen y Fong, 2005). Estas diferencias temporales de  $\delta^{15}\text{N}$  en las mismas especies de macroalgas del mismo hábitat, resultan de las variaciones de las fuentes de N a lo largo del año. Con estos resultados, se valida una de las hipótesis planteada en este estudio, que espera encontrar diferencias en la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las mismas especies de macroalgas expuestas a diferentes fuentes de N.

Sin embargo, algunas especies como *P. pacifica* (9.4±2.5‰), *C. leuprieurii* (9.2±2.0‰), *G. vermiculophylla* (16.1±2.5‰) y *Rhizoclonium riparium* (15.8±3.9‰), que fueron recolectadas en este mismo hábitat pero en época de secas frías, y que se asume estuvieron expuestas a la misma fuente de N, obtuvieron una alta variabilidad interespecífica (7‰). Otras especies como *C. sertularioides* (5.5±2.8‰), *D. dichotoma* (5.7‰), *P. pacifica* (5.9±2.0‰) con *U. flexuosa* (14.3±2.0‰) y *U. lactuca* (13.8±2.1‰) recolectadas en el hábitat lagunar marino en lluvias presentaron también una alta variabilidad interespecífica (de hasta 8‰). Estas variaciones interespecíficas, son atribuidas a características de las propias especies (e.g. estructura interna de la planta, estrategias de crecimiento y

reproducción, preferencias por la asimilación de la forma química de nitrógeno, la cinética de absorción, la capacidad de acumulación de N, y la fraccionación de elementos inorgánicos) y/o del espécimen (e.g. estadio reproductivo, talla, grado de senescencia). Estos resultados invalidan la hipótesis que plantea no encontrar diferencias  $\delta^{15}\text{N}$  entre las diferentes especies que habitan en un mismo sitio y expuestas a la misma fuente.

La mayoría de los estudios publicados han sido enfocados a mostrar los valores isotópicos medios pero no analizan la variabilidad entre individuos y especies. Las variaciones isotópicas entre especímenes de una misma especie expuestos a las mismas fuentes no han sido documentadas ampliamente en la literatura o son escasos. En este sentido, existe carencia de información sobre estos aspectos y de las variaciones naturales de los valores  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas (Lapointe et al., 2007; Caballeira et al., 2012). En otros estudios (Lin y Fong, 2008; Carballeira et al., 2012), sugieren que el uso de isótopos estables de N en macroalgas para monitorear sitios impactados por fuentes únicas son efectivos y no representan problemas de interpretación.

La alta variabilidad en las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas es explicada por los cambios de señales en las fuentes de N, pero también es influenciada por otros factores como la especie de macroalga, la época climática y el hábitat en el cual se recolectan los organismos. Se estructuró un modelo de ajuste (Fit model, Jump 9.0) para la predicción de la señal isotópica en función de los factores mencionados (e.g. Tabla 5 muestra el resultado estadístico para uno de los modelos).

Para el modelo simple (o de fuente), que consideró solo las fuentes de N como factor de cambio, se obtuvo un valor de  $R^2=0.33$ . Esto indica que la señal del NID en el agua explica solamente el 33% de la variabilidad del  $\delta^{15}\text{N}$  en las algas. Mediante un análisis de las

contribuciones a la variabilidad basada en corridas parciales removiendo fuentes y/o otros factores, estimamos que las señales  $\delta^{15}\text{N}$  del alga dependen principalmente de las fuentes de aporte de amonio y nitrato (31%) y, en menor proporción de los procesos de mezcla y biogeoquímicos ocurriendo en el sistema (2%).

Al correr el modelo de ajuste completo considerando las fuentes, concentraciones de N y otros factores como época, hábitat, y especie (con efecto simple y combinado) el coeficiente de determinación se eleva hasta 0.71. Lo cual significa que los otros factores no asociados con la fuente explican hasta un 38% ( $R^2=0.33$  para modelo fuente y  $R^2=0.71$  para modelo completo). Los factores no-fuente que contribuyen significativamente a la variabilidad son los combinados época-hábitat-especie y concentraciones de nitrato + nitrito. Otros factores menos importantes son hábitat-especie y época-especie, concentración de amonio y de NOD.

Tabla 5. Estimación de la contribución relativa a la variabilidad de la señal isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas con factores simples y combinados de acuerdo a un modelo de ajuste (Fit modelo, Jump 9.0).

FACTORES	Permutaciones	DF	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Época*Hábitat*Especie	180	17	145.46659	2.0437	0.008
Hábitat*Especie	90	8	63.20181	1.8869	0.0596
Época*Especie	90	1	9.18822	2.1945	0.1391
Amonio ( $\mu\text{g/l}$ )	1	1	6.6792	1.5952	0.2071
Nitrato + Nitrito ( $\mu\text{g/l}$ )	1	1	75.47072	18.025	<.0001
NOD ( $\mu\text{g/l}$ )	1	1	12.17451	2.9077	0.0887
$\delta^{15}\text{N}$ nitrato fuente	1	1	703.50791	168.02	<.0001
$\delta^{15}\text{N}$ amonio fuente	1	1	164.65305	39.325	<.0001

### 6.5. Asociación entre señales isotópicas $\delta^{15}\text{N}$ de las macroalgas con las fuentes dominantes de N en el sitio de colecta.

El análisis de la composición isotópica en macroalgas para determinar la fuente de N está basado en el supuesto de que los especímenes expuestos toman  $^{15}\text{N}$  en proporción a la disponibilidad y reflejan la fuente de N de una manera predecible (Cohen y Fong 2005). Esta premisa implica que el  $\delta^{15}\text{N}$  de las fuentes debe ser conocido e isotópicamente distintos entre sí, además que la fraccionación durante la asimilación es insignificante y, que los cambios en las señales  $\delta^{15}\text{N}$  en los especímenes de macroalgas dependen solo de la fuente de N. Bajo estas consideraciones, se han llevado a cabo muchas investigaciones para

identificar y trazar fuentes de N en ecosistemas marinos. Aunque muchos de estos estudios han sido en aguas frías y templadas que reciben una o pocas fuentes de N y además son caracterizadas por una baja diversidad de especies de macroalgas.

Con el fin de evaluar el cumplimiento de esta premisa en este estudio, se evaluó el coeficiente de correlación entre los valores isotópicos estimados en el agua y los leídos en las algas fue 0.57 ( $p < 0.05$ ,  $N=730$ ), que sugiere un grado significativo de asociación entre ambas variables, aunque, dado que el fundamento de este uso de los isótopos estables de N es que los especímenes toman  $^{15}\text{N}$  en proporción a su disponibilidad se esperaba un valor cercano a la unidad. La falta de ajuste se explica por la confluencia de múltiples fuentes y de procesos biogeoquímicos alterando la señal resultante, además de condiciones ambientales con una alta variabilidad espacio-temporal.

Con el fin de evaluar la importancia de la fuente y de otros factores que pudieran afectar a la señal isotópica de las macroalgas, se corrieron diferentes modelos de ajuste para encontrar aquel que explicara mejor, en función de  $R^2$ , los valores encontrados en el alga. Basado en el análisis de regresión lineal se obtuvo un primer modelo de predicción del valor isotópico del alga en función solamente del valor isotópico en el agua ( $\delta^{15}\text{N}\text{-Alga} = 0.6031[\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}] + 4.5156$ ;  $R^2 = 0.33$ ;  $n=730$ ). En un segundo modelo (Anexo 8) se incorporaron otros factores que pudieran alterar la relación fuente-alga, como especie, hábitat y época. Además se consideraron las características ambientales del área de estudio como temperatura, salinidad, concentraciones y composiciones isotópicas de amonio y nitratos, y DON. Se corrieron diferentes modelos con efectos simples y combinados. El modelo de predicción de los valores en el alga más sencillo fue el siguiente:  $6.97 + i[\text{Época}, \alpha] + j[\text{Especie}, \beta] + 1.7 \times 10^{-3}[\text{NH}_4^+] - 5.0 \times 10^{-3}[\text{NO}_3^-] + 0.17[\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+]\text{fuente} +$

$0.31[\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-]$ fuente. El efecto de la época climática va desde -0.53 a 0.67, para lluvias y secas cálidas, respectivamente, mientras que el efecto de las especies va desde valores negativos (de -2 a -8) hasta máximos de 2.5. Esto refleja que las épocas climáticas, pero sobre todo la especie, influye en el resultado isotópico resultante en los especímenes. Se observó que los valores medidos en el alga con el de predicción del modelo presentan una afinidad del 51% ( $R^2 = 0.51$ ;  $n=730$ ). Esta correspondencia es significativa, aunque aún es baja considerando que en el modelo de predicción del  $\delta^{15}\text{N}$  en el NID del agua fue del 76%.

El incluir efectos combinados entre los parámetros, el modelo resultante fue:  $\delta^{15}\text{N}_{\text{alga}}(\text{‰}) = 6.34 + i[\text{Época},\alpha] + j[\text{Especie},\beta] + m[\text{Hábitat},\gamma] + ij[\text{Época}*\text{Especie}] + ij[\text{Época}*\text{Hábitat}] + jm[\text{Hábitat}*\text{Especie}] + ijm[\text{Época}*\text{Hábitat}*\text{Especie}] + 1.7 \times 10^{-3}[\text{NH}_4^+] - 5.0 \times 10^{-3}[\text{NO}_3^-] + 0.17[\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+]\text{fuente} + 0.31[\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-]\text{fuente}$ , permiten obtener un modelo de ajuste con una  $R^2$  de hasta 0.65 (Modelo 3). Sin embargo, la complejidad del modelo es mucho mayor. En ningún modelo las variables físicas de temperatura, salinidad y precipitación participaron con efectos significativos. El modelo de ajuste resultante se aplica según la especie, época y hábitat de estudio. Más detalles de los resultados del modelo se presentan en el Anexo 9.

La aplicación ambigua de esta herramienta isotópica para distinguir fuentes de N, es solo posible cuando existen pocas fuentes y tienen señales isotópicas contrastantes, y con condiciones ambientales espaciales y temporales relativamente estables, y utilizando pocas especies de macroalgas como biomonitores (Lin y Fong, 2008; Costanzo et al., 2004; Carballeira et al., 2012). No obstante, en ecosistemas estresados y complejos como es el caso del sistema lagunar Urías, que reciben múltiples fuentes de N, con condiciones

ambientales cambiantes en el tiempo y espacio, y con una amplia diversidad de especies de macroalgas, se obtiene como resultado una elevada variabilidad isotópica que tiende a oscurecer cualquier distinción de las fuentes en las macroalgas, en parte porque las macroalgas reflejarán la mezcla de las dos fuentes o existe la probabilidad de que la fraccionación se incremente si el medio se encuentra enriquecido con nitrógeno (Kendall, 1998).

En estos casos es necesario evaluar la variabilidad espacio temporal entre las mismas especies (intraespecífica) y entre diferentes especies (interespecífica) (Carballeira et al., 2012), expuestas a las mismas fuentes, como se realizó en este trabajo

Por tanto, la selección de las especies de macroalgas, el sitio de muestreo o hábitat y la estación climática son factores que deben ser considerados en la identificación de fuentes de N en este tipo de ecosistemas (Albertín et al., 2007). Además, es recomendable conocer la fraccionación isotópica entre especies y la influencia de los factores biogeoquímicos que modifican las señales isotópicas de N de las fuentes, de otra manera puede darse una interpretación errónea de las señales  $\delta^{15}\text{N}$  (Cohen y Fong, 2005) (Ver anexo 10).

#### **6.6. Contribuciones relativas de las fuentes de N a las señales $\delta^{15}\text{N}$ en las macroalgas**

Bajo las consideraciones anteriores, se aplicó la ecuación de balance isotópico de dos o tres componentes para determinar las contribuciones relativas de las principales fuentes que inciden en el sistema (Phillips y Gregg, 2001). Se hizo una separación de la contribución por forma química, dado que la mayoría de las fuentes tienen especies predominantes (e.g. nitratos para agricultura, y amonio para desechos domésticos y efluentes industriales). Cuando las fuentes de una misma forma química de N tuvieron rangos similares en las

firmas isotópicas no fue posible determinar la contribución relativa de cada fuente, por lo que fue considerada como mezcla. Esto ocurrió, por ejemplo, en sitios donde convergen desechos domésticos tratados con efluentes del procesamiento de productos pesqueros, y aguas donde se mezcla el nitrato de origen marino con nitrato de origen antropogénico de baja señal (e.g. agrícola). También se observó que en algunos sitios la señal isotópica del amonio y del nitrato varió en el mismo rango, por lo que no fue posible distinguir las contribuciones de cada forma química en el alga.

En la Figura 24, se muestra la contribución relativa de las fuentes (en % del total) al valor de la señal isotópica de algunas de las especies de macroalgas más frecuentes en el sistema durante el periodo de estudio (*C. sertularioides*, *G. vermiculophylla*, *U. intestinalis*, *B. radicans* y *G. filicina*).



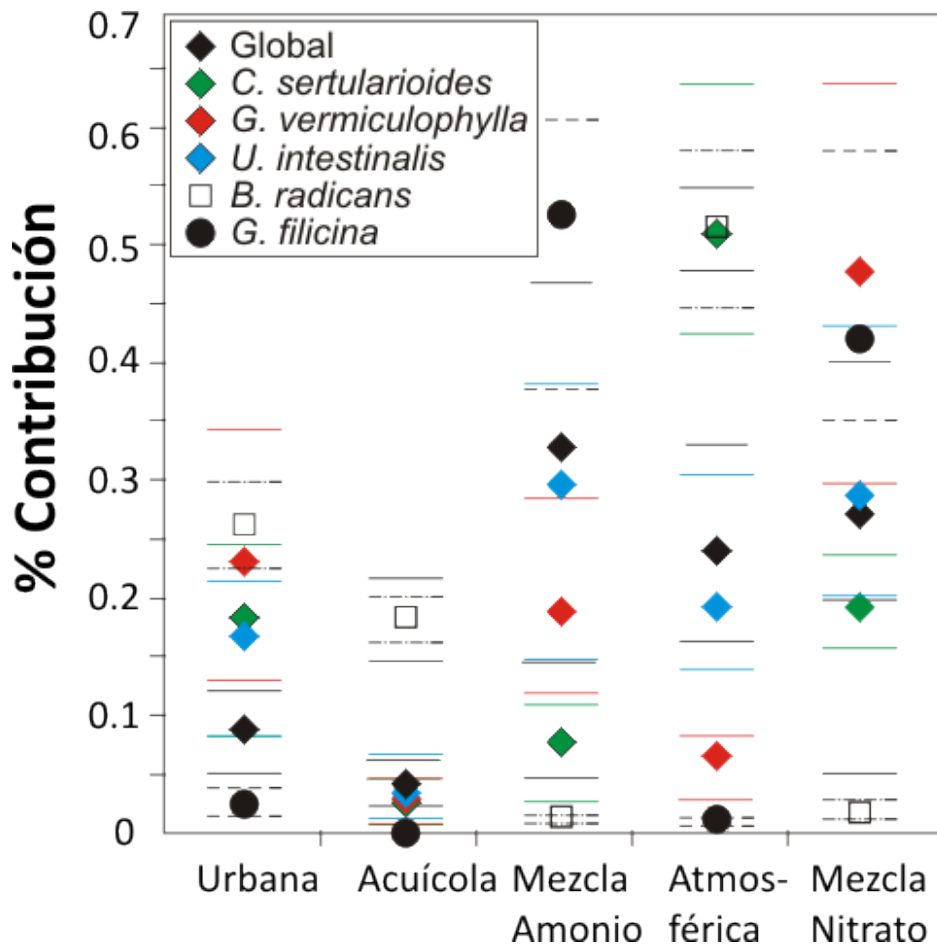


Figura 24. Contribuciones relativas de las fuentes de N (en % del total) identificadas en el sistema Urías a las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  de las especies de macroalgas.

Se observa que de forma global (5 spp) la fuente asociada al depósito atmosférico que incluye el lavado de suelos agrícolas (2%) fue la que más contribuyó (11-34%), seguida de la urbana con (5-12%) y finalmente de la acuícola con (3-7%). No fue posible identificar el origen de aproximadamente un 60% del N por tratarse de una mezcla de amonio que contribuyó con 15-47% derivado de efluentes domésticos y del procesamiento de productos pesqueros, así como una mezcla de nitratos de 20-40%, derivados del depósito atmosférico y de la entrada de agua marina.

Las contribuciones relativas de las fuentes en las cinco especies se presentan también en la Figura 24. La señal de *C. sertularioides* tuvo una mayor contribución de la fuente atmosférica con 50% seguida de la mezcla de nitrato con 20% el resto de las fuentes tuvieron una influencia menor a 20%. Para *G. vermiculophylla* su señal fue influenciada en un 48% por la mezcla de nitratos, entre 22 y 20% por la urbana y la mezcla de amonio. *U. intestinalis* obtuvo una contribución muy similar de las mezclas de amonio (30%) y nitrato (29%). En *B. radicans* la señal estuvo más influenciada por la atmosférica en un 52% y en menor contribución (1 y 2%) de las mezclas de nitratos y amonio. Contrariamente *G. filicina* estuvo mayor influenciada por las mezclas de amonio (53%) y de nitrato (42%).

El potencial de las especies seleccionadas de ser usadas como biomonitores se evaluó mediante un análisis de regresión lineal entre las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  de cada especie y el  $\delta^{15}\text{N}$ -N disponible en el agua en la cual fueron recolectadas. Los resultados de contribución separando las especies más comunes en el sistema Urías, revelan ciertas diferencias, pero en general reflejan que las fuentes identificadas en orden de importancia son: la atmosférica, urbana, y de procesamiento de productos pesqueros, siendo la de menor importancia la acuícola.

La Figura 25 muestra el resultado de este análisis para cada especie selecta. Se observa que todas las especies en conjunto tuvieron un coeficiente de determinación ( $R^2=0.31$ ,  $p<0.05$ ), pero en particular cada una de las especies analizadas tuvo diferentes valores de  $R^2$ , por ejemplo, en *C. sertularioides* se determinó el valor más alto ( $R^2=0.84$ ) y más bajo para *U. lobata* ( $R^2=0.32$ ).

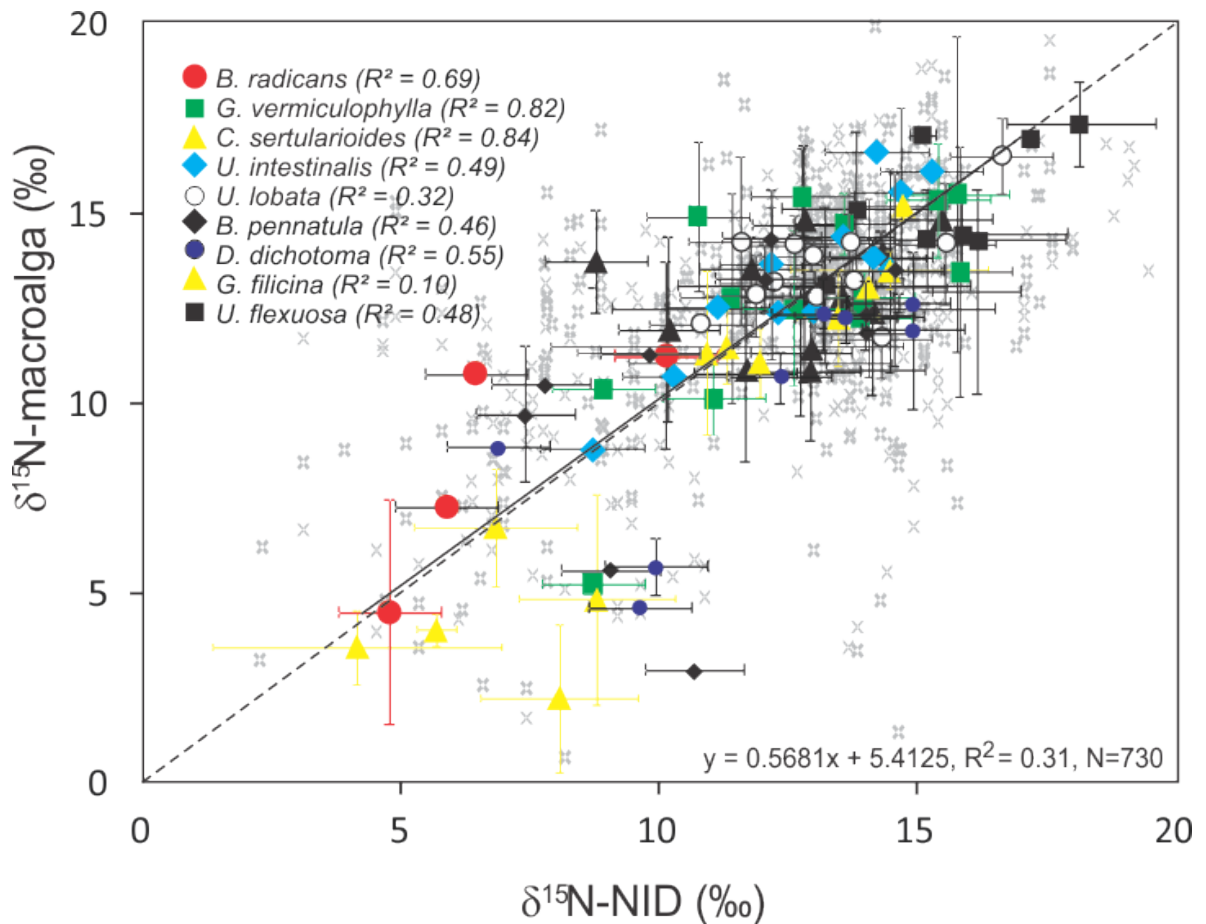


Figura 25. Resultados del análisis de regresión lineal entre el  $\delta^{15}\text{N}$ -NID disponible en el agua y  $\delta^{15}\text{N}$  de las especies de macroalgas más frecuentes en el sistema Urías.

Además, la contribución relativa de las fuentes de N a las señales de las diferentes especies de macroalgas en Urías está relacionada con el sitio de muestreo. Esto fue evidenciado por especies como *C. sertularioides* y *B. radicans* que en este estudio se distribuyeron hacia la cabecera lagunar y cuyas señales isotópicas fueron mayormente influenciadas por la fuente atmosférica y que incluyó la señal del lavado de suelos agrícolas. En este estudio, se identificaron dos fuentes en la cabecera del sistema: la atmosférica y la acuícola, sin embargo, el porcentaje de contribución de ésta última a las señales de estas especies fue menor. En cambio, en especies como *G. vermiculophylla* que se distribuyó mayormente en

el hábitat lagunar-marino con influencia de descargas urbanas y del procesamiento de productos pesqueros, dominadas por amonio con altas señales, resultaron en valores isotópicos más elevados que en las especies anteriores. Por otro lado, *G. flicina* mayormente distribuida hacia el medio marino, con mezclas de amonio y nitratos, la señal disminuyó con respecto a la de *G. vermiculophylla*, esto debido a la mezcla de N enriquecido con una fuente más ligera (nitrato marino).

## **6.7. Experimentos de laboratorio**

### **6.7.1. Tasas de absorción, asimilación y crecimiento de *Ulva lobata* con diferentes concentraciones de amonio, nitrato y nitrato de amonio.**

Las macroalgas están asociadas al incremento de las cargas de N que llegan a los ecosistemas costeros, e independientemente de la fuente, éstos llegan en pulsos y varían espacial y temporalmente (Fong y Zedler, 2000; Fry et al 2003). Así las macroalgas pueden tomar rápidamente estos pulsos de nutrientes de la columna de agua antes de que sean detectados por los métodos de muestreo convencionales (Wilson, 1994). En base a esta habilidad, las macroalgas resultan ser buenos indicadores del suministro de nutrientes en un ecosistema (e.g. un florecimiento algal posterior a un pulso). Además, su composición isotópica puede proporcionar información integrada de las fuentes de N (Cole et al., 2004; Deutsch y Voss, 2006; Golléty et al., 2010). Sin embargo, la respuesta de las macroalgas a la disponibilidad de nitrógeno y la composición isotópica resultante depende, además de la de fuente de N, de la especie de macroalga, de su fase y tasa de crecimiento, de las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, luz) y de las formas químicas (amonio,

nitrato o forma orgánica) y concentración de N (Liu y Kaplan, 1989; McGlathery, et al., 1997; Deutsch y Voss, 2006; Thornber et al., 2008; Teichberg et al., 2010).

Así, para aprovechar mejor el potencial de las macroalgas como bioindicadoras del impacto de las diversas fuentes de nitrógeno en los ecosistemas acuáticos, y validar su uso como biomonitores del suministro de N a un ecosistema, es necesario comprender la importancia que tiene cada uno de estos factores. Es por esto que en este estudio el trabajo de campo realizado en el sistema lagunar Urías se complementó con experimentos de laboratorio, para los cuales se seleccionó la especie *Ulva lobata* por ser una de las más ubicuas y conspicuas en el sistema y por su tolerancia a la manipulación.

#### **6.7.1.1. Experimento 1: tasas de absorción con amonio y nitrito**

La tasa de absorción de amonio, varió entre tratamientos desde  $0.67 \pm 0.10$  a  $2.8 \pm 0.55$  mg N g dw<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mientras que la de nitrito (Figura 26), varió de  $0.64 \pm 0.23$  a  $1.96 \pm 0.22$  mg N g dw<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Se observó que la variabilidad es independiente de la forma química, y está en función de la concentración del nutriente disponible, siendo mayor a concentraciones más altas e inversa con el tiempo de exposición, lo cual resultó en un decaimiento más rápido en los primeros minutos de exposición en todos los tratamientos. Esto se reflejó en valores bajos de la tasas de absorción en respuesta a las bajas concentraciones y mayores tiempos de exposición (24 horas), como se observa en las figuras 26, 27 y 28.

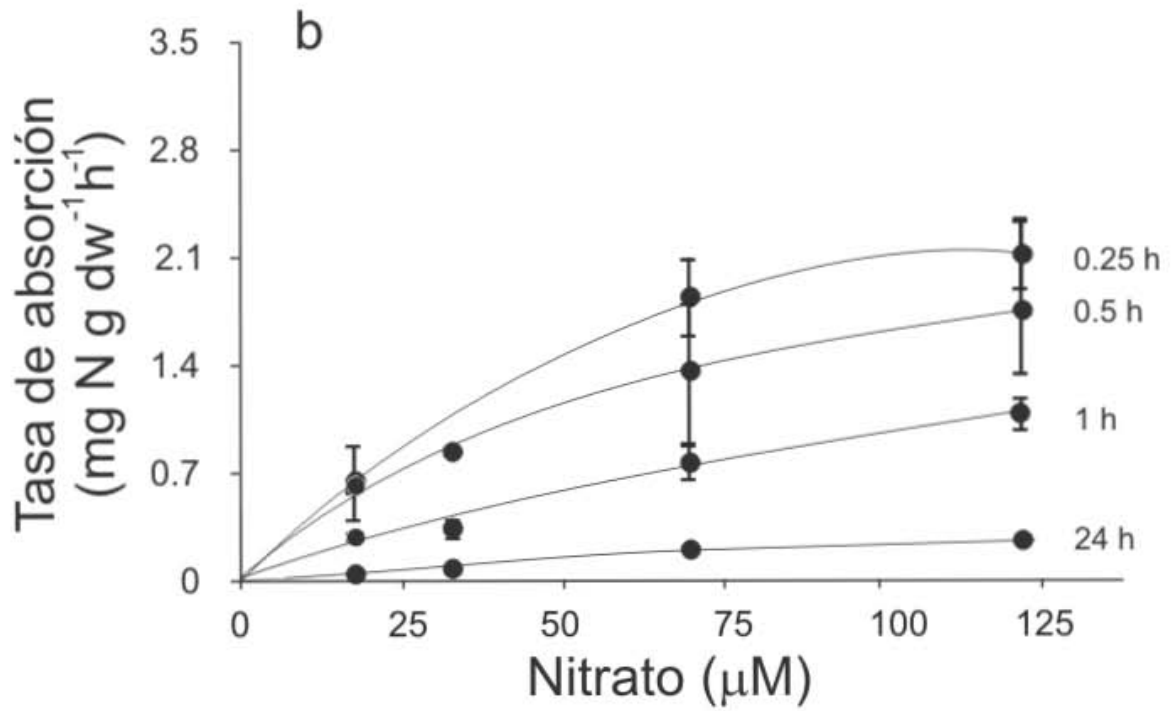
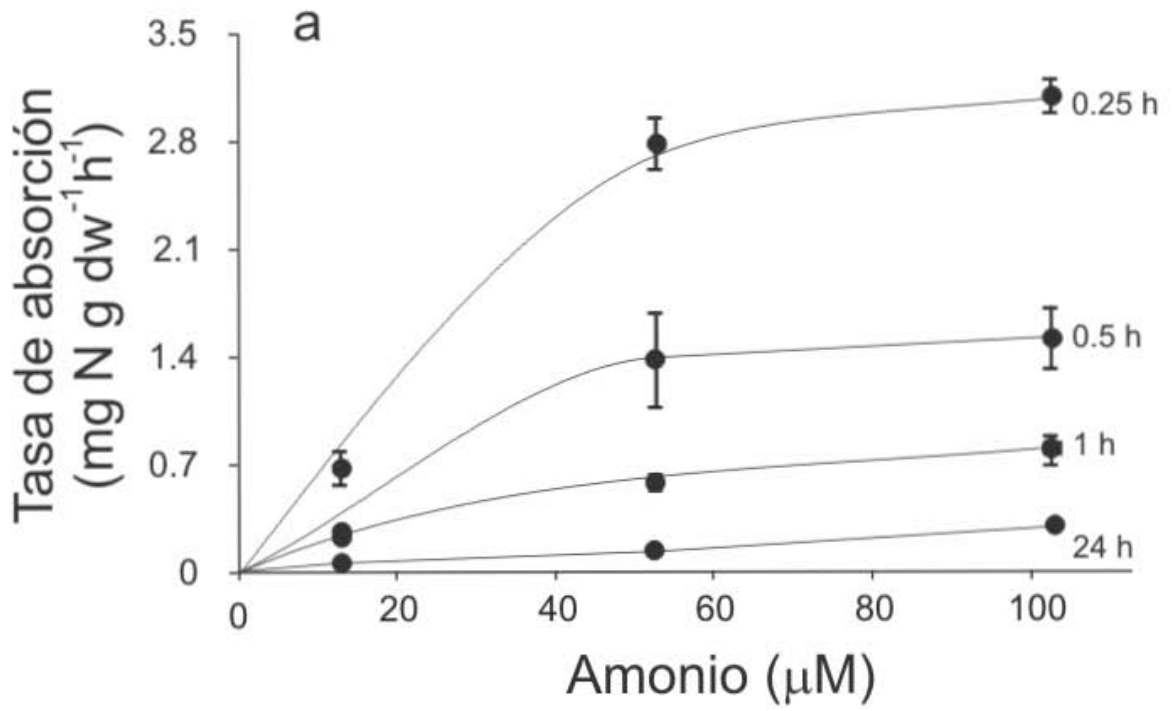


Figura 26. Variaciones en el tiempo de las tasas de absorción de amonio (a) y de nitrato (b) de *U. lobata* expuesta a diferentes concentraciones en condiciones de laboratorio.

Las tasas de absorción de amonio (tratamiento 2 y 3) y de nitratos (tratamiento 3) fueron significativamente mayores en los primeros minutos ( $p < 0.05$ ) que en el resto de los períodos de exposición. Se registraron tasas mayores para amonio, aunque se notó una tendencia a tasas de absorción similares para los mayores tiempos de exposición a las concentraciones bajas. Analizando el proceso de absorción, Pedersen (1994) identificó tres etapas en las tasas de absorción de nutrientes de las macroalgas. Una primera etapa, denominada consumo repentino (surge uptake) se produce al recibirse un pulso de N (altas concentraciones en cortos periodos) y se caracteriza por tasas de absorción muy elevadas. Posteriormente en la etapa II, las tasas de absorción se estabilizan a niveles menores y son casi constantes conforme la concentración disminuye y la exposición se prolonga. En esta etapa ocurre un control interno en el espécimen para la captura de N ambiental. Finalmente, hay una tercera etapa que ocurre a bajas concentraciones de N ambiental y en el cual las tasas de absorción disminuyen drásticamente con la disminución del N disponible. En la etapa I y III el control de la absorción es dado por las concentraciones externas. En este estudio, en la Figura 27, se muestran todas las tasas de absorción medidas a diferentes tiempos y en función de la concentración de amonio (Figura 27a) y nitratos (Figura 27b). Se observa que la etapa I ocurre a concentraciones  $>80 \mu\text{M}$  de amonio y  $>90 \mu\text{M}$  de nitrato, mientras que la etapa II, se presenta en los intervalos de  $30-80 \mu\text{M}$  y  $40-90 \mu\text{M}$ , respectivamente. La etapa III ocurrió a concentraciones  $<20$  y  $<40 \mu\text{M}$  de amonio y nitrato, respectivamente.

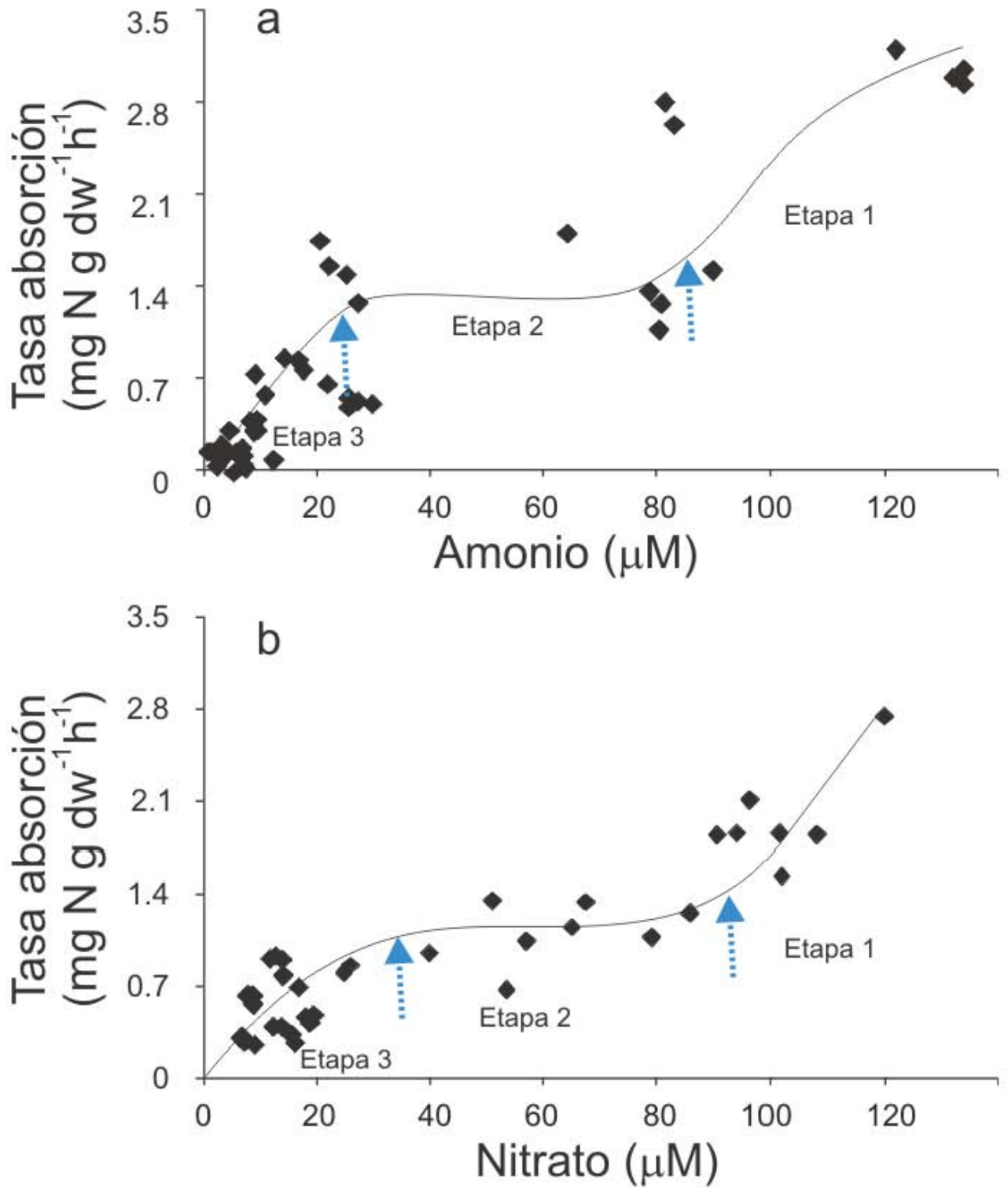


Figura 27. Tasas de absorción de amonio (a) y nitrato (b) en función de la concentración del sustrato donde se muestran tres fases de la tasas de absorción.



Altos valores en las tasas de absorción a corto plazo podrían ser explicados en función del grado de limitación de N en las macroalgas, cuando han sido sometidas a un ambiente sin N disponible (Pedersen, 1994), o por otro lado, reflejar la habilidad de las macroalgas para absorber rápidamente los nutrientes (Raikar y Wafar, 2006). En nuestro experimento, las algas fueron pre-sometidas a un ambiente bajo en N pero sin ausencia total del mismo (2  $\mu\text{M}$  de amonio y 3  $\mu\text{M}$  de nitrato), por lo tanto, asumimos que es una respuesta a la habilidad de tomar N en un corto tiempo de exposición. Sin embargo, es de notar que el comportamiento de las tasas de absorción medido en los experimentos, también depende del historial nutricional de los especímenes expuestos. En este sentido, las tasas de absorción no deben ser basadas solo en la concentración del nutriente, sino que también se debe considerar el aspecto nutricional de los especímenes previo al arranque del experimento (O'Brien y Wheeler, 1987; Kamer et al., 2003).

Experimentos realizados con macroalgas (e.g. *Ulva lactuca*, *Ulva* spp. y *Gracilaria* spp.), han mostrado esta habilidad para tomar N disponible en unos cuantos minutos de exposición (Harlin, 1978; Rosenberg y Ramus, 1984; Fujita, 1985; Kamer et al., 2003; Phillips y Hurd, 2003). Las tasas de absorción varían según las especies, y son mayores en las de rápido crecimiento, como las del género *Ulva* (*U. lactuca* y *U. lobata*). Un punto muy importante a considerar, es que en la literatura se presentan tasas de absorción medidas tanto a corto como a largo plazo. Sin embargo, como se observó en este estudio, las de largo plazo siempre presentan valores más bajos que las de corto plazo a las mismas condiciones (Kamer et al., 2003).

Además se observó que las tasas de absorción están en función directa de la concentración de N disponible, independientemente del tiempo de exposición y forma química (Raikar y

Wafar, 2006). Se observó que las tasas de absorción no variaron proporcionalmente a la concentración del nutriente, pero tuvieron un comportamiento semejante al descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, en que el nutriente representa al sustrato (Fujita, 1985; Pedersen, 1994; Naldi y Viaroli, 2002; Cohen y Fong, 2005).

A pesar de lo anterior, se observa que en general, las tasas de absorción de amonio y nitrato registradas en este estudio también coinciden con resultados reportados por otros autores para diversas especies de macroalgas. Tales estudios reportan tasas de absorción inicialmente rápidas que disminuyen con el tiempo, en contraste, aunque la tasa de absorción de nitrato y de amonio tiene el mismo comportamiento, la absorción de nitrato es más lenta.

Las tasas de absorción de amonio a corto plazo ( $\mu\text{mol.g dw}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) registradas en este estudio son comparables a las reportadas en experimentos similares con otras macroalgas ( $30\text{-}439 \mu\text{mol.g dw}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (Fujita, 1985; Pedersen, 1994; Pedersen y Borum 1997; Lotze y Schramm, 2000; Kamer et al., 2003; Raikar y Wafar, 2006).

Otros estudios (Naldi y Wheeler, 2002; Cohen y Fong, 2005; Rees et al., 2007) reportan valores más bajos a los obtenidos en este estudio para otras especies del género *Ulva* (*U. fenestrata* y *U. intestinalis*), en el intervalo  $2.6\pm 0.29$  a  $64.7\pm 7.3 \mu\text{mol.g dw}^{-1} \text{h}^{-1}$ , pero no se pueden comparar con los resultados de estos experimentos debido a que no especifican algunas de las condiciones de experimentación (e.g. concentración, tiempo de exposición, a las cuales se obtuvieron estos datos puntuales).

Asimismo, las tasas obtenidas para nitrato en este estudio son comparables a las medidas por Kamer et al. (2003) para *E. intestinalis* (sinónimo *U. intestinales*) bajo condiciones semejantes, y mayores a las registradas para *Enteromorpha* sp. (pertenecientes hoy al

genero *Ulva*) bajo diferentes condiciones de exposición en términos de concentración y tiempo. Otros estudios reportan tasas de absorción bajo diferentes concentraciones y tiempos de exposición en el intervalo 2.03 a 129.4  $\mu\text{mol.g dw}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Harlin, 1978; Pedersen y Borum, 1997; Lotze y Schramm, 2000; Naldi y Viaroli, 2002; Naldy y Wheeler, 2002; Cohen y Fong, 2005).

### **6.7.1.2. Experimento 2. Tasas de crecimiento y asimilación**

Las tasas de crecimiento y asimilación de amonio, nitrato y nitrato de amonio se incrementaron significativamente en todos los tratamientos comparados con el control.

#### **6.7.1.2.1. Amonio**

La tasa de crecimiento promedió de  $7.6\pm 0.74 \text{ mg g dw}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en el tratamiento 1, hasta  $15.4\pm 1.2 \text{ mg g dw}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para el tratamiento 4 (Figura 28). El contenido de N en el tejido algal decreció en el tratamiento 1 y en el control (alrededor del 20%) en relación al contenido inicial cuando finalizó el experimento (Tabla 6). Esto indica que en el ambiente se tenía una disponibilidad de N menor a la requerida para la biomasa macroalgal expuesta (de reserva+estructural). Aunque consideramos que esto no afectó a los resultados debido a que el alga aún así mostró un ligero crecimiento, lo que significa que los especímenes utilizaron el N de reserva para crecer. Experimentos realizado por Fong et al. (1993) encontraron que concentraciones menores a 19  $\mu\text{M}$  el N limita el crecimiento de las algas y a pesar de que se presenta un ligero incremento en el crecimiento, las reservas de N disminuyeron en el tejido.

En los siguientes tratamientos (2 a 4), los contenidos y cantidades totales de N en los especímenes aumentaron al final del experimento en relación al contenido inicial. Las tasas

de asimilación incrementaron notablemente en los especímenes expuestos en los tratamientos 2 y 3 (9.2 y 14.1 mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), mientras que en los tratamientos 4 el incremento fue muy similar al 3 (de 14.1 a 15.4 mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Las tasas de absorción medidas en el tratamiento 2 fueron significativas menores a las de los tratamientos 3 y 4 (p<0.05). Esto sugiere que a las concentraciones de 102.5 μM se puede obtener un máximo crecimiento y que el exceso de N en el tejido de los especímenes expuestos a 502.5 μM, se trata de N de reserva. Haciendo un análisis de la cantidad de N (biomasa x contenido), estimamos que los especímenes del tratamiento 4, tuvieron 67% más de N de reserva, respecto al tratamiento 3.

Las tasa de asimilación de amonio se incrementó desde 1.4 hasta 4.9 mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en especímenes expuestos en los tratamientos 1 al 4 (de 12.5 a 502.5 μM), con una tendencia lineal. Respecto al control, las tasas de asimilación fueron ~5 veces menores que la máxima concentración.

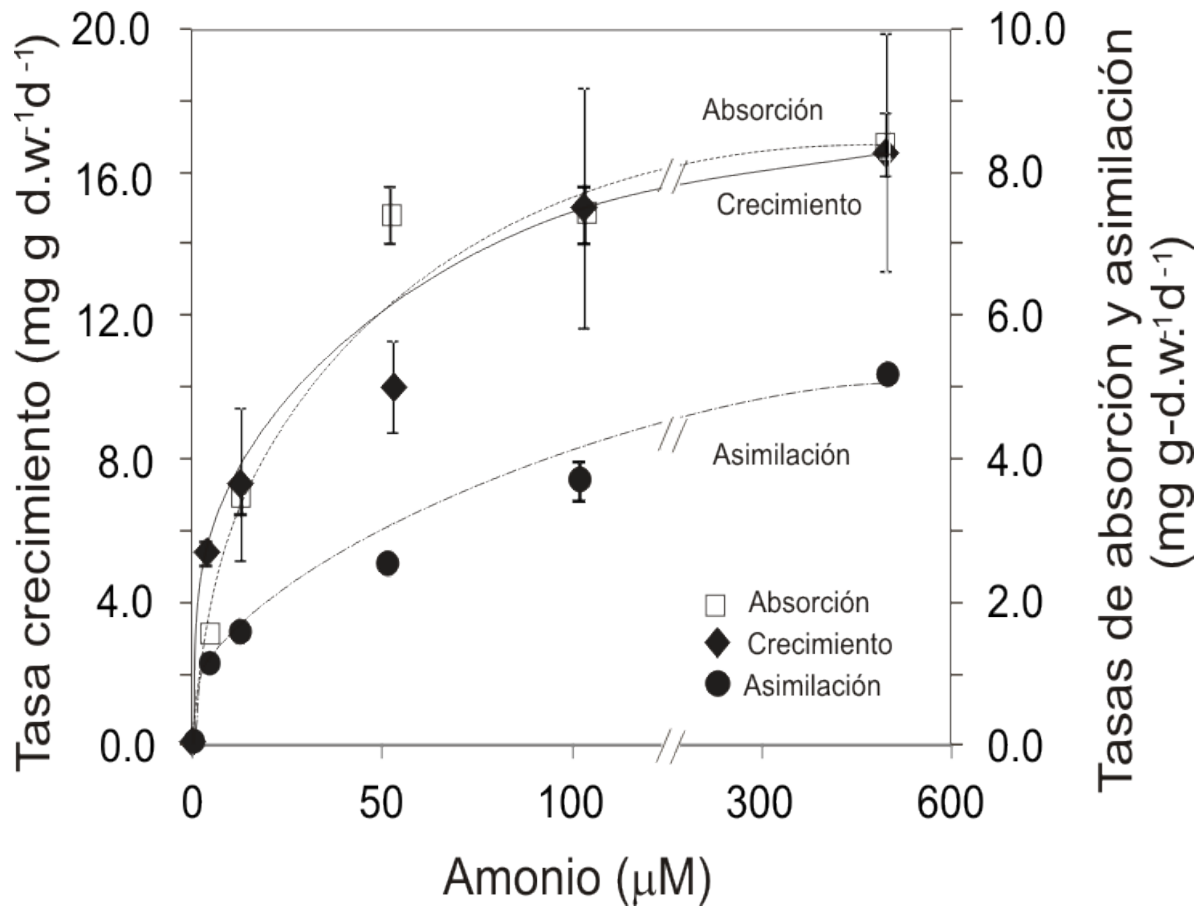


Figura 28. Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga *U. lobata* expuesta a diferentes concentraciones de amonio.

#### 6.7.1.2.2. Nitrato

La tasa de crecimiento alcanzó su valor máximo con el tratamiento 4 con  $15.0 \pm 4.0$  mg N g  $dw^{-1} d^{-1}$ . De los tratamientos 1 al 3, duplicó su valor de 1.6 a 3.1, y hasta  $7.5$  mg N g  $dw^{-1} d^{-1}$  pero este valor no fue proporcional al incremento de la concentración (Figura 29). Al igual que con amonio, el contenido de N en el tejido algal decreció en el tratamiento 1 y en el control (alrededor del 16%) al finalizar el experimento, pero también se obtuvo mayor

cantidad de N (biomasa x contenido) al final respecto al inicial. Las tasas de crecimiento aumentaron entre los tratamientos 3 y 4 de  $10.4 \pm 4.3$  a  $15.1 \pm 4.0$  mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. El contenido de N de reserva en especímenes del tratamiento 3 fue mayor a los del tratamiento 2 e igual al del 4 ( $p < 0.05$ ).

La tasa de asimilación de nitratos promedió  $0.58 \pm 0.04$  mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en el tratamiento 1 y  $4.4$  mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en el tratamiento 4. El incremento entre los tratamientos 3 y 4 varió de  $3.2 \pm 0.18$  hasta  $4.4 \pm 0.36$  mg N g dw<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Estos valores fueron menores a los obtenidos con los mismos tratamientos de amonio.

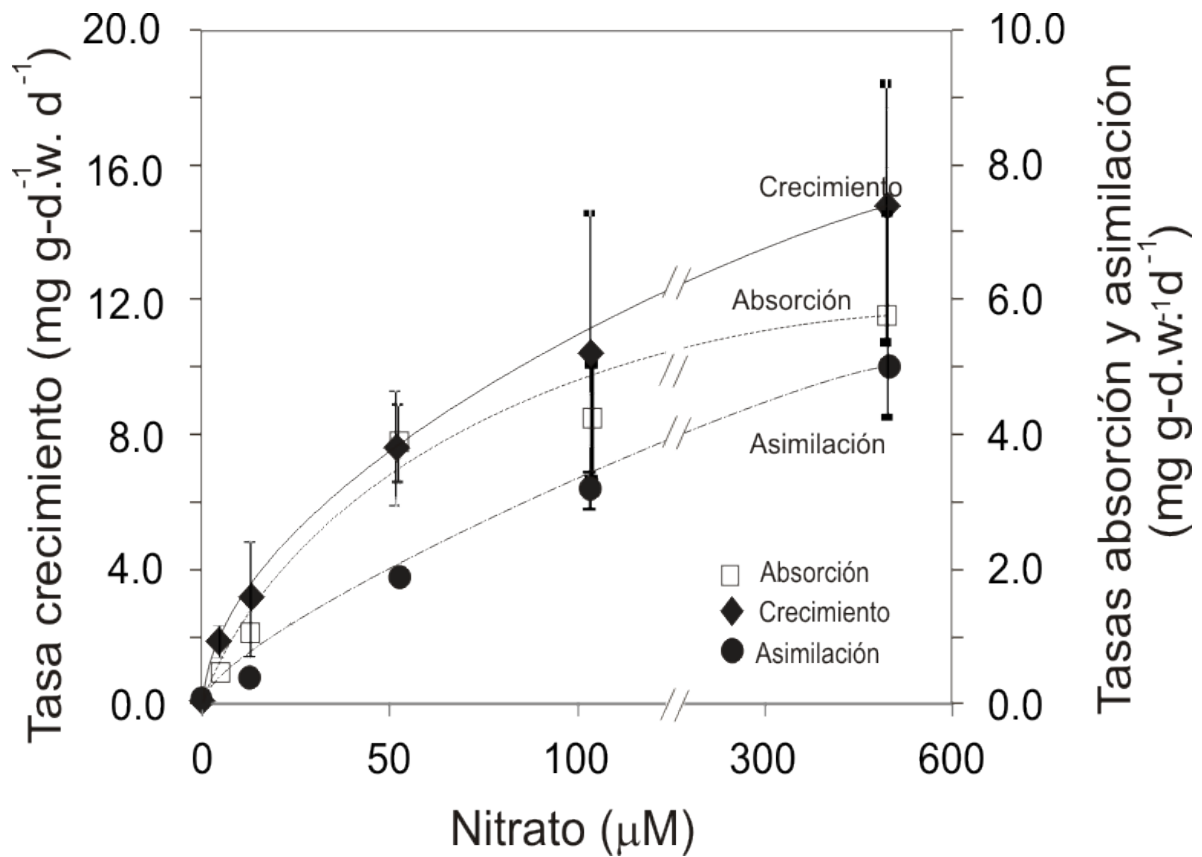


Figura 29. Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga *U. lobata* expuesta a diferentes concentraciones de nitrato.

#### 6.7.1.2.1.3. Nitrato de amonio

La tasa de crecimiento registró el máximo valor  $13.0 \pm 2.8 \text{ mg} \cdot \text{g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  con el tratamiento 4, en tanto que en los tratamientos 2 y 3 los valores fueron similares con  $11.1 \pm 3.9$  y  $11.6 \pm 4.1 \text{ mg} \cdot \text{g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  respectivamente (Figura 30). El valor máximo fue 5 veces mayor al valor obtenido en el control ( $2.5 \pm 1.4 \text{ mg} \cdot \text{g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Los valores similares en la tasa de crecimiento entre los tratamientos 2 al 4 señalan una tasa máxima a partir de la concentración de  $105.5 \mu\text{M}$ .

El contenido de N en el control y en el tratamiento 1, fueron menores que el valor inicial del alga, sin embargo, en los tratamientos 2 al 4 se observó un incremento máximo de  $3.5 \pm 0.28 \text{ g N g dw}^{-1}$ . Esto representó una acumulación de N del 35%. Estos resultados indican que aunque el suministro de N aumentó entre tratamientos, no fue así en el crecimiento.

La tasa de asimilación varió de  $1.4 \pm 0.08 \text{ mg N g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en el tratamiento 1 ( $25.5 \mu\text{M}$ ) a  $4.6 \pm 0.36 \text{ mg N g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en el tratamiento 4 ( $1,005.5 \mu\text{M}$ ). Los tratamientos 2 ( $105.5 \mu\text{M}$ ) y 3 ( $205.5 \mu\text{M}$ ) registraron valores muy similares de 3.6 y 3.7  $\text{mg N g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  respectivamente, lo que indica que al igual que en la absorción, se saturó la tasa de asimilación en el tratamiento 2 y que a pesar de continuar aumentando la concentración, el incremento ya no fue significativo. Si comparamos estos valores con los obtenidos al adicionar amonio y nitrato por separado, observamos que pueden ser comparables a las tasas obtenidas en los tratamientos 3, ( $102.5 \mu\text{M}$ ) tanto de amonio como de nitrato, pero el valor obtenido fue más cercano al tratamiento donde se adicionó amonio ( $3.9 \text{ mg N g dw}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Esta comparación es debido a que cuando se adicionó nitrato de amonio la cantidad de moles de N en la sal compuesta fue duplicada en relación a cada nutriente por separado.

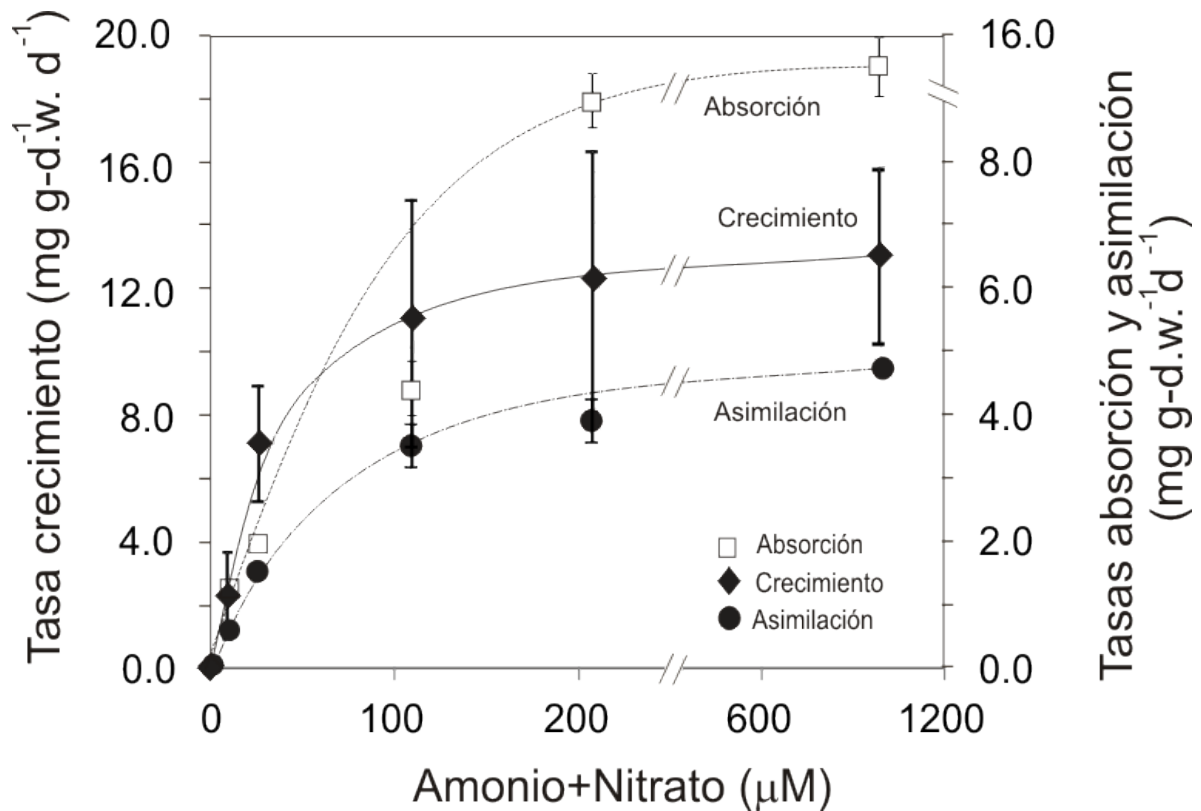


Figura 30. Valores promedio de las tasas de absorción, crecimiento y asimilación de N por la macroalga *Ulva lobata* expuesta a diferentes concentraciones de nitrato de amonio.

Después de calcular las tasas de crecimiento para cada una de las formas químicas a las que fue expuesta la especie *U. lobata*, se calcularon las tasas máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) siguiendo el procedimiento descrito por Pedersen (1996) y Pedersen y Borum (1997). A partir de los datos del contenido de N en *U. lobata* al final del experimento (Tabla 6) y las tasas de crecimiento, se estimaron, la cuota de subsistencia ( $N_0$ ) y el contenido crítico de N en el tejido ( $N_C$ ), los resultados se muestran en la Figura 31.



Tabla 6. Contenido de nitrógeno en los especímenes de macroalgas expuestos experimentalmente a diferentes formas químicas y concentraciones de nitrógeno.

Tratamiento n=16	Contenido N alga (mg g <sup>-1</sup> dw <sup>-1</sup> )
Concentración (μM)	
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
Control	18.5±2.5
12.5	19.1±3.0
52.5	23.9±2.0
102.5	25.8±2.7
502.5	39.5±2.2
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
Control	21.2±2.8
13	18.9±1.2
53	25.6±1.7
103	31.0±1.8
503	29.0±2.4
N-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
Control	22.0±3.1
25.5	19.9±2.5
105.5	31.9±2.9
205.5	31.8±2.7
1005.5	35.1±2.8
Alga inicial	23.7±2.7

La tasa promedio de máximo crecimiento ( $\mu_{max}$ ) para especímenes expuestos a amonio fue de  $0.30 \pm 0.05$  % dw d<sup>-1</sup> y de  $0.06 \pm 0.03$  % dw d<sup>-1</sup> para nitrato. El contenido de N mínimo ó

cuota de subsistencia ( $N_Q$ ), para garantizar que el alga *U. lobata* crezca, fue de 1.6% y el contenido de N necesario para sostener el crecimiento máximo ó cuota crítica ( $N_c$ ) fue estimado en 2.7% (Figura 31). Basado en lo anterior, el N requerido para el sostenimiento del máximo crecimiento fue de  $581 \mu\text{M de N g}^{-1} \text{ dw d}^{-1}$  (rango de  $504\text{-}717 \mu\text{M de N g}^{-1} \text{ dw d}^{-1}$  equivalente a  $7.1\text{-}10.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw d}^{-1}$ ).

En nuestros experimentos, los especímenes expuestos a las máximas concentraciones de N disponible, presentaron contenidos de hasta 3.1-3.95%. Esto significa que las algas contenían más N del requerido para sostener su máximo crecimiento de 2.7%. Este contenido adicional es interpretado por Pedersen y Borum (1997) como N de reserva. Basado en los mismos autores, estimamos la capacidad de almacenamiento de N por *U. lobata* en función del tiempo que potencialmente pudieran estar sin consumir N. Por ejemplo, se observa que con el máximo de N adquirido por el alga podría sostener su crecimiento máximo por 1.3 días, y hasta por 6 días con un crecimiento medio. Pero si consideramos las tasas de crecimiento más bajas observadas en nuestros experimentos ( $sgr=0.04 \% \text{ d}^{-1}$ ), entonces el alga pudiera sostenerse hasta por 23 días en caso de no recibir más N. Cuando el suministro de N es mayor al requerido por la macroalga, éste puede ser absorbido y guardado dentro del citoplasma o en otros organelos de la célula en espera de ser asimilado. Esto ha sido observado en especies del género *Ulva*, las cuales tienen habilidad para absorber y acumular N suministrado en forma de pulsos (Fujita, 1985).

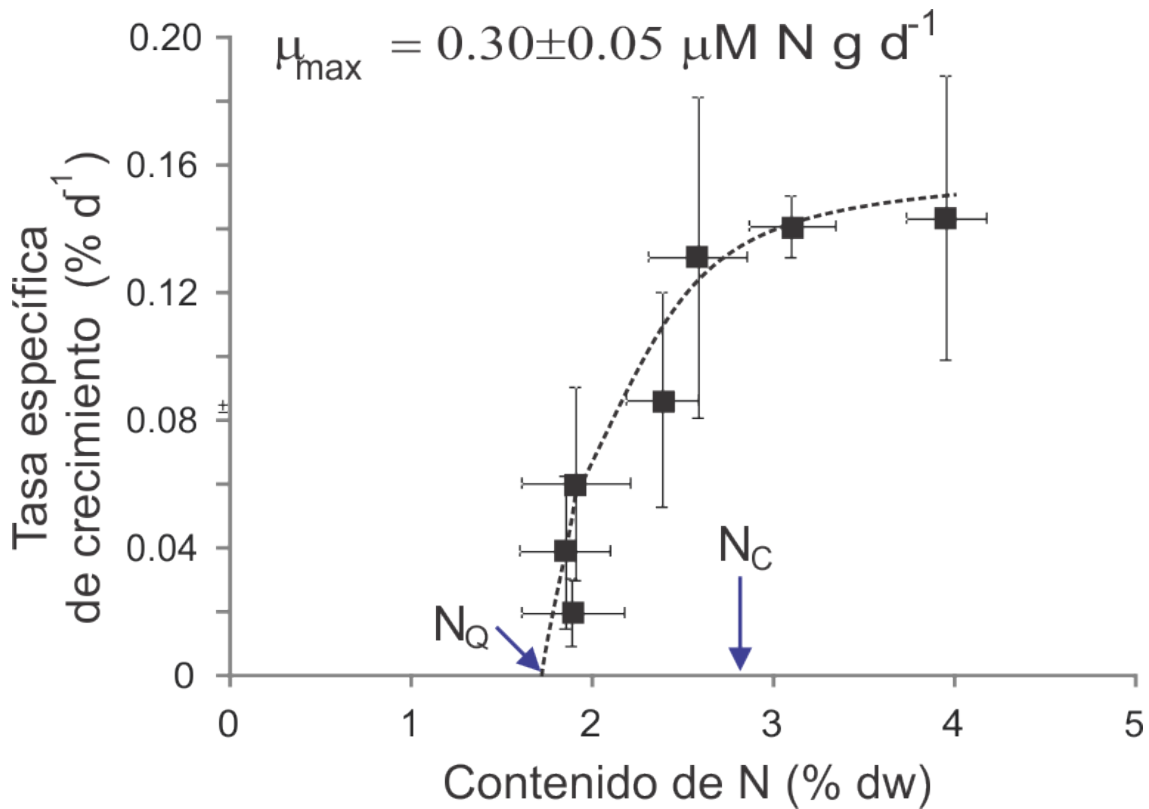


Figura 31. Relación entre la tasa específica de crecimiento y el contenido de N en *U. lobata* expuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno. Gráficamente se estimó el valor de  $N_Q$ . A partir de la ecuación ( $\mu = \mu_{\max} (1 - N_Q/N)$ ) se calculó  $\mu_{\max}$ . El contenido crítico de N ( $N_C$ ), que representa el contenido de N a la cual se alcanza el máximo crecimiento fue estimado gráficamente como el intercepto de la curva asintótica.

Los valores registrados para  $\mu_{\max}$  en nuestros experimentos fueron menores a los obtenidos por Pedersen et al. (1997) con *U. lactuca*, pero resultaron superiores a los valores para otras especies de algas verdes y rojas de morfologías más delicadas de los géneros *Cladophora*, *Chaetomorpha* y *Ceramium* (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla comparativa entre las tasas máximas de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), cuotas de subsistencia ( $N_Q$ ), concentraciones críticas de N en el tejido ( $N_c$ ) y N requerido ( $N_{\text{req}}$ ) para sostener el crecimiento bajo condiciones de laboratorio en *U. lobata* y otras especies de macroalgas.

Especie	$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	$N_Q$ (% N dw)	$N_c$ (% N dw)	$N_{\text{req}}$ ( $\mu\text{molN g}^{-1}$ dw d <sup>-1</sup> )
<i>Ulva lactuca</i> <sup>a</sup>	0.51 (0.48-0.55)	0.71(0.66-0.76)	2.2 (1.3-2.9)	795 (595-987)
<i>Chaetomorpha linum</i> <sup>a</sup>	0.22 (0.18-0.26)	0.38 (0.37-0.39)	1.2(0.96-1.4)	179(143-229)
<i>Cladophora sericea</i> <sup>a</sup>	0.25(0.19-0.31)	0.68(0.57-0.79)	2.1(0.93-3.31)	364(157-607)
<i>Codium fragile</i> <sup>a</sup>	0.08(0.07-0.09)	0.52(0.40-0.64)	1.6(0.45-2.6)	96(25-169)
<i>Fucus vesiculosus</i> <sup>a</sup>	0.039(0.003-0.13)	0.55(0.35-0.64)	1.7(1.5-4.4)	48(95-219)
<i>Ulva lobata</i> <sup>b</sup>	0.30±0.05	1.6	2.7	578 (504-717)

<sup>a</sup>Pedersen y Borum (1997), <sup>b</sup>este estudio

En experimentos de laboratorio la absorción del N es reflejada en un incremento de las tasas de crecimiento, principalmente en especies de rápido crecimiento (género *Ulva*), siendo menor en especies de lento crecimiento y/o con una menor capacidad de acumular N (Teichberg et al., 2008). La acumulación de N ocurre cuando el suministro excede a la tasa de crecimiento (Fong et al, 2001, 2003, 2004; Fujita 1995), sin embargo, intervienen otros factores ambientales.

En relación con la preferencia hipotética de una forma química de N sobre otra durante la absorción y/o posterior asimilación por el alga, comparamos las tasas de asimilación medidas para amonio, nitratos y su sal combinada. Hipotéticamente la macroalgas asimilan más rápidamente amonio que nitrato, debido a que el nitrato requiere más gasto energético que el amonio por el proceso de reducción (de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y después a  $\text{NH}_4^+$  hasta

finalizar en  $\text{NH}_2^-$ ) antes de entrar al metabolismo (Naldi y Wheeler, 2002; Pedersen y Borum, 1997). La anhidrasa carbónica externa (CAext) está implicada en el costo energético de los mecanismos de concentración de carbono (CCMs), y en una situación de altas concentraciones de nitratos, la demanda energética puede ser aumentada por mecanismos de competición tales como la asimilación (Gordillo et al., 2001c). Por otro lado, una mayor tasa de absorción de amonio implica un mayor transporte de  $\text{N-NH}_4^+$  desde la columna de agua, y a través de la membrana celular hacia el citoplasma de donde será asimilado para la formación de diferentes compuestos orgánicos (McGlathery et al., 1996).

Las diferencias morfológicas y fisiológicas que presentan las algas tiene un rol importante en la absorción de N, y en su posterior asimilación, por tanto, las macroalgas pueden diferir en la preferencia y habilidad para absorber las formas químicas del N. Pero también aplica en el sentido inverso, en que el suministro de la forma química de N puede alterar la fisiología de la macroalga (Peckol et al., 1994; Valiela et al., 1997). Por ejemplo, se ha observado que la habilidad de un alga para asimilar nitrato, depende de los niveles de la nitrato reductasa, que varían entre las diferentes especies, siendo más eficiente en algas verdes (Teichberg et al., 2007). Sin embargo, la síntesis y activación de esta enzima es regulada por el suministro de nitrato (Solomonson y Barber 1990; Crawford 1995), aunque su actividad también puede ser controlada por el amonio y otros factores externos como la luz (Solomonson y Barber 1990; Crawford, 1995; Kudo et al., 2000; Milligan y Harrison 2000).

Experimentos con otras especies de algas verdes oportunistas (*Ulva intestinalis*) han mostrado habilidad para absorber y asimilar simultáneamente amonio y nitrato (Björnsäter y Wheeler, 1990; Lotze y Schramm, 2000; Cohen y Fong 2004).

### **6.7.2. Determinación del fraccionamiento isotópico**

A partir de los cambios en las señales isotópicas, fue posible determinar la fracción de N nuevo en el alga. Esta fracción se calculó mediante una ecuación de mezcla binaria usando los datos isotópicos medidos en el alga al inicio y al final, y se compararon con la señal isotópica del N disponible en el agua de los experimentos. A partir de estos datos se estimó la fraccionación isotópica ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) como la diferencia entre la señal de  $\delta^{15}\text{N}$  estabilizada en el alga y la de la fuente de exposición (N disponible en el agua). Cabe mencionar que no se observaron diferencias en el factor de discriminación estimado en especímenes expuestos a diferentes formas químicas de N, pero si varió en función de las concentraciones. En los tratamientos de bajas concentraciones ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ) se presentaron valores más altos que los encontrados en concentraciones altas ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ). Esto es atribuido a que a esas concentraciones no se alcanzó la estabilidad isotópica, definida como la constancia en la señal en el tiempo. Esto significa que faltaron días de exposición. Basado en lo anterior, consideramos solamente los experimentos a altas concentraciones para medir el valor de  $\Delta^{15}\text{N}$ , el cual fue estimado en un rango de 1.1 a 2.72‰.

Se ha observado que en algunas especies de algas verdes la fraccionación isotópica tanto para amonio como para nitratos es insignificante cuando se suministra el nutriente en cantidades suficientes (Cohen y Fong, 2004). Sin embargo, Kaldy (2011) encontró fraccionación en la exposición de *Ulva* spp. de al menos 3‰ para amonio pero sin

fraccionación para nitrato durante la absorción del nutriente. Este proceso responde a la rapidez con que los átomos de carbono son acumulados en el alga cuando el N es incorporado como  $\text{NH}_4^+$  que como  $\text{NO}_3^-$ , además, la composición isotópica del N disponible no afecta en la preferencia de la especie química de N.

A partir de los cambios en las señales isotópicas, pudimos calcular también las tasas de recambio metabólico media ( $\tau$ ), definido como el tiempo requerido para la renovación del N en el tejido del alga, según la concentración de exposición para ambas especies químicas. Se observó que los tiempos de recambio metabólico del N variaron en función de la concentración del nutriente (Figura 32), disminuyendo el tiempo conforme aumenta la concentración. Se estimó un  $\tau=6.0$  días para las algas sometidas a la máxima concentración de  $502.5 \mu\text{M}$  y de hasta 28 días en algas expuestas a  $12.5 \mu\text{M}$ . Para el nitrato se calculó un  $\tau=8$  días para  $503 \mu\text{M}$  y 23 días para  $13 \mu\text{M}$ . Se observó que  $\tau$  para el amonio es menor a la del nitrato a diferentes concentraciones, sin embargo, debido a la alta variabilidad y basado en una prueba de t student, no hay diferencias significativas para ambas formas químicas ( $p<0.05$ ).

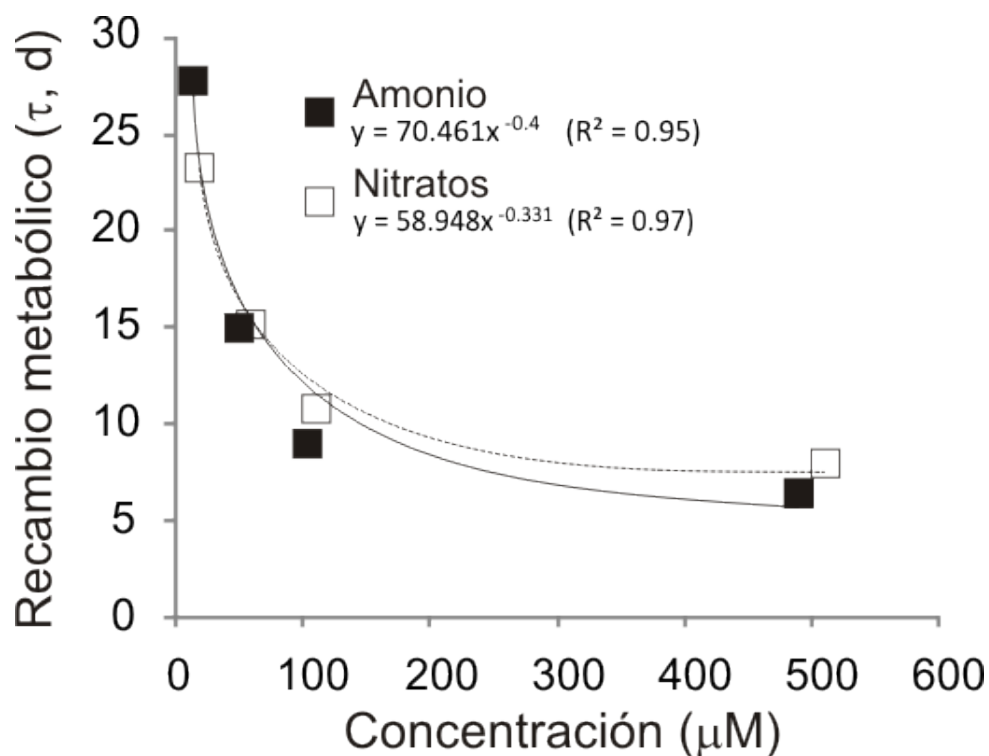


Figura 32. Tasas de recambio metabólico de N en los especímenes de *U. lobata* sometidos experimentalmente a diferentes formas químicas y concentraciones de nitrógeno.

### 6.7.3. Variación de la señal $\delta^{15}\text{N}$ de los especímenes de *U. lobata* recolectados en el campo y determinación de la tasa de recambio metabólico en base a experimentos de laboratorio.

Especímenes de *U. lobata* fueron recolectados desde el hábitar lagunar-marino hasta el marino en el sistema lagunar Urías. En general, la señal  $\delta^{15}\text{N}$  varió en un rango de 9.6 a 17.7‰.

La variación espacial registró valores extremos en sitios del hábitar lagunar-marino (km 14.52 y 15.62) de  $10.8 \pm 1.6\text{‰}$  a  $16.7\text{‰}$ , respectivamente (Figura 33a), mientras que la variación temporal mostró la señal más baja a finales de marzo/2010 con  $11.6 \pm 1.01\text{‰}$ , y la más alta en octubre/2009 con  $16.4 \pm 0.98\text{‰}$  (Figura 33b).



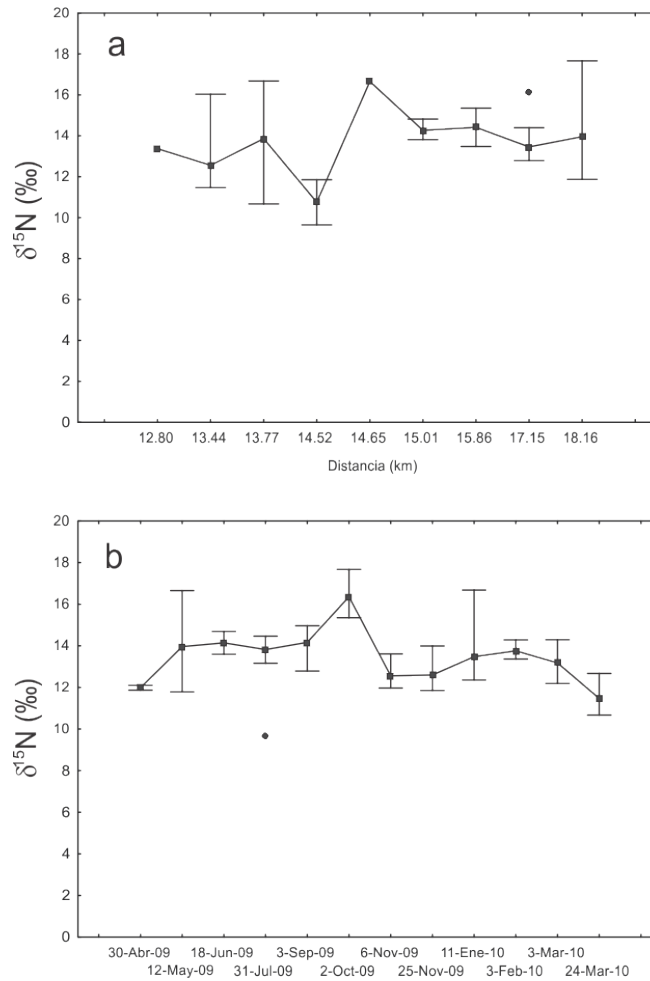


Figura 33. Variación espacial (a) y temporal (b) de la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de los especímenes de *U. lobata* recolectados en el sistema Urías.

La variación espacial de la señal  $\delta^{15}\text{N}$ -NID de las fuentes obtuvo el valor más alto en sitios del hábitat lagunar-marino (19.1‰), con tendencia a disminuir su valor hacia el hábitat marino (Figura 34a). En tanto, que la variación temporal registró su más alto valor en octubre 2009, seguido del obtenido en mayo 2009 con alta variabilidad (Figura 34b). Se observó que las señales variaron en función de la concentración del nutriente. Por ejemplo, las fuentes variaron de 13.9 a 14.5‰ en marzo 2010 y la concentración de amonio varió de 28.7 a 45.8  $\mu\text{g L}^{-1}$  mientras que el nitrato de 19.0 a 25.7  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para el mes de octubre la

señal de la fuente se incrementó a 16.4‰ y la concentración de amonio de 30.1 a 134.4  $\mu\text{g L}^{-1}$  y el nitrato de 49.9 a 87.8  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Este incremento en las señales del NID resulta del aumento de las concentraciones de amonio como forma dominante, ya que las fuentes de N, que recibe el sistema tienen valores de su señal  $\delta^{15}\text{N}$  de  $8.0\pm 1.0$  a  $19.1\pm 0.68$ ‰ para amonio y de  $-13.8\pm 3.9$  a  $3,7\pm 1.8$ ‰ para nitrato.

Como se sabe las algas absorben primeramente el amonio disponible, en este caso es posible que la absorción de amonio con señal más alta, al mezclarse con la señal baja de nitrato proveniente del medio marino haya influenciado en esta variación de la señal tanto del alga como de la fuente, por lo que las variaciones espacio-temporal de las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de *U. lobata* se relacionan con los cambios de señales de las fuentes y la dominancia de las mismas.

Sin embargo, una revisión más detallada de los especímenes en base a su fase de desarrollo (juvenil a adulto) en los diferentes muestreos se encontró que en el hábitat marino la diferencias entre la señal  $\delta^{15}\text{N}$  de los especímenes juveniles a adultos entre dos muestreos contínuos fueron de 4.2 a 4.9‰. Por ejemplo, juveniles recolectados el 30/abril/2009 en el hábitat marino, registraron valores  $\delta^{15}\text{N}$  de 11.9 a 12.1‰ en el siguiente muestreo (12/mayo/2009), los especímenes adultos aumentaron su señal a 16.2‰, lo que representó un incremento de 4.2‰. En tanto que los especímenes juveniles recolectados en este mismo tiempo alcanzaron señales entre 14.0 y 14.4‰ (Tabla 8). Al revisar las concentraciones del N inorgánico medidas en esta última fecha se observó un incremento de amonio de 43.3. a 220-  $\mu\text{g L}^{-1}$  y un aumento de la señal de la fuente de 10.8 a 19.2‰ (Tabla 8). Con el apoyo de los resultados obtenidos en la exposición de *U. lobata* a

diferentes concentraciones de amonio y nitrato en el laboratorio, y mediante una regresión lineal con las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  (Figura 35), calculamos las tasas de recambio metabólico medio para los especímenes de campo.

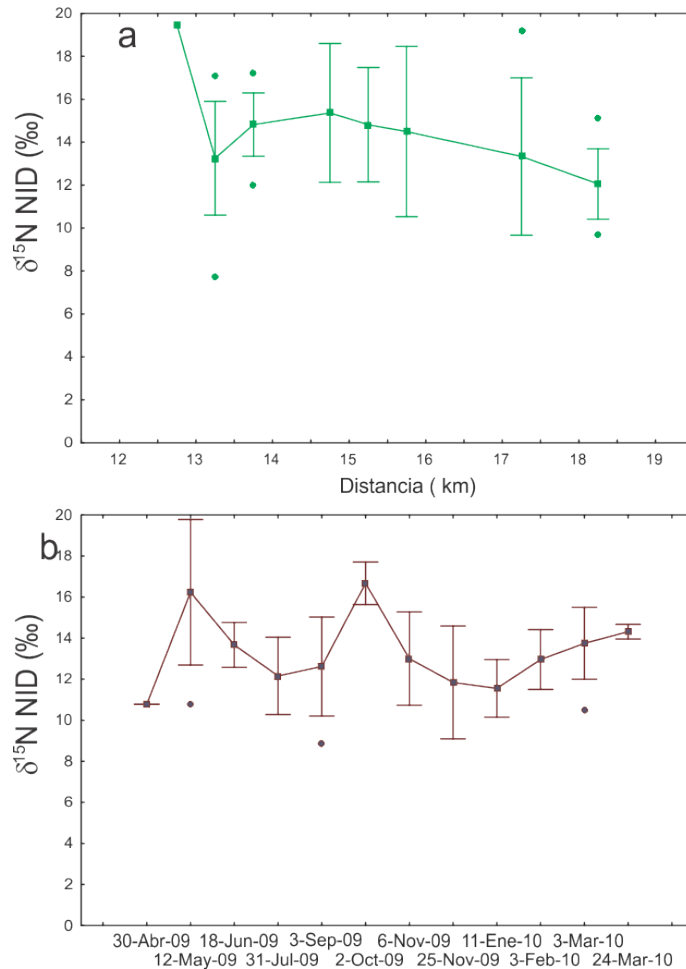


Figura 34. Variación espacial (a) y temporal (b) de la señal  $\delta^{15}\text{N-NID}$  disponible en el agua del sistema Urías, donde se recolectaron los especímenes de *U. lobata*.

En este caso, se calculó el tiempo requerido para que los especímenes adultos arriba descritos igualen a la señal de la fuente (19.2‰) en caso de que esta no cambie, obteniendo un tiempo de 38 días cuando reciben un pulso de amonio de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

En este sentido, los experimentos de laboratorio nos sirven de apoyo para conocer parámetros que no es posible medir directamente en el campo, como en este caso, predecir el tiempo en el cual el alga puede alcanzar la señal de la fuente en un sitio de muestreo.

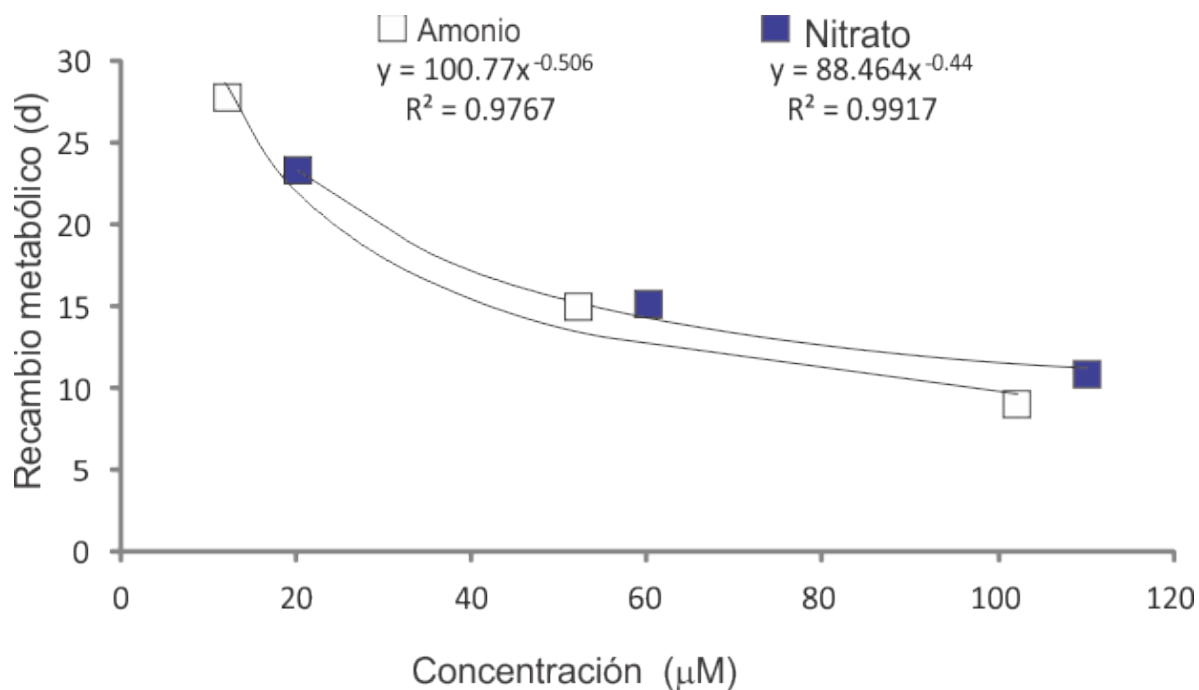


Figura 35. Tasa de recambio metabólico medio calculadas para los tratamientos 1 al 3 de amonio y nitrato en condiciones experimentales y utilizadas para calcular la tasa de recambio metabólico en especímenes de *U. lobata* en el campo.

Tabla 8. Valores de las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de especímenes juveniles y adultos de *U. lobata* recolectados en los hábitat lagunar-marino y marino de Urías, y valores de la concentración del NID (amonio+nitrato) y la señal  $\delta^{15}\text{NID}$ , de los sitios de recolecta.

Hábitat	Fecha	Fase	Señal $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Dif $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\delta^{15}\text{NID}$ (‰)	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\delta^{15}\text{NID}$ (‰)
LM	18-jun-09	Juvenil	14.7		114.5	66	14.4	114.5	66	14.4
	31-jul-09	Adulta	13.8	-0.9	47	34.3	13.5	47	34.3	13.5
	31-jul-09	Juvenil	9.6-14.5 (12.05±3.46)		61.7-101.3	9.8-69.5	13.7-13.4	4.4-7.2	0.7-5.0	13.7-13.4
	03-sep-09	Adulta	15	5.4	155.4	28.5	13.6			
LM										
	3-sept-09	Juvenil	13.8-14.7 (14.25±0.64)		63.4-89.1	46.5-61.5	13.5-13.7	4.5-6.4	3.3-4.4	13.5-13.7
	02-oct-09	Juvenil	16-16.7 (16.65±0.07)	2.9	73.7	49.9-64.8	17.1-17.2	73.7	3.7-4.6	17.1-17.2
	06-nov-09	Juvenil	12.1-13.3 (12.7±0.85)	-2.7	29.6-34.6	12.8-36.3	12.0-15.4	2.1-2.5	0.9-2.6	12.0-15.4
LM	03-feb-10	Juvenil	13.4-14.3 (13.85±0.64)		16.4-25.6	33.5-49.3	11.1-14.6	1.2-1.8	2.4-3.5	11.1-14.6
	03-mar-10	Adulta	13.2-13.4 (13.3±0.14)	0.9	6.3-29.1	11.1-43.1	13.8-15.8	0.5-2.1	0.8-3.1	13.8-15.8
M	30-abr-09	Juvenil	11.9-12.1 (12.0±0.14)		43.3	29.7	10.8	3.09	2.12	10.8
	12-may-09	Adulta	16.2	4.3	220	15.6	19.2	15.71	1.11	19.2
	12-may-09	Juvenil	14.0-14.4 (14.2±0.28)	2.5	220	15-29.7	10.8-19.2	14-29	1.1-2.1	10.8-19.2
M	18-jun-09	Juvenil	13.6		41	11.2	12.9	2.93	0.80	12.9
	31-jul-09	Juvenil	13.2-14.4 (13.8±0.84)	0.8	4.6-31.5	3.3-31.2	9.7-10.5	0.3-2.3	2.23	9.7-10.5
	03/spet/09	Adulta	14.4	1.2	155.4	28.5	13.6			
	03-sep-09	Juvenil	12.8-14.9 (13.85±1.48)		25-155.4	28.5-34.5	8.9-13.6	1.8-11.1	2.0-2.5	8.9-13.6
	02-oct-09	Adulta	15.4-17.7 (16.55±1.62)	4.9	30-134.4	63.6-87.8	15.1-17.3	2.1-9.6	4.5-6.3	15.1-17.3
M	03-feb-10	Juvenil	13.6-13.9		4.5	22.8-25	12.8-13.3	4.5	1.6-1.8	12.8-13.3
	03-mar-10	Adulta	12.4-14.3	0.7	37.7-42.6	26.6-28.8	10.5-14.3	2.7-3.0	1.9-2.1	10.5-14.3

## 7. CONCLUSIONES

- Con base en las respectivas señales isotópicas  $\delta^{15}\text{N}$ , se identificaron cinco fuentes de N derivadas de las actividades humanas que entran al sistema lagunar Urías: agricultura ( $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^- = 2.1 \pm 0.7\text{‰}$ ), acuicultura ( $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+ = 8.0 \pm 1.0\text{‰}$ ), desechos domésticos ( $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+ = 16.1 \pm 0.3\text{‰}$ ), y actividades industriales del procesamiento de productos pesqueros ( $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+ = 19.1 \pm 0.68\text{‰}$ ) y la atmosférica constituida por una mezcla de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  con dos señales contrastantes de  $11.8 \pm 4.3\text{‰}$  para el  $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$  y  $-13.8 \pm 3.9\text{‰}$  para el  $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ . Además la entrada de una fuente natural de nitratos de origen marino ( $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^- = 3.7 \pm 1.8\text{‰}$ ). Por otro lado, se reconoce la entrada de N como nitratos a través de las aguas subterráneas, que sin embargo, no fueron consideradas en este estudio.
- Las variaciones de temperatura y salinidad registradas en el sistema Urías responden a cambios climáticos estacionales para aguas tropicales y subtropicales, la máxima temperatura se registró en agosto y la mínima en enero, con aumentos de salinidad en secas cálidas y descensos en lluvias. Variaciones registradas en sitios localizados del sistema fueron atribuidos a condiciones locales como profundidad, tiempo de residencia, influencia de la planta termoeléctrica y zonas de manglar.
- Las formas químicas de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en el sistema registraron variaciones que responden a descargas puntuales de múltiples fuentes de nitrógeno previamente mencionadas y que varían en intensidad a lo largo del año. El NID representó menos del 30% del nitrógeno disuelto total (NDT) medido en todo el sistema, siendo dominado por el NOD con  $>70\%$  del NDT. De acuerdo a la escala de Ignatiades (1992) el sistema se encuentra eutrofizado.

- Mediante un modelo de mezcla de fuentes acoplado a los procesos biogeoquímicos que modifican la señal isotópica del N disponible en el agua, se estimaron las señales del  $\delta^{15}\text{N-NID}$  para sitio y evento de muestreo. El modelo de predicción presentó un elevado coeficiente de determinación ( $R^2=0.76$ ) y no se encontró contribución significativa de la temperatura, salinidad y otras variables ambientales, a la variabilidad de la señal. La señal isotópica del NID en el agua fue mejor explicada por el nitrato ( $r=0.59$ ;  $p<0.05$ ) que por el amonio ( $r=0.38$ ).
- La variación espacial y temporal de la señal  $\delta^{15}\text{N-NID}$ , registró valores más bajos en la cabecera del sistema y más altos en la parte lagunar-marina. Los valores bajos de  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  son atribuidos a la entrada de lixiviados terrestres, del lavado de suelo agrícolas y de las áreas urbanas y suburbanas que constituyen la micro-cuenca del sistema Urías. El aporte de esta fuente, predominantemente atmosférica y agrícola, se intensifica en lluvias. El aumento de las señales en la parte central es atribuido a las descargas de las aguas residuales domésticas y del procesamiento de productos pesqueros con señales altas de  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  que se mantienen constantes a lo largo del año por ser fuentes continuas.
- La caracterización de la flora ficológica del sistema Urías permitió conocer la diversidad de especies y su variación espacio-temporal. En total se recolectaron 45 especies de macroalgas pertenecientes a las Divisiones; Chlorophyta (17 spp.), Rhodophyta (22 spp.) y Phaeophyta (6 spp.). Las especies identificadas en este sistema se caracterizan por ser tolerantes a un amplio rango de condiciones ambientales (e.g. temperatura, salinidad y nutrientes). De este grupo de especies, se

seleccionaron las más conspicuas y ubicuas para análisis de la variabilidad isotópica y se seleccionó a *Ulva lobata* para experimentos de laboratorio.

- La señal  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas, con un rango de 0.41 a 22.67‰, presentó un coeficiente de variación de 4 a 42% y una alta variabilidad interespecífica (8 a 14‰) e intraespecífica (9 a 11‰). De manera general, esta variabilidad se atribuyó en primer término a las variaciones espacio-temporales de las múltiples fuentes de N que recibe el sistema.
- Se registraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre especímenes de las mismas especies de macroalgas recolectadas en la misma época pero en diferentes hábitats. Estas diferencias son atribuidas a la influencia de la fuente dominante en cada sitio del sistema aunado a los procesos biogeoquímicos que modifican las señales de las fuentes en el espacio y el tiempo. Estos resultados validan la hipótesis 2 que plantea encontrar diferencias en las señales  $\delta^{15}\text{N}$  de las mismas especies expuestas a diferentes fuentes y valida la premisa del uso de isótopos en macroalgas para identificar fuentes de N.
- Se registraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre especímenes de las mismas especies recolectadas en el mismo hábitat pero en diferente época climática. Por ejemplo: *C. sertularioides*, *D. dichotoma* y *P. pacifica* recolectadas en el hábitat lagunar-marino, obtuvieron señales más bajas en lluvias que en el resto de las épocas climáticas. Además, se observaron diferencias significativas entre diferentes especies recolectadas en el mismo hábitat y época (bajo la misma fuente y condición). Estos resultados invalidan la hipótesis 3 que plantea no encontrar diferencias significativas entre las especies de macroalgas que habitan en un mismo



sitio expuestas a la misma fuente. Esta variabilidad es atribuida a características de las propias especies como su preferencia por la forma química de N disponible, la cinética de absorción, la capacidad para acumular N, y a la fraccionación isotópica. Además, las diferencias pueden ser explicadas en términos de alcanzar el equilibrio isotópico a diferentes tiempos debido a las diferencias en las tasas de recambio metabólico de N, como fue evidenciado en el estudio experimental.

- Las especies *B. radicans*, *B. pennatula* y *D. dichotoma*, colectadas principalmente en el ambiente lagunar, mostraron una alta variabilidad estacional, en respuesta a los cambios en las señales del N en este hábitat. Las especies *C. sertularioides*, *U. intestinalis* y *G. vermiculophylla*, distribuidas ampliamente desde el ambiente lagunar hacia el lagunar-marino, también mostraron una amplia variabilidad temporal de sus señales  $\delta^{15}\text{N}$ . Estos cambios se deben al ingreso de fuentes estacionales y a la intensificación de los procesos biogeoquímicos modificando las señales isotópicas en el agua. Por otro lado, otras especies recolectadas predominantemente hacia el ambiente marino como *G. filicina*, *U. flexuosa* y *U. lobata*, mostraron muy poca variabilidad temporal. Esto se debe a una estabilidad de las señales a lo largo del año debido a los procesos de mezcla que se realizan hacia esta parte del sistema.
- Se corrieron diferentes modelos de ajuste para encontrar aquel que explicara mejor los valores encontrados en el alga, desde el más simple basado en las señales isotópicas de la fuente y concentraciones del N disponible en agua ( $\delta^{15}\text{N}\text{-Alga} = 0.6031[\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}] + 4.5156$ ;  $R^2 = 0.33$ ;  $n=730$ ), aquel que considera los efectos simples de factores como especie, hábitat y época ( $6.97 + \text{Match}[\text{Season}] +$

Match[Specie] +  $1.7 \times 10^{-3}[\text{NH}_4^+] - 5.0 \times 10^{-3}[\text{NO}_3^-] + 0.17[\delta^{15}\text{N-NH}_4^+]\text{fuente} + 0.31[\delta^{15}\text{N-NO}_3^-]\text{fuente}$ ;  $R^2 = 0.51$ ;  $n=730$ ), hasta uno más complejo que considera los efectos simples y combinados con una  $R^2$  de 0.65 (Modelo 3). En ningún modelo las variables físicas de temperatura, salinidad y precipitación fueron parámetros con efectos significativos.

- En relación a la contribución relativa de las fuentes a la señal global del  $\delta^{15}\text{N}$  en las macroalgas, se encontró que el depósito atmosférico (que incluye el lavado de suelos agrícolas) contribuye con un 11-34% mientras que los desechos domésticos con 5-12%, y la acuícola con 3-7%. El resto del N no fue posible identificarlo debido que son mezclas complejas con señales traslapadas de amonio (derivadas de efluentes domésticos, acuícolas y del procesamiento de productos) que contribuyen entre 15-47% y la de nitratos (derivados del depósito atmosférico y de la entrada de agua marina) contribuye entre 20-40%.
- Los resultados experimentales de la exposición de *U. lobata* mostraron tasas de absorción, de crecimiento y de asimilación más altas para amonio que para nitrato para una misma concentración y tiempo de exposición. Todas las tasas se incrementan con la concentración de ambas formas de N, siguiendo un modelo cinético tipo Michaelis-Menten. Las estimaciones de las tasas de absorción dependen del tiempo de exposición, mayores para experimentos de corto plazo (<1 h).
- Basado en un análisis de los parámetros de crecimiento y contenido de N determinados bajo condiciones de laboratorio, la tasa máxima de crecimiento para *U. lobata* fue  $\mu_{\text{max}} = 0.30 \pm 0.05 \text{ \% dw d}^{-1}$ , con un requerimiento mínimo para crecer

( $N_Q = 1.6\%$  N dw) y para sostener su crecimiento máximo ( $N_c = 2.7\%$  N dw). Comparativamente, los valores de  $\mu_{max}$  son menores a los reportados para otras especies de *Ulva*, pero mayores a otras especies de algas con morfología más delicada, tales como *Cladophora*, *Chaetomorpha* y *Ceramium*.

- Se estimó la fraccionación isotópica ( $\Delta^{15}N$ ) para *U. lobata* en un rango de 1.1 a 2.72‰. Estos resultados invalidan la hipótesis 4 que plantea que no habrá fraccionación en los especímenes expuestos experimentalmente a diferentes formas químicas y señales isotópicas. Basado en las variaciones isotópicas con el tiempo y la concentración, se calculó la tasa media de recambio metabólico ( $\tau$ , desde 6.5 a 28 d) en los especímenes de *U. lobata* expuestas a diferentes concentraciones y formas químicas de N. Independientemente de la forma química, los valores de  $\tau$  tasas fueron menores a mayor concentración, y a una misma concentración fueron menores para amonio que para nitrato.
- A pesar de que las macroalgas son buenos biomonitores para identificar fuentes de N, en sistemas estresados y complejos como el sistema lagunar Urías, donde concurren múltiples fuentes de N, procesos biogeoquímicos y una alta diversidad de especies de macroalgas, no es posible su uso ambiguo. Sino que para la identificación de fuentes de N mediante el uso de  $\delta^{15}N$  en macroalgas, se deben considerar otros factores además de las fuentes, como son: la selección de la especie, el hábitat, y la época climática, además de la influencia de los procesos biogeoquímicos y la discriminación isotópica.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abbott, I.A., Hollenberg, G.J. 1976. Marine algae of California. Stanford University Press. 827 pp.
- Agraz-Hernández, C.M. 1997. Reforestación experimental de manglares en ecosistemas lagunares estuarinos de la costa noroccidental de México. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 108 pp.
- Albertin, A., Sickman, J.O., Pinowska, A., Stevenson, R.J., Anderson, M. 2007. Stable isotope compositions of macroalgae, sediment and nitrate in Florida springs. Final Report. University of Florida. 33 pp.
- Álvarez-León, R. 1977. Estudio hidrológico de los esteros del Astillero, Urías y La Sirena adyacentes a Mazatlán, Sin., México, Tesis de Maestría. UNAM., UACPyP-CCH-CCML. 131 pp.
- Ahn, O., Petrell, R.J., Harrison, P.J. 1998. Ammonium and nitrate uptake by *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana* originating from a salmon sea cage farm. Journal of Applied Phycology, 10, 333-340.
- Barr, N.G. 2007. Aspects of nitrogen metabolism in the green alga *Ulva*; Developing an indicator of seawater nitrogen loading. Tesis Doctoral. University of Auckland, dept. of Environmental and Marine Science. 219 pp.
- Barrie, A., Prosser, S.J. 1996. Automated analysis of light-element stable isotopes ratio mass spectrometry. En: Boutton TW, Yamasaki (eds) Mass spectrometry of soils. Marcel Dekker, New York. pp. 1-46.
- Björnsäter, B.R., Wheeler, P.A. 1990. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth and tissue composition of *Ulva fenestrata* and *Enteromorpha intestinalis* (Ulvales, Chlorophyta). Journal of Phycology 26, 603-611.

- Brandes, J.A., Devol, A.H., Deutsch, C.A. 2007. New developments in the marine nitrogen cycle. *Chemical Reviews* 107, 577-589.
- Britton, A., Fisher, J. 2007. N:P stoichiometry of low alpine wetland: usefulness for biomonitoring and prediction of pollution impacts. *Biological Conservation* 132 (1-2), 100-108.
- Burford, M.A., Costanzo S.D., Dennison, W.C., Jackson, C.J., Jones, A.B., McKinnon, A.D., Preston, N.P., Trott, L.A. 2003 A synthesis of dominant ecological processes in intensive shrimp ponds and adjacent coastal environments in NE Australia. *Marine Pollution Bulletin* 46,1456-1469.
- Carballeira, C., Viana, I.G., Carballeira, A. 2012.  $\delta^{15}\text{N}$  values of macroalgae as an indicator of the potential presence of waste disposal from land-based marine fish farms. *Journal of Applied of Phycology*. DOI 10.1007/s10811-012-9843-z.
- Carballo, J.L., Olivarría, C., Garza-Osuna, T. 2002. Analysis of four macroalgal assemblages along the Pacific Mexican Coast during and after the 1997–98 El Niño. *Ecosystems*, 5, 749-760.
- Carpenter, R.C. 1990. Competition among marine macroalgae: a physiological perspective. *Journal of Phycology* 26, 6-12.
- Cohen, R.A., Fong, P. 2004. Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using  $^{15}\text{N}$  to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309, 60-67.

- Cohen, R.A., Fong, P. 2005. Experimental evidence supports the use of  $\delta^{15}\text{N}$  content of the opportunistic green macroalga *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) to determine nitrogen sources to estuaries. *Journal of Phycology*, 41, 287-293.
- Cole, M.L., Valiela, I., Kroeger, K.D., Tomasky, G. L., Cebrian, J., Wigand, C. McKinney, R.A., Grady, S.P., Carvalho da Silva M.H. 2004. Assessment of a  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic method to indicate anthropogenic eutrophication in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Quality* 33,124-132.
- Cole, M.L., Kroeger, K.D., McClelland, J.W., Valiela, I. 2005. Macrophytes as indicators of land-derived wastewater: application of a  $\delta^{15}\text{N}$  method in aquatic systems. *Water Resources Research* 41(1), 1-19.
- Comisión Nacional del agua (CNA). 2009. Organismo de Cuenca Norte. Servicio Meteorológico Nacional. Datos estadísticos climatológicos del Observatorio Meteorológico de Mazatlán, Sinaloa, México.
- Conservation Council of New Brunswick. 2004. Estimating human-derived nitrogen loading to New Brunswick estuaries. A simple export model. Conservation Council of New Brunswick Inc. 32 pp.
- Contreras, F., Castañeda, O., Torres, R., Gutiérrez, F. 1996. Nutrientes en 39 lagunas costeras mexicanas. *Revista de Biología Tropical* 44 (2), 417-425.
- Cortés-Altamirano, R., Núñez-Pasten, A. 1982. Composición, abundancia y distribución del fitoplancton del estero de Urías, Sin. México. I periodo primaveral 1980. *Revista Latinoamericana Microbiología* 24, 103-114.

- Cortés-Altamirano, R., Núñez-Pasten, A. 1984. Composición, abundancia y distribución del fitoplancton del estero de Uriás, Sin. México. III periodo de otoño 1980. *Revista Latinoamericana Microbiología* 26, 353-363.
- Costanzo, S.D., O'Donohue, M.J., Dennison, W.C. 2004. Assessing the influence and distribution of shrimp pond effluent in a tidal mangrove creek in north-east Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 514-525.
- Costanzo, S.D., Udy, J., Longstaff, B., Jones, A. 2005. Using nitrogen stable isotope ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) of macroalgae to determine the effectiveness of sewage upgrades: changes in the extent of sewage plumes over four years in Moreton Bay, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 51, 212-217.
- Crawford, N.M. 1995. Nitrate-nutrient and signal for plan growth. *Plant Cell* 7, 859-868.
- Cruz-López, A. Uso de macroalgas e isótopos estables de nitrógeno como fuentes de aporte de nutrientes. En proceso. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Dailer, L.M.L., Knox, R.S., Smith, J.E., Napier, M., Smith, C.M. 2010. Using  $\delta^{15}\text{N}$  values in algal tissue to map locations and potential sources of anthropogenic nutrient inputs on the island of Maui, Hawaii, USA. *Marine Pollution Bulletin* 60 (5), 655-671.
- Darley, W.M. 1987. *Algal biology. A physiological approach.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 168 pp.
- De la Lanza-Espino, G. 1994. Química de las lagunas costeras y el litoral mexicano. pp 127-198. En: *Lagunas costeras y el litoral mexicano.* De la Lanza-Espino, G. y Cáceres-Martínez, C. (eds.). Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz., B.C.

- De la Lanza-Espino, G., Flores-Verdugo, J.F. 1998. Nutrient fluxes in sediment ( $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^-$ ) in NW coastal lagoon Mexico associated with an agroindustrial basin. *Water Air and Soil Pollution* 107, 105-120.
- Del Rio-Chuljak, A. 2003. Concentración y aporte de nutrientes en el Estero de Urías (Puerto de Mazatlán): tiempo de residencia variabilidad estacional. Tesis de Licenciatura. Universidad, Autónoma de Sinaloa, FACIMAR. 64 pp.
- Deutsch, B., Voss, M. 2006. Anthropogenic nitrogen input traced by means of  $\delta^{15}\text{N}$  values in macroalgae: results from in-situ incubation experiments. *Science Total Environmental* 366, 799-808.
- Ferguson, A.J.P., Bradley D.E. 2010. Carbon and nitrogen cycling in a shallow productive sub-topical coastal embayment (Western Moreton Bay, Australia): The importance of pelagic–benthic coupling ecosystems 13, 1127-1144.
- Fong, P., Zedler, J.B., Donohoe, R.M., 1993. Nitrogen vs. phosphorus limitation of algal biomass in shallow coastal lagoons. *Limnology and Oceanography* 38 (5), 906-923.
- Fong, P.K., Boyer, E., Desmond, J.S., Zedler, J.B. 1996. Salinity stress, nitrogen competition and facilitation: What controls seasonal succession of two opportunistic green macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 206, 203-221.
- Fong, P., Zedler, J.B., 2000. Sources, sinks, and fluxes of nutrients (N + P) in a small, highly-modified estuary in southern California. *Urban Ecosystems* 4, 125-144.
- Fong, P., Kamer, K., Boyer, K.E., Boyle, K.A. 2001. Nutrient content of macroalgae with differing morphologies may indicate sources of nutrients to tropical marine systems. *Marine Ecology Progress Series* 220, 137-152.



- Fong, P., Boyer, K.E., Kamer, K., Boyle, K.A. 2003. Influence of initial tissue nutrient status of tropical marine algae on response to nitrogen and phosphorus additions. *Marine Ecology Progress Series* 262, 11-123.
- Fong, P., Fong, J.J., Fong, C.R. 2004. Growth, nutrient storage release of dissolved organic nitrogen by *Enteromorpha intestinalis* in response to pulses of nitrogen and phosphorus. *Aquatic Botany* 78, 83-95.
- Fry, B., Gace, A., McClelland, J.W., 2003. Chemical indicators of anthropogenic nitrogen loading in four Pacific estuaries. *Pacific Science* 57 (1), 77-101.
- Fujita, R.M. 1985. The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 92, 283-301.
- García-Pagés, M.A.E. 2007. Impacto relativo de las fuentes de nitrógeno en el sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón, mediante el estudio de las relaciones isotópicas de C y N. Tesis de Maestría. UNAM, ICMYL, Mazatlán, Sinaloa. 90 pp.
- García-Sanz, T., Ruiz, J.M., Pérez, M., Ruiz, M. 2011. Assessment of dissolved nutrients dispersal derived from offshore fish-farm using nitrogen stable isotope ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in macroalgal bioassays. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91, 361-370.
- Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP). 1990. The state of the marine environment. IMO/FAO/UNESCO-IOC/ WMO/ WHO/ IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. Rep. Stud. GESAMP 39. FAO. Rome. 111 pp.

- Gordillo, F.J.L., Niell, F.X., Figueroa, F.L. 2001c. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO<sub>2</sub> level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta* 213, 64-70.
- Golléty, C., Riera, P., Davoult, D. 2010. Complexity of the food web structure of the *Ascophyllum nodosum* zone evidenced by a  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  study. *Journal of Sea Research*, 64, 304-312.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. Kremling, K. 1983. *Methods of seawater analysis*. 2da. Ed. Weinheim. Verlag Chemie. 419 pp.
- Harlin, M.M. 1978. Nitrate uptake by *Enteromorpha* spp. (Chlorophyceae). Applications to aquaculture systems *Aquaculture* 15, 313-316.
- Hernández-Tovalín, O.A. 2007. *Composición y variación estacional de las macroalgas en las lagunas costeras de Sinaloa*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias del Mar. 105 pp.
- Holmes, R.M., McClelland, J.W., Sigman, D.M., Fry, B., Petersen, B.J. 1998. Measuring  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Marine Chemistry* 60, 235-243.
- Hulth, S., Aller, R.C., Canfield, D.E., Dalsgaard, T., Engstrfm, P., Gilbert, F., Sundbäck, K., Thamdrup, B. 2005. Nitrogen removal in marine environments: recent findings and future research challenges. *Marine Chemistry* 94, 125-145.
- Huntington, B.E., Boyer, K.E. 2008. Evaluating patterns of nitrogen supply using macroalgal tissue content and stable isotopic signatures in Tomales Bay, Ca. *Environmental Bioindicators* 3, 180-192.

- Ignatiades, L., Karidis, M., Vounatsou, P. 1992. A possible method for evaluating oligotrophy and eutrophication based on nutrient concentration scales. *Marine Pollution Bulletin* 24, 238-243.
- Jones, A.B., O'Donohue, M.J., Dennison, W.C. 2001. Assessing ecological impacts of shrimp and sewage effluent: biological indicators with standard water quality analyses. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52, 91-109.
- Kaldy, J. 2011. Using a macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  bioassay to detect cruise ship waste water effluent inputs. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1762-1771.
- Kamer, K., Boyle, K.A., Fong, P. 2001. Macroalgal bloom dynamics in a highly eutrophic southern California estuary. *Estuaries* 24(4), 623-635.
- Kamer, K., Kennison, R., Fong, P. 2003. Annual report. Southern California Coastal Water Research. Research Project No. 2001-2002. Department of organismic biology, ecology and evolution. University of California.
- Kendall, C., 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In: Kendall, C., McDonnell, J.J. (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 519-576.
- Kendall, C., Caldwell, E.A. 1998. Fundamentals of isotope geochemistry. In Kendall C. And McDonnell, J.J. (eds.) *Isotope tracers in catchment hydrology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 51-86 (Chapter 2).
- Kudo, I., Miyamoto, M., Noiri, Y., Maita, Y. 2000. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 36, 1096-1102.

- Lajtha, K., Michener, R.H. 1994. Stable isotopes in ecology and environmental science (K. Lajtha y R. H. Michener (eds). Blackwell Scientific Publications. Oxford.pp 138-157.
- Lan Hu, B.L., Shen, L.D., Xu, X.Y., Zheng, P. 2011. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. *Biochemical Society Transactions* 39 (16), 1811-1816.
- Lapointe, E. 1989. Macroalgal production and nutrient relations in oligotrophic areas of Florida bay. *Bulletin of Marine Science* 44, 312-323.
- Lapointe, B.E., Bedford, B.J. 2007. Drift rhorophyte blooms emerge in Lee County, Florida, USA: evidence of escalating coastal eutrophication. *Harmful Algae* 6, 421-437.
- Larned, S.T. 1998. Nitrogen versus phosphorus limited growth and source of nutrient for coral reef macroalgae. *Marine Biology* 132, 409-421.
- Lin, H.J., Wu, C.Y., Kao, S.J., Meng, P.J. 2007. Mapping anthropogenic nitrogen through point sources in coral reefs using  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 335, 95-109.
- Lin, D.T., Fong, P. 2008. Macroalgal bioindicators (growth, tissue N,  $\delta^{15}\text{N}$ ) detect nutrient enrichment from shrimp farm effluent entering Opunohu Bay, Moorea, French Polynesia. *Marine Pollution Bulletin* 56, 245-249.
- Liu, K.K., Kaplan, I.R. 1989. The eastern tropical Pacific as a source of  $^{15}\text{N}$ -enriched nitrate in seawater of southern California. *Limnology and Oceanography*, 34, 820-830.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. 366 pp.
- Lotze, H.K., Schramm, W. 2000. Ecophysiological traits explain species dominance patterns in macroalgal blooms. *Journal of Phycology* 36, 287-295.

- Mariotti, A., Laundreau, A., Simon, B. 1988  $^{15}\text{N}$  isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: application to the chalk aquifer of northern France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52 (7), 1869-1878.
- Martinetto, P., Teichberg, M., Valiela, I. 2006. Coupling of estuarine benthic and pelagic food webs to land-derived nitrogen sources in Waquoit Bay, Massachusetts, USA. *Marine Ecology Progress Series* 307, 37-48.
- McClelland, J.W., Valiela, I. 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnology and Oceanography* 43, 577-585.
- McCormick, P.V., Cairns, J. 1994. Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology* 6, 509-526.
- McGlathery, K.J., Pedersen, M.F., Borum, J. 1996. Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 32, 393-401.
- McGlathery, K.J., Krause-Jensen, D., Rysgaard, S.Y., Christensen, P.B. 1997. Patterns of ammonium uptake within dense mats of the filamentous macroalga *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 32, 393-401.
- Michener, R.M., Lajtha, K. 2007. *Stable isotopes in ecology and environmental science*, second edition. Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts, USA. 566 pp.
- Milligan, A.J., Harrison, P.J. 2000. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 36, 78-86.

- Montaño-Ley, Y., Peraza-Vizcarra, R., Páez-Osuna F. 2008. Tidal hydrodynamics and their implications for the dispersion of effluents in Mazatlán Harbor: An urbanized shallow coastal lagoon. *Water Air and Soil Pollution* 194, 343-357.
- Moore, J. W., Semmens, B.X. 2008. Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models. *Ecology Letters* 11, 470-480.
- Mutchler, T., Dunton, K.H., Townsend-Small, A., Fredriksen, S., Rasser, K. 2007. Isotopic and elemental indicator of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean sea, Yucatán peninsula, México. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 74, 449-457.
- Naldi, M., Viaroli, P. 2002. Nitrate uptake and storage in the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh in relation to nitrate availability and thallus nitrate content in a eutrophic coastal lagoon (Sacca di Goro, Po River Delta, Italy). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 269, 65-83.
- Naldi, M., Wheeler, P. 2002.  $^{15}\text{N}$  measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and  $^{15}\text{N}$  accumulation in algal tissue. *Journal of Phycology* 38, 135-144.
- Needoba, J.A., Sigman, D.M., Harrison, P.J. 2004. The mechanism of isotope fractionation during algal nitrate assimilation as illuminated by the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  on intracellular nitrate. *Journal of Phycology* 40, 517-522.
- Nixon, S.W., Oviatt, C.A. Frithsen, J., Sullivan, C. 1986. Nutrients and the productivity of estuarine and coastal marine systems. *Limnology and Oceanography* 12, 43-71.

- Nixon, S.W., Granger, S.L., Nowicki, B.L. 1995. An assessment of the annual mass balance of carbon, nitrogen, and phosphorus in Narragansett Bay. *Biochemistry* 31, 15-61.
- Núñez-López, R.A. 1996. Estructura de las comunidades de macroalgas de la laguna San Ignacio, BCS. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Estudios Interdisciplinarios del Mar. La Paz, BCS, México. 86 pp.
- O'Brien, M.C., Wheeler, P.A. 1987. Short term uptake of nutrients by *Enteromorpha prolifera* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 23, 547-556.
- Ochoa-Izaguirre, M.J. 1999. Composición y distribución de macroalgas en el sistema lagunar Urías (Mazatlán, Sinaloa, México); Variación estacional de la biomasa en relación con la disponibilidad de nutrientes y algunos factores ambientales. Tesis de Maestría. UNAM. ICMYL. 99 pp.
- Ochoa-Izaguirre, M.J., Carballo, J.L., Páez-Osuna F. 2002. Qualitative changes in macroalgal assemblages under two contrasting climatic conditions in a subtropical estuary. *Botánica Marina* (45) 2, 130-138.
- Ochoa-Izaguirre, M.J., Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L.E. 2007. Catálogo de Macroalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. Páez-Osuna, F. (ed.) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. Serie lagunas costeras de Sinaloa 117 pp.
- Ochoa-Izaguirre M.J., y Soto-Jiménez M.F. 2013. Evaluation of nitrogen sources in the Urías lagoon system, Gulf of California, based on stable isotopes in macroalgae. *Ciencias Marinas* (2013), 39(4), 413-430.

- Orozco-Vega, H., Dreckmann, K.M. 1995. Estuarine macroalgae from the Mexican coasts of the Gulf of México. *Cryptogamie-Algologie* 16 (3), 189-198.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S.R., Ruiz-Fernández, A.C., Espinoza-Angulo, R. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in north-western México. *Marine Pollution Bulletin* 34, 290-297.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S., Ruiz-Fernández, A.C. 1999. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal Waters of the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin* 38, 585-592.
- Páez-Osuna, F. 2001. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. *Environmental Pollution* 12, 229-231.
- Páez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, L.P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., Ruiz-Fernández, A.C. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregión. *Marine Pollution Bulletin* 46, 806-815.
- Páez-Osuna, F., Ramírez-Reséndiz, G., Ruiz-Fernández, A.C., Soto-Jiménez, M.F. 2007. La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: flujos, fuentes, efectos y opciones de manejo. Páez-Osuna, F. (ed.) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México. Serie lagunas costeras de Sinaloa. 117 pp.
- Peckol, P., DeMeo-Anderson, B., Rivers, J. 1994. Growth, nutrient uptake capacities and tissue constituents of the macroalgae, *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae*, related to site-specific nitrogen loading rates. *Marine Biology* 121, 175-185.
- Pedersen, F.M. 1994. Transient ammonium uptake in the macroalgae *Ulva lactuca* (Chlorophyta): nature, regulation and the consequences for choice of measuring technique. *Journal of Phycology* 30, 980-986.



- Pedersen, F.M., Borum, J. 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology Progress Series* 142, 261-272.
- Pedersen, F.M., Borum, J. 1997. Nutrient control of estuarine macroalgae: growth strategy and the balance between nitrogen requirements and uptake. *Marine Ecology Progress Series* 161, 155-163.
- Phillips, D.J.H. 1990. Use of macroalgae and invertebrates as monitors of metal levels in estuaries and coastal waters. En: Furness, R.W., Rainbow, P.S. (eds). *Heavy metals in the marine environment*, pp 81-99. CRC, Boca Raton, Fl.
- Phillips, D.L., Gregg, J.W. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia* 127, 171-179.
- Phillips, D.L., Gregg, J.W. 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oecologia* 136, 261-269.
- Phillips, J.J., Hurd, C.L. 2003. Nitrogen ecophysiology of intertidal seaweeds from New Zealand: N uptake, storage and utilization in relation to shore position and season. *Marine Ecology Progress Series* 264, 31-48.
- Piñón-Gimate, A. 2008. Caracterización de florecimientos macroalgales de lagunas costeras de Sinaloa y su relación con factores fisicoquímicos. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, ICMYL. 168 pp.
- Piñón-Gimate, A., Soto-Jiménez, M.F., Ochoa-Izaguirre, M.J. García-Pagés, E., Páez-Osuna F. 2009. Macroalgae blooms and  $\delta^{15}\text{N}$  in subtropical coastal lagoons from the

- Southeastern Gulf of California: discrimination between agricultural, shrimp farm and sewage effluents. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1144-1151.
- Quiñónez-Gallardo, W.E. 2008. Aportes de nitrógeno por efluentes acuícolas al estero de Urías: concentración de las especies químicas y composición isotópica. Tesis de Licenciatura. Secretaría de Educación Pública. Instituto Tecnológico de Mazatlán. 84 pp.
- Raikar, V., Wafar, M. 2006. Surge ammonium uptake in macroalgae from a coral atoll. 2006. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339, 236-240.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H. 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 26, 593-601.
- Ramírez-Pérez, P.S. 2008. Caracterización química del nitrógeno antropogénico descargado en ecosistemas costeros selectos del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Sistema de Educación Superior Tecnológica. Instituto Tecnológico de Mazatlán. Mazatlán, México. 109 pp.
- Rees, T.A.V., Dobson, B.C. Bijl, M. Morelissen, B. 2007. Kinetics of nitrate uptake by New Zealand marine macroalgae and evidence for two nitrate transporters in *Ulva intestinalis* L. *Hydrobiologia* 586, 135-141.
- Richardson, J.P. 1987. Floristic and seasonal characteristics of inshore Georgia macroalgae. *Bulletin Marine Science* 40 (2), 210-219.
- Riera, P., Stal, L.J., Nieuwenhuize, J. 2000. Heavy  $\delta^{15}\text{N}$  in intertidal benthic algae and invertebrates in the Scheldt Estuary (The Netherlands): effect of river nitrogen inputs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51, 365–372.
- Risk, M.J., Lapointe, B.E., Sherwood, O.A., Bedford, B.J. 2009. The use of  $\delta^{15}\text{N}$  in assessing sewage stress on coral reefs. *Marine Pollution Bulletin* 58, 793-802.

- Rosenberg, G., Ramus, J. 1984. Uptake of inorganic nitrogen and seaweed surface area: volumen ratios. *Aquatic Botany* 19, 65-72.
- Santelices, B. 1977. Ecología de las algas marinas bentónicas: efectos de factores ambientales. Tesis doctoral. Documento de la Dirección General de Investigaciones. Pontificia Universidad Católica de Chile. 488 pp.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2004. Convenio Ordenamiento Ecológico Marino del Golfo de California San Carlos, Sonora, México.
- Shearer, G., Schneider, J.D., Kohl, D.H. 1991. Separating the efflux and influx components of net nitrate uptake by *Synechococcus* R2 under steady-state conditions. *Journal of General Microbiology* 137, 1179-1184.
- Sigman, D.M., Altabet, M.A., Michener, R., McCorklr, D.C., Fry, B., Colmes, R.M. 1997. Natural abundant-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: an adaptation of the ammonia diffusion method. *Marine Chemistry* 57, 227-242.
- Sigman, D.M., K.L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter, Bohlke J.K. 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/ac010088e.
- Solomonson, L.T., Barber, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase. Functional properties and regulation *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 225-253.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by phenol-hypoclorite method. *Limnology and Oceanography* 14 (5), 799-801.
- Soto-Jiménez, M., Paez-Osuna, F., Morales-Hernández, F. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from the discharge zone of the

- submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). *Environmental Pollution* 114(3), 357-370.
- Soto-Jiménez, M.F., Páez-Osuna, F., Bojórquez-Leyva, H. 2003. Nutrient cycling at the sediment-water interface and sediments at Chiricahueto marsh: a subtropical ecosystem associated with agricultural land uses. *Water Research* 37, 719-728.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Canada. Fisheries. Research. Board of Canada. Bulletin 167, 311 pp.
- Swart, P.K., Evans, S., Capo, T. 2008. The origin of nitrogen isotope values in algae. A research project conducted by the stable isotope laboratory. University of Miami. 29 pp.
- Teichberg, M., Heffner, L.R., Fox, S., Valiela, I. 2007. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term supply. *Marine Biology* 151, 1249-1259.
- Teichberg, M., Fox, S.E., Aguila, C., Olsen, Y.S., Valiela, I., 2008. Macroalgal responses to experimental nutrient enrichment in shallow coastal waters: growth, internal nutrient pools, and isotopic signatures. *Marine Ecology Progress Series* 368, 117-126.
- Teichberg, M., Fox, S.E., Olsen, Y.S., Valiela, I., Martinetto P., Iribarne, O., Yuriko, M., Petti, M.A.V., Corbisier, T.N., Soto-Jiménez, M., Páez-Osuna, F., Castro, P., Freitas, H., Zitelli, A., Cardinaletti, M., Tagliapietra, D. 2010. Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal: Nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global Change Biology* 16, 2624-2637.
- Thornber, C.S., DiMilla, P. Nixon S.W., McKinney R.A. 2008. Natural and anthropogenic nitrogen uptake by bloom-forming macroalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56, 261-269.

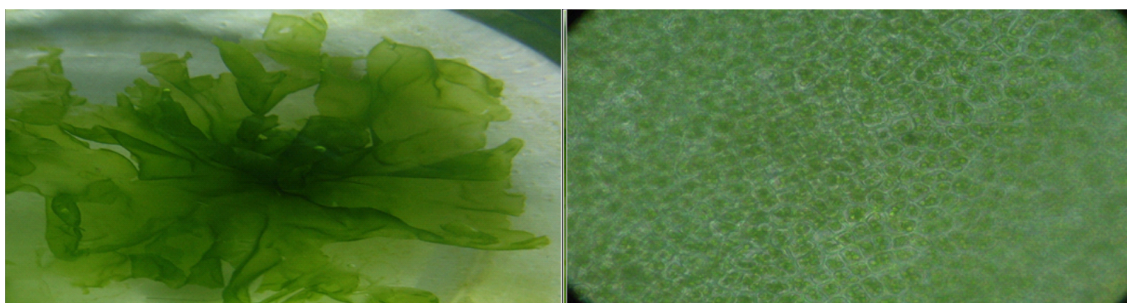
- Thomas, T.E., Harrison, P.J. 1987. Rapid ammonium uptake and nitrogen interactions in five intertidal seaweeds grown under field conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107, 1-18.
- Tischner, R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* 23, 1005-1024.
- Topinka, J.A. 1978. Nitrogen uptake by *Fucus spiralis* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 14, 241-247.
- Trono, G.C. 1988. Seaweeds ecology. influence of environmental factors on the structure, phenology and distribution of seaweeds communities. Report on the train in course on seaweed farming. ASEAN/UNDP/FAO. Manila, the Philippines, p. 14-16.
- Tyler, A.C., McGlathery, K.J., Anderson, I.C. 2001. Macroalgae mediation of dissolved organic nitrogen fluxes in a temperate coastal lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 53,155-168.
- Tyler, A.C., McGlathery, K.J., Anderson, I.C. 2003. Benthic algae control fluxes of dissolved organic and inorganic nitrogen compounds in a temperate, coastal lagoon. *Limnology and Oceanography* 48, 2125-2137.
- Tyler, A.C., McGlathery, K.J., Macko, S.A. 2005. Uptake of urea and amino acids by the macroalgae *Ulva lactuca* (Chlorophyta) and *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta). *Marine Ecology Progress Series* 294, 161-172.
- Tyler, A.C., McGlathery, K.J. 2006. Uptake and release of nitrogen by the macroalgae *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 42, 515-525.

- Umezawa, Y., Miyajima, T., Yamamuro, M., Kayanne, H., Koike, I. 2002. Fine scale mapping of land-derived nitrogen in coral reefs by  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae. *Limnology and Oceanography* 47 (5), 1405-1416.
- Valiela, I., Foreman, K., LaMontagne, M., Hersh, D., Costa, J., Peckol, B., DeMeo-Anderson, B., D'Avanzo, C., Babione, M., Sham, C., Brawley, J., Lajtha, K. 1992. Couplings of watersheds and coastal waters: sources and consequences of nutrient enrichment in Waquoit Bay, Massachusetts. *Estuaries* 15, 443-445.
- Valiela, I., Collins, G., Kremer, J., Lajtha, K., Geist, M., Seely, B., Brawley, J., C.H. Sham. 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: new method and application. *Ecological Applications* 7, 358-380.
- Valiela, I., Geists, M., McClelland, J., Tomasky, G. 2000. Nitrogen loading from watersheds to estuaries: Verification of the Waquoit Bay nitrogen model. *Biogeochemistry* 49, 277-293.
- Valiela, I., Bowen, J.L., Kroeger, K.D. 2002. Assesment of models for estimation of land-derived nitrogen loads to shallow estuaries. *Applied Geochemistry* 17(7), 935-953.
- Viaroli, P., Bartoli, M., Giordani, G., Naldi, M., Orfanidis, S., Zaldivar, J.M. 2008. Community shifts, alternative stable states, biogeochemical controls and feedbacks in eutrophic coastal lagoons: a brief overview *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18, 105-117.
- Villalba-Loera A. 1986. Descripción general del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. *Revista Ciencias del Mar, U.A.S. época 1, año 2, No.8, 32-37.*
- Vizzini, S., Mazzola, A. 2004. Stable isotope evidence for the environmental impact of a land-based fish farm in the western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 61-70.

- Waser, N.A.D., Harrison, P.J., Nielsen, B., Calvert, S.E. 1998. Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom. *Limnology and Oceanography* 43, 215-224.
- Wheeler, P.A., Björnsäter, B.R. 1992. Seasonal fluctuations in tissue nitrogen, phosphorus, and N:P for five macroalgal species common to the pacific northwest coast. *Journal of Phycology* 28, 1-6.
- Wilson, G.B., Andrews, J.N. y Bath, A.H. 1994. The nitrogen isotope composition of groundwater nitrates from the East Midlands Tertiary Sandstone Aquifer, England. *Journal of Hydrology* 157, 35-46.
- Zaldívar, J.M., Bacelar, F.S., Dueri, S., Marinov, D., Viaroli, P., Hernández-García, E. 2009. Modeling approach to regime shifts of primary production in shallow coastal ecosystems. *Ecological Modelling* 220 (21), 3100-3110.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey. 718 pp.

## 9. ANEXOS

Anexo 1. Espécimen de *Ulva lobata* utilizada para los experimentos de laboratorio (a), y (b) vista superficial de una fronda de (10x) sin epífitas, recolectada del sitio donde se tomaron las muestras para los experimentos.



Anexo 2. Tabla comparativa entre las cargas de N que entran a cuerpos de agua costeros de diversos sitios de Estados Unidos de Norteamérica y de México.

Estuario	Área (ha)	Carga N Kg.ha.año
Waquoit Bay, Ma. USA	6000	3.855
Casco Bay, Me. USA	234,800	4.259
Merrimack River. USSA	1,252,300	8.225
Buzzardss, Ma. USA	120,300	18.288
Boston Harbor, Ma. USA	211,300	35.968
Narragansett Bay, Ri. USA	415,900	20.197
Long Island Sound. USA	4,308,600	9.261
Raritan Bay, NY. USA	3,997,800	18.535
Delaware Bay, De. USA	3,276,100	15.700
Chesapeake Bay. USA	16,358,500	9.000
Pamlico Sound, NC. USA	2,619,200	17.300
L'Etang Inlet, NB. USA	8,600	45.779
Ensenada del Pabellón (México)	23,474	1,409 a 2331
Urías (este estudio)	1,800	273 a 312



Anexo 3. Tabla comparativa de las variables ambientales (temperatura, salinidad, O<sub>2</sub> disuelto y pH) y nutrientes (amonio, nitrato+nitrito y NDT) registradas entre los diferentes hábitats y épocas climáticas en el sistema Urías.

Hábitat	Temperatura (°C)	Salinidad (ups)	O <sub>2</sub> disuelto	pH	Amonio (µg L <sup>-1</sup> )	Nitrato+nitrito (µg L <sup>-1</sup> )	NDT (µg L <sup>-1</sup> )
Lagunar	27.5±3.7 <sup>a</sup>	35.7±4.1 <sup>b</sup>	6.25±2.35 <sup>a</sup>	7.78±0.23 <sup>a</sup>	64.9±63.1 <sup>b</sup>	83.4±62.1 <sup>b</sup>	671±492 <sup>b</sup>
Lagunar-marino	28.9±3.2 <sup>b</sup>	35.1±1.7 <sup>a</sup>	6.41±2.06 <sup>a</sup>	7.85±0.20 <sup>a</sup>	58.6±51.6 <sup>b</sup>	84.9±78.1 <sup>b</sup>	770±791 <sup>b</sup>
Marino	28.2±2.9 <sup>a</sup>	35.5±1.1 <sup>ab</sup>	6.54±1.55 <sup>a</sup>	7.85±0.20 <sup>a</sup>	42.9±52.7 <sup>a</sup>	63.5±63.3 <sup>a</sup>	587±611 <sup>a</sup>
Época climática							
Secas frías	25.9±1.2 <sup>a</sup>	35.5±2.9 <sup>b</sup>	7.25±1.73 <sup>b</sup>	7.78±0.22 <sup>a</sup>	39.2±24.4 <sup>a</sup>	105.0±89.1 <sup>b</sup>	397±206 <sup>a</sup>
Secas cálidas	31.3±1.1 <sup>b</sup>	36.7±2.3 <sup>c</sup>	5.26±2.29 <sup>a</sup>	8.06±0.15 <sup>a</sup>	126.0±199.3 <sup>c</sup>	36.7±17.5 <sup>a</sup>	1133±812 <sup>b</sup>
Lluvias	31.7±1.4 <sup>b</sup>	34.4±0.77 <sup>a</sup>	5.46±1.92 <sup>a</sup>	7.81±0.14 <sup>a</sup>	81.2±61.4 <sup>b</sup>	71.9±44.2 <sup>b</sup>	1079±904 <sup>b</sup>

a<b

Anexo 4. Valores mensuales de la precipitación y evaporación registradas en la región de Mazatlán, Sinaloa durante el periodo de estudio (2009-2010).

Mes/Época climática	Precipitación (mm)	Evaporación (mm)
Feb-09	0.0	78.4
Abr-09	0.0	138.0
May-09	1.2	161.2
Jun-09	108.8	99.0
Jul-09	193.3	179.8
Ago-09	201.6	195.3
Sep-09	204.4	168.0
Oct-09	183.2	142.6
Nov-09	43.2	102.0
Dic-09	20.8	89.9
Ene-10	3.3	96.1
Feb-10	120.6	109.2
Mar-10	0.3	133.3

Anexo 5. Listado taxonómico de las especies de macroalgas recolectadas en el sistema Urías durante el ciclo anual 2009-2010.

Chlorophyta

Chlorohyceae

Ulotrichales

Ulvaceae

*Ulva clathrata* (Roth) C.Agardh

*U. compressa* Linnaeus

*U. expansa* (Setchell) Setchell y L.N. Gardner

*U. fasciata* Delile

*U. flexuosa* Wulfen

*U. intestinalis* Linnaeus

*U. lactuca* Linnaeus

*U. lobata* (Kützing) Harvey

Cladophorales

Cladophraceae

*Cladophora albida* (Nees) Kützing

*C. columbiana* F.S. Collins

*C. microcladioides* F.S. Collins

*Chaetomorpha antennina* (Bory de Saint-Vincent) Kützing

*C. linum*(O.F. Müller) Kützing

*Rhizoclonium riparium* F.S. Collins

Bryopsidales

Caulerpaceae

*Caulerpa sertularioides* (S.G. Gmelin) Howe

Bryopsidaceae

*Bryopsis corticulans* Setchell

*B. pennatula* J. Agardh

Phaeophyta

Phaeophyceae

Ectocarpales

Ectocarpaceae

*Ectocarpus simulans* Setchell y N.L Gardner

*Colpomenia tuberculata* De A. Saunders

*C. ramosa* W.R. Taylor

Dictyotales

Dictyotaceae

*Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux

*Padina durvillaei* Bory Saint-Vincent

Fucales

Sargassaceae

*Sargassum* sp.

Rhodophyta

Florideophycidae

Halymeniales

Halymeniaceae

*Halymenia megaspora* E.Y. Dawson

Gelidiales

Gelidiaceae

*Gelidium sclerophyllum* W.R. Taylor

*Grateloupia filicina* (J.V. Lamouroux) C. Agardh

*G. howeii* Setchell y Gardner

*G. versicolor* (J. Agardh) J. Agardh

Gigartinales

Gracilariaceae

*Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss

Hypneaceae

*Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützing

*H. johnstonii* Setchell y Gardner

*H. pannosa* J. Agardh

Phylloporaceae

*Gymnogongrus* sp. Martius

*Ahnfeltiopsis leptophylla* (J. Agardh) P.C. Silva y DeCew

Ceramiales

Ceramiaceae

*Ceramium affine* Setchell y N.L. Gardner

*Ceramium equisetoides* E.Y. Dawson

*Ceramium mazatlanense* E.Y. Dawson

*Ceramium sinicola* Setchell y Gardner

Rhodomelaceae

*Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne

*Polysiphonia johnstonii* Setchell y N.L Gardner

*P. mollis* J.D. Hooker y Harvey

*P. pacifica* Hollenberg

*Caloglossa leprieurii* (Montagne) G. Martens

Wrangeliaceae

*Plenosporium* sp. (Smith) Nägeli

Callithamniaceae

*Callithamniom* sp. (Smith)

Anexo 6. Valores promedio $\pm$ ds y rango de variación de la señal de  $\delta^{15}\text{N}$  en las macroalgas recolectadas en el sistema Urías.

<b>Chlorophyta</b>	n	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Rango
<i>Bryopsis corticulans</i>	23	12.6 $\pm$ 2.8	6.0-16.5
<i>Bryopsis pennatula</i>	25	13.5 $\pm$ 3.2	4.6-20.5
<i>Caulerpa sertularioides</i>	76	9.6 $\pm$ 4.05	0.41-16.2
<i>Chaetomorpha antennina</i>	8	11.5 $\pm$ 2.8	5.3-14.4
<i>Chaetomorpha linum</i>	5	15.2 $\pm$ 2.5	12.3-17.9
<i>Cladophora albida</i>	8	12.7 $\pm$ 2.8	6.7-15.0
<i>Cladophora columbiana</i>	17	13.5 $\pm$ 2.5	9.6-19.9
<i>Cladophora microcladioides</i>	3	13.5 $\pm$ 1.6	11.9-15.6
<i>Rhizoclonium riparium</i>	16	12.3 $\pm$ 2.2	6.5-14.1
<i>Ulva clathrata</i>	5	14.7 $\pm$ 1.5	12.8-16.7
<i>Ulva compressa</i>	1	10.5 $\pm$ 0.0	10.5-12.8
<i>Ulva expansa</i>	50	14.7 $\pm$ 2.6	8.7-22.7
<i>Ulva fasciata</i>	3	14.0 $\pm$ 3.9	11.3-18.5
<i>Ulva flexuosa</i>	33	14.2 $\pm$ 2.2	9.8-18.2
<i>Ulva intestinalis</i>	44	13.3 $\pm$ 3.4	2.4-20.1
<i>Ulva lactuca</i>	11	12.8 $\pm$ 1.3	11.3-15.3
<i>Ulva lobata</i>	59	13.4 $\pm$ 1.7	9.7-17.7
<b>Phaeophyta</b>			
<i>Colpomenia ramosa</i>	2	11.9 $\pm$ 1.5	10.8-13.0
<i>Colpomenia tuberculata</i>	3	13.4 $\pm$ 0.55	13.0-14.0
<i>Dictyota dichotoma</i>	19	11.5 $\pm$ 2.9	5.0-15.4
<i>Ectocarpus simulans</i>	4	11.1 $\pm$ 3.4	7.8-14.8
<i>Padina durvillaei</i>	3	12.7 $\pm$ 0.97	11.6-13.5
<i>Sargassum</i> sp.	1	10.8 $\pm$ 0.0	10.8
<b>Rhodophyta</b>			
<i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i>	11	12.5 $\pm$ 1.5	8.6-14.0
<i>Bostrychia radicans</i>	27	11.2 $\pm$ 2.8	4.6-15.2
<i>Callithamnion</i> sp.	2	7.9 $\pm$ 0.15	7.80-12.4

<i>Caloglossa leprieurii</i>	24	10.3 ± 3.3	3.4-16.4
<i>Ceramium affine</i>	1	10.3±0.0	10.3
<i>Ceramium equisetoides</i>	1	11.2±0.0	11.2
<i>Ceramium mazatlanense</i>	13	12.6 ± 1.9	8.8-15.4
<i>Ceramium sinicola</i>	16	12.3 ± 2.5	7.2-15.3
<i>Gelidium sclerophyllum</i>	1	14.2±0.0	14.2
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	80	13.2 ± 3.3	5.6-19.5
<i>Grateloupia filicina</i>	63	12.9 ± 1.9	8.2-17.0
<i>Grateloupia howeii</i>	13	12.3 ± 2.4	9.2-15.8
<i>Grateloupia versicolor</i>	13	13.1 ± 1.5	11.2-16.3
<i>Gymnogongrus</i> sp.	2	14.5 ± 0.94	13.8-15.2
<i>Halymenia megaspora</i>	2	3.6 ± 0.44	3.3-3.9
<i>Hypnea johnstonii</i>	1	12.8±0.0	12.8
<i>Hypnea pannosa</i>	2	12.7 ± 0.98	12.0-13.4
<i>Hypnea spinella</i>	9	14.9 ± 1.4	13.6-17.8
<i>Pleonosporium</i> sp.	1	11.7±0.0	11.7
<i>Polysiphonia johnstonii</i>	11	8.2 ± 2.9	3.3-12.3
<i>Polysiphonia mollis</i>	5	12.7 ± 0.77	11.8-13.6
<i>Polysiphonia pacifica</i>	19	9.5±3.4	2.7-16.2

---

Anexo 7. Tabla comparativa de las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas entre los diferentes hábitats y épocas climáticas en el sistema Urías.

Hábitat	n	$\delta^{15}\text{N}$
Lagunar	166	10.3±3.7 <sup>a</sup>
Lagunar-marino	416	12.9±3.9 <sup>b</sup>
Marino	156	13.6±1.8 <sup>b</sup>
Época climática		
Secas frías	414	12.8±2.7 <sup>b</sup>
Secas cálidas	106	13.7±2.7 <sup>b</sup>
Lluvias	218	11.2±3.8 <sup>a</sup>

a<b



Anexo 8. Datos del Modelo 2 de predicción del valor isotópico del alga en función de las especies, épocas climáticas, concentraciones de amonio y nitrato + nitrito,  $\delta^{15}\text{N}$  amonio fuente y  $\delta^{15}\text{N}$  nitrato fuente.

```

6.97998593454977
+ Match {Season} {
  "LL" => -0.526272603849
  "SC" => 0.66559952842669
  "SF" => -0.1393269245777
  else => .
}
+ Match {Specie} {
  "Ahnfeltiopsis leptophylla" => -0.000006759037
  "Bostrychia radicans" => 0.45877901999283
  "Bryopsis corticulans" => 1.24104666707564
  "Bryopsis pennatula" => 1.46168233065921
  "Callithamnion sp." => -3.7204308646481
  "Callithamnion sp." => -1.3133914004611
  "Caloglossa leprieurii" => -0.0862366995311
  "Caulerpa sertularioides" => -1.717025166849
  "Cerarium affine" => -3.9309266588487
  "Cerarium equisetoides" => -1.526283981007
  "Cerarium mazatlanense" => 0.59099183020854
  "Cerarium sinicola" => 0.50439411594151
  "Chaetomorpha antennina" => -0.6966177497183
  "Chaetomorpha linum" => 2.44981305352264
  "Cladophora albida" => 0.57242408234212
  "Cladophora columbiana" => 1.68861391885469
  "Cladophora microcladioides" => 0.00273568025564
  "Colpomenia ramosa" => -0.6617442249018
  "Colpomenia tuberculata" => -0.3955583761131
  "Dictyota dichotoma" => -0.5247042719834
  "Ectocarpus simulans" => -1.9498269226424
  "Gelidium sclerophyllum" => 1.58930337779312
  "Gracilaria vermiculophylla" => 1.23722566189889
  "Grateloupia filicina" => 1.12731108515667
  "Grateloupia howeii" => 0.09605980392165
  "Grateloupia versicolor" => 1.17537821360376
  "Gymnogongrus sp." => 1.23303567459059
  "Halymenia megaspora" => -7.8277724657989
  "Hypnea johnstonii" => -0.8857159840047
  "Hypnea pannosa" => 0.51671162447598
  "Hypnea spinella" => 2.36937824689914
  "Padina durvillaei" => -0.6222080496457
  "Pleonosporium sp." => 0.83172678835935
  "Polysiphonia johnstonii" => -2.7333758754419
  "Polysiphonia mollis" => 0.39825919842584
  "Polysiphonia pacifica" => -1.5692028407812
  "Rhizoclonium riparium" => 0.32235636136688
  "Sargassum sp." => -0.6743784822376
  "Ulva clathrata" => 1.35879246113312
  "Ulva compressa" => -0.3582732116406
  "Ulva expansa" => 1.78031110561831
  "Ulva fasciata" => 2.12621949666282
  "Ulva flexuosa" => 2.47767337407727
  "Ulva intestinalis" => 1.14160524256669
  "Ulva lactuca" => 1.15369205288029
  "Ulva lobata" => 1.28815343387511
  else => .
}
+ 0.00172497659554 * Amonio (µg/l)
+ -0.0057335495531 * Nitrato + Nitrito (µg/l)
+ 0.1687049518342 * d15Amonio fuente
+ 0.31436340697722 * d15N nitrato fuente

```

Anexo 9. Datos del Modelo 3 de predicción del valor isotópico del alga en función de las épocas, hábitat, especies, y efectos combinados época-hábitat, época-hábitat-especie y hábitat-especie.

	Parámetros estimados			
	Estimado	Error Std	Valor t	Prob> t
Intercepto	6.3384179	1.250171	5.07	<.0001
Época[LL]	-1.561466	0.700942	-2.23	0.0263
Época[SC]	1.5734223	0.705977	2.23	0.0262
Hábitat[AL]	-1.848127	0.646875	-2.86	0.0044
Hábitat[L-M]	-0.910376	0.532567	-1.71	0.0879
Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	-12.69512	40.63333	-0.31	0.7548
Especie[ <i>Bostrychia radicans</i> ]	0.4611984	1.375223	0.34	0.7375
Especie[ <i>Bryopsis corticulans</i> ]	0.7491356	1.243892	0.6	0.5472
Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	2.0004017	1.532462	1.31	0.1923
Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	49.603678	36.14803	1.37	0.1705
Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	-0.534969	1.472511	-0.36	0.7165
Especie[ <i>Caloglossa leprieurii</i> ]	1.3995468	1.357948	1.03	0.3032
Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	-1.944352	1.127009	-1.73	0.085
Especie[ <i>Ceramium affine</i> ]	-3.143387	2.038159	-1.54	0.1236
Especie[ <i>Ceramium equisetoides</i> ]	-0.767833	2.036562	-0.38	0.7063
Especie[ <i>Ceramium mazatlanense</i> ]	0.2472755	0.885509	0.28	0.7802
Especie[ <i>Ceramium sinicola</i> ]	-1.5612	1.393412	-1.12	0.263
Especie[ <i>Chaetomorpha antennina</i> ]	-7.326235	2.622551	-2.79	0.0054
Especie[ <i>Chaetomorpha linum</i> ]	3.0307452	1.679018	1.81	0.0716
Especie[ <i>Cladophora albida</i> ]	-0.092101	1.52683	-0.06	0.9519
Especie[ <i>Cladophora columbiana</i> ]	3.2775276	1.465891	2.24	0.0258
Especie[ <i>Cladophora microcladioides</i> ]	-0.492861	1.467285	-0.34	0.7371
Especie[ <i>Colpomenia ramosa</i> ]	-6.031235	3.025443	-1.99	0.0467
Especie[ <i>Colpomenia tuberculata</i> ]	-5.966235	2.657032	-2.25	0.0251
Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	-2.229869	1.389417	-1.6	0.1091
Especie[ <i>Ectocarpus simulans</i> ]	-1.140459	1.065779	-1.07	0.285
Especie[ <i>Gelidium sclerophyllum</i> ]	3.338445	2.063394	1.62	0.1062
Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	-1.162016	1.479564	-0.79	0.4326
Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	-2.95078	1.583409	-1.86	0.0629
Especie[ <i>Grateloupia howeii</i> ]	-3.807425	1.74247	-2.19	0.0293
Especie[ <i>Grateloupia versicolor</i> ]	0.6423831	0.99247	0.65	0.5177
Especie[ <i>Gymnogongrus</i> sp.]	2.5874553	1.476124	1.75	0.0802
Especie[ <i>Halymenia megaspora</i> ]	-7.014219	1.473108	-4.76	<.0001

Especie[ <i>Hypnea johnstonii</i> ]	-6.171235	2.995206	-2.06	0.0398
Especie[ <i>Hypnea pannosa</i> ]	1.1877807	2.526739	0.47	0.6385
Especie[ <i>Hypnea spinella</i> ]	4.0235818	3.07297	1.31	0.191
Especie[ <i>Padina durvillaei</i> ]	-7.401235	2.995206	-2.47	0.0138
Especie[ <i>Pleonosporium</i> sp.]	1.5018333	2.894053	0.52	0.604
Especie[ <i>Polysiphonia johnstonii</i> ]	-4.291711	1.33433	-3.22	0.0014
Especie[ <i>Polysiphonia mollis</i> ]	-1.451594	2.070799	-0.7	0.4836
Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	-2.304268	1.683497	-1.37	0.1716
Especie[ <i>Rhizoclonium riparium</i> ]	1.0943972	1.396624	0.78	0.4336
Especie[ <i>Sargassum</i> sp.]	-2.125349	2.373345	-0.9	0.3709
Especie[ <i>Ulva clathrata</i> ]	1.0458756	1.130921	0.92	0.3555
Especie[ <i>Ulva compressa</i> ]	0.3118333	2.894053	0.11	0.9142
Especie[ <i>Ulva expansa</i> ]	1.7986292	1.036894	1.73	0.0834
Especie[ <i>Ulva fasciata</i> ]	5.3351101	2.04105	2.61	0.0092
Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	0.4156138	1.380564	0.3	0.7635
Especie[ <i>Ulva intestinalis</i> ]	0.6457389	1.024992	0.63	0.529
Especie[ <i>Ulva lactuca</i> ]	1.1318333	0.854263	1.32	0.1857
Época[LL]*Hábitat[AL]	-5.397063	3.371589	-1.6	0.11
Época[LL]*Hábitat[L-M]	2.2331188	1.232448	1.81	0.0705
Época[SC]*Hábitat[AL]	0.3364735	0.975836	0.34	0.7304
Época[SC]*Hábitat[L-M]	-1.322429	1.60512	-0.82	0.4104
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	27.25179	91.66331	0.3	0.7663
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bostrychia radicans</i> ]	6.6564062	3.644637	1.83	0.0683
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bryopsis corticulans</i> ]	7.0737885	4.257926	1.66	0.0972
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	3.4125103	3.729343	0.92	0.3606
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	-147.7804	94.5231	-1.56	0.1185
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caloglossa lepreurii</i> ]	6.3273356	3.634972	1.74	0.0823
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	4.7317956	3.619575	1.31	0.1917
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium affine</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium equisetoides</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium mazatlanense</i> ]	1.5640966	3.245435	0.48	0.63
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium sinicola</i> ]	2.3540244	4.445851	0.53	0.5967
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Chaetomorpha antennina</i> ]	3.7941602	2.837393	1.34	0.1817
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Chaetomorpha linum</i> ]	6.9481542	3.94698	1.76	0.0789
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora albida</i> ]	2.7522167	3.285025	0.84	0.4025
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora columbiana</i> ]	5.8577849	3.695823	1.58	0.1135

Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora microcladioides</i> ]	2.4194843	3.041682	0.8	0.4267
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Colpomenia ramosa</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Colpomenia tuberculata</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	5.105876	3.718016	1.37	0.1702
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ectocarpus simulans</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gelidium sclerophyllum</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	6.1770575	3.63589	1.7	0.0899
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	2.9107044	3.535611	0.82	0.4107
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia howeii</i> ]	1.950543	3.606315	0.54	0.5888
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia versicolor</i> ]	5.0826184	5.225446	0.97	0.3311
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gymnogongrus</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Halymenia megaspora</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea johnstonii</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea pannosa</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea spinella</i> ]	7.0620275	4.433089	1.59	0.1117
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Padina durvillaei</i> ]	8.2138941	4.08384	2.01	0.0448
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Pleonosporium</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia johnstonii</i> ]	9.0994914	4.036791	2.25	0.0246
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia mollis</i> ]	3.1579444	2.802901	1.13	0.2604
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	8.2544158	3.789259	2.18	0.0298
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Rhizoclonium riparium</i> ]	6.6094404	3.682641	1.79	0.0732
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Sargassum</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva clathrata</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva compressa</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva expansa</i> ]	4.3514246	3.636465	1.2	0.232
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva fasciata</i> ]	-3.860869	3.365452	-1.15	0.2518
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	2.5510649	3.58084	0.71	0.4765
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva intestinalis</i> ]	3.7576642	3.373125	1.11	0.2658
Época[LL]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva lactuca</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	-21.21869	22.3653	-0.95	0.3432
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bostrychia radicans</i> ]	0.6063754	2.040847	0.3	0.7665
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bryopsis corticulans</i> ]	-1.110615	1.313802	-0.85	0.3983
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	-2.411163	2.153183	-1.12	0.2633
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	52.625987	35.90156	1.47	0.1432
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Caloglossa leprieurii</i> ]	-0.891158	1.836592	-0.49	0.6277
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	-4.962236	1.26892	-3.91	0.0001

Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium affine</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium equisetoides</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium mazatlanense</i> ]	-0.932981	0.932513	-1	0.3175
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium sinicola</i> ]	0.264124	1.855627	0.14	0.8869
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Chaetomorpha antennina</i> ]	4.6029044	3.07833	1.5	0.1354
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Chaetomorpha linum</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora albida</i> ]	0.4097414	2.590199	0.16	0.8744
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora columbiana</i> ]	-5.372868	2.566371	-2.09	0.0367
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora microcladioides</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Colpomenia ramosa</i> ]	-6.267016	3.807446	-1.65	0.1003
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Colpomenia tuberculata</i> ]	-7.073826	3.49981	-2.02	0.0437
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	-3.900916	1.859353	-2.1	0.0364
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ectocarpus simulans</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gelidium sclerophyllum</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	-2.08529	1.090603	-1.91	0.0564
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	-1.497013	1.285882	-1.16	0.2448
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia howeii</i> ]	3.1653515	2.120744	1.49	0.1361
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia versicolor</i> ]	-0.578504	1.045067	-0.55	0.5801
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gymnogongrus</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Halymenia megaspora</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Hypnea johnstonii</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Hypnea pannosa</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Hypnea spinella</i> ]	1.0874947	3.145617	0.35	0.7297
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Padina durvillaei</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Pleonosporium</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia johnstonii</i> ]	-4.09771	1.603668	-2.56	0.0109
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia mollis</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	-0.744298	1.396066	-0.53	0.5941
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Rhizoclonium riparium</i> ]	0.6603954	2.518467	0.26	0.7932
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Sargassum</i> sp.]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva clathrata</i> ]	0.1493129	1.169463	0.13	0.8985
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva compressa</i> ]	0	0	.	.
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva expansa</i> ]	-0.354983	1.164422	-0.3	0.7606
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva fasciata</i> ]	0	0	.	.

Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	-1.338804	1.348512	-0.99	0.3212
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva intestinalis</i> ]	-0.786936	1.158431	-0.68	0.4972
Época[LL]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva lactuca</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	4.3646039	18.20658	0.24	0.8106
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bostrychia radicans</i> ]	-2.044764	1.518903	-1.35	0.1788
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bryopsis corticulans</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	0.6285755	1.573127	0.4	0.6896
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Callithamnion sp.</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Callithamnion sp.</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caloglossa leprieurii</i> ]	-1.232008	1.518491	-0.81	0.4175
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	-0.347092	1.500548	-0.23	0.8172
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium affine</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium equisetoides</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium mazatlanense</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ceramium sinicola</i> ]	3.9221299	4.463027	0.88	0.3799
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Chaetomorpha antennina</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Chaetomorpha linum</i> ]	-2.734674	2.011235	-1.36	0.1745
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora albida</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora columbiana</i> ]	0.122314	1.806788	0.07	0.9461
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Cladophora microcladioides</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Colpomenia ramosa</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Colpomenia tuberculata</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	-0.42952	1.448829	-0.3	0.767
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ectocarpus simulans</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gelidium sclerophyllum</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	-1.367081	1.518979	-0.9	0.3685
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	3.3524334	2.429272	1.38	0.1681
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia howeii</i> ]	6.3863661	4.055481	1.57	0.1159
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia versicolor</i> ]	-3.326643	5.040384	-0.66	0.5095
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gymnogongrus sp.</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Halymenia megaspora</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea johnstonii</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea pannosa</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Hypnea spinella</i> ]	0	0	.	.

Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Padina durvillaei</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Pleonosporium</i> sp.]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia johnstonii</i> ]	-7.759271	3.303921	-2.35	0.0192
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia mollis</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	-1.548626	1.892018	-0.82	0.4134
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Rhizoclonium riparium</i> ]	-1.609197	1.556471	-1.03	0.3016
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Sargassum</i> sp.]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva clathrata</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva compressa</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva expansa</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva fasciata</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	0.674905	2.495413	0.27	0.7869
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva intestinalis</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva lactuca</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	-3.791963	30.4122	-0.12	0.9008
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bostrychia radicans</i> ]	-2.249795	3.230698	-0.7	0.4865
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bryopsis corticulans</i> ]	-0.582523	2.028978	-0.29	0.7741
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	-0.249463	2.119831	-0.12	0.9064
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Callithamnion</i> sp.]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Caloglossa lepieurii</i> ]	1.2598079	1.927627	0.65	0.5137
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	3.0878864	1.765074	1.75	0.0808
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium affine</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium equisetoides</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium mazatlanense</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ceramium sinicola</i> ]	-2.393288	2.11889	-1.13	0.2592
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Chaetomorpha antennina</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Chaetomorpha linum</i> ]	-0.146562	2.501473	-0.06	0.9533
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora albida</i> ]	-0.966683	3.441362	-0.28	0.7789
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora columbiana</i> ]	7.1962404	3.696799	1.95	0.0521
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Cladophora microcladioides</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Colpomenia ramosa</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Colpomenia tuberculata</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	0.5688764	2.121263	0.27	0.7887
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ectocarpus simulans</i> ]	0	0	.	.

Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gelidium sclerophyllum</i> ]	0	0	.	.
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	2.1633355	1.532797	1.41	0.1587
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	-0.156205	2.001905	-0.08	0.9378
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia howeii</i> ]	-5.473803	3.77015	-1.45	0.1471
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia johnstonii</i> ]	0.4871906	2.075485	0.23	0.8145
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	-0.595035	2.030334	-0.29	0.7696
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Rhizoclonium riparium</i> ]	0.1349254	3.581557	0.04	0.97
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva expansa</i> ]	0.3703498	1.540821	0.24	0.8101
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	1.8162311	2.073241	0.88	0.3814
Época[SC]*Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva intestinalis</i> ]	-0.552716	1.552391	-0.36	0.7219
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	3.977249	8.663166	0.46	0.6463
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	0.0706315	1.353581	0.05	0.9584
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caloglossa leprieurii</i> ]	-1.249524	1.399712	-0.89	0.3724
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Caulerpa sertularioides</i> ]	0.3168786	1.15028	0.28	0.783
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Dictyota dichotoma</i> ]	1.4366852	1.479479	0.97	0.3319
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	2.3854886	1.238199	1.93	0.0545
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	-3.791126	2.270593	-1.67	0.0955
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	2.8389655	1.508028	1.88	0.0603
Hábitat[AL]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	-1.025621	1.952633	-0.53	0.5996
Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ahnfeltiopsis leptophylla</i> ]	-11.15044	3.928341	-2.84	0.0047
Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Gracilaria vermiculophylla</i> ]	2.7776971	1.245504	2.23	0.0261
Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Grateloupia filicina</i> ]	3.2324807	1.224671	2.64	0.0085
Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Polysiphonia pacifica</i> ]	-0.71083	1.387641	-0.51	0.6087
Hábitat[L-M]*Especie[ <i>Ulva flexuosa</i> ]	1.9169008	1.23141	1.56	0.1201
Época[LL]*Especie[ <i>Bryopsis pennatula</i> ]	2.3659435	1.597124	1.48	0.1391
Amonio (µg/l)	0.0026718	0.002115	1.26	0.2071
Nitrato + Nitrito (µg/l)	-0.005418	0.001276	-4.25	<.0001
NOD (µg/l)	0.0002664	0.000156	1.71	0.0887
δ <sup>15</sup> N nitrato fuente	0.3050175	0.023531	12.96	<.0001
δ <sup>15</sup> N amonio A	0.2396822	0.038221	6.27	<.0001
Resumen				
R <sup>2</sup>	0.679887			
RSquare Adj	0.585501			
Error cuadrático medio	2.046209			
Media de respuesta	12.44176			
Observaciones	730			



Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media	Valor F
Modelo	166	5006.579	30.1601	7.2033
Error	563	2357.2654	4.187	
C. Total	729	7363.8443		<.0001

Fuente	DF	Sum of Squares	Mean Square	Valor F
Datos desajustados	464	2275.8775	4.90491	5.9663
Error puro	99	81.3879	0.8221	
Error total	563	2357.2654		<.0001

---

Anexo 10.

María Julia Ochoa-Izaguirre, Martín F. Soto-Jiménez. Variability in nitrogen stable isotope ratios of macroalgae: consequences for the identification of nitrogen sources. Manuscrito en revision en la revista *Journal of Phycology*.



**VARIABILITY IN NITROGEN STABLE ISOTOPE RATIOS OF  
MACROALGAE: CONSEQUENCES FOR THE IDENTIFICATION  
OF NITROGEN SOURCES**

Journal:	<i>Journal of Phycology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ochoa, María; Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Ciencias del Mar y Limnología
Keywords:	$\delta^{15}\text{N}$ -Macroalgal, Biogeochemical processes, Isotopic fractionation, Eutrophication;, Macroalgae metabolism

1 VARIABILITY IN NITROGEN STABLE ISOTOPE RATIOS OF MACROALGAE:  
2 CONSEQUENCES FOR THE IDENTIFICATION OF NITROGEN SOURCES

3 María Julia Ochoa-Izaguirre<sup>a,b</sup>, Martín F. Soto-Jiménez<sup>c\*</sup>

4 <sup>a</sup>Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México,  
5 Unidad Académica Mazatlán, Apdo. Postal 811, Mazatlán, Sinaloa 82040, México

6 <sup>b</sup>Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Paseo Claussen s/n,  
7 Apdo. Postal 610, Mazatlán, Sinaloa 82000, México

8 <sup>c</sup>Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad  
9 Nacional Autónoma de México (UAM-ICMyL-UNAM), Apdo. Postal 811, Mazatlán  
10 Sinaloa, 82040, México.

11

12 Correspondent author:

13 Telephone number: +52 (669) 9852845 to 48.

14 Fax number: +52 (669) 9826133

15 E-mail: [martin@ola.icmyl.unam.mx](mailto:martin@ola.icmyl.unam.mx)

16

17

18

19

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

20 *Abstract*

21           In our research, we collected and analyzed a large stock of macroalgae specimens  
22 (738) for isotopic analysis sampled at monthly frequencies for a year along a gradient of  
23 habitats (20 sites) within the Urías lagoon complex, a typical subtropical coastal ecosystem  
24 in the Gulf of California. We quantified and characterized (chemical and isotopically) the N  
25 loads received by Urías throughout a year. We studied the spatial-temporal variation of the  
26 chemical forms and isotopic signals of the available N in the water column, and we  
27 monitored *in situ* different environmental variables and other hydrodynamic parameters.  
28 Multiple N sources (e.g. atmospheric and sewage, seafood processing, agriculture and  
29 aquaculture effluents) and biogeochemical reactions related to N cycle (e.g. ammonia  
30 volatilization, nitrification and denitrification) co-occurring across the ecosystem, which  
31 results in a mixture of chemical species and isotopic compositions of available N in the  
32 water column. An elevated variability was observed in  $\delta^{15}\text{N}$  values of macroalgae. Based  
33 on our results, the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae variation is explained by the spatial-temporal changes  
34 in the available N and not necessarily related to the N sources. Some of the variability is  
35 also explained by the differences in the macroalgae biology among functional groups,  
36 species and/or individual. The implications of our results are that although the  $\delta^{15}\text{N}$ -  
37 macroalgae technique is a good tool in the identification of N sources, its application in  
38 coastal ecosystems receiving multiples N sources, with changing environmental conditions  
39 influencing biogeochemical processes, and high diversity of ephemeral macroalgae species,  
40 the technique could be less sensitivity and with less predictive power.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

41 **Keywords:**  $\delta^{15}\text{N}$ -Macroalgal; Biogeochemical processes; Isotopic fractionation;  
42 Eutrophication; Macroalgae metabolism

43

#### 44 **Introduction**

45 Analysis of stable isotopes of nitrogen ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) is an established technique to determine  
46 the origin of N and the contributions of each source in a mixture, as well as to trace N in  
47 coastal ecosystems. In particular, the measurement of stable isotopes of N in macroalgae  
48 has become a widely used tool to study N pollution (*e.g.*, Costanzo et al. 2001, Lapointe et  
49 al. 2004, Deutsch and Voss 2006, Piñón-Gimate et al. 2009, Risk et al. 2009, Dailer et al.  
50 2010). The method is based on the fact that the specimens of macroalgae exposed take up  
51  $^{15}\text{N}$  in proportion to availability and reflect N sources in a predictable manner (Cohen and  
52 Fong 2005). The premise implies that the  $\delta^{15}\text{N}$  on sources must be known and should be  
53 isotopically distinct, that fractionation during the assimilation is negligible, and that  
54 changes in the  $\delta^{15}\text{N}$  signals in the specimens of macroalgae depend only of the N sources.  
55 Under these considerations, many investigations have been done to identify and trace  
56 sources of N in marine ecosystems. Most studies have been done in temperate and cold  
57 waters receiving a single (McClelland et al. 1997, Costanzo et al. 2005, Anderson and  
58 Cabana 2005, Howarth 2008) or two different N sources (Costanzo et al. 2003, Strauch et  
59 al. 2008).

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

60 Most coastal water bodies in the subtropical areas (as those associated to the Gulf of  
61 California), receive multiple sources of N, which complicates the interpretation of the N  
62 pools and require first an isotopic characterization of each source. Besides multiple sources  
63 of N, it is well known that the physical mixing and biogeochemical processes occurring in  
64 the coastal ecosystems modify the concentrations, chemical form and isotopic composition  
65 of N (Middelburg and Nieuwenhuize 2001, Sebilo et al. 2006). In these ecosystems  
66 environmental conditions for macroalgae habitats (e.g. nutrient concentration and chemical  
67 form, residence time, irradiance, temperature and salinity) vary spatially and temporally  
68 and therefore, macroalgae species and their conditions (age, morphology, reproductive  
69 state) may change along the coastal water body during distinct climatic seasons.

70 On the other hand, these ecosystems have a large diversity of species of macroalgae  
71 with different uptake and growth rates controlled by environmental conditions (Taylor et al.  
72 1998, Cohen and Fong 2004, Pedersen et al. 2004, Dudley and Shima 2010). The different  
73 physiological response of macroalgae species to changing environmental conditions might  
74 also influence fractionation and, thus, induce variations of  $\delta^{15}\text{N}$  values in macroalgae  
75 (Dudley and Shima 2010, Raimonet et al. 2013). However, based on the premises above  
76 mentioned, it is expected that each specimen of macroalgae may be sufficiently sensitive to  
77 register changes in the concentrations of dissolved N and their stable isotopes in the water  
78 column, and may integrate and reflect the origin of N in the coastal ecosystem.

79 In this study, we hypothesized that within a coastal ecosystem receiving high N  
80 loads from multiples sources and with unique and changing environmental conditions, such

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

81 as the subtropical coastal ecosystems in the Gulf of California, the  $\delta^{15}\text{N}$  values of  
82 macroalgae used as biomonitors in the identification of N sources does not reflect only  
83 the  $\delta^{15}\text{N}$  of the N sources but also  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae variations can be related to changes  
84 in the environmental conditions and in the biology of the specimens. In order to  
85 confirm this hypothesis, (1) we evaluated the effects of environmental conditions on the  
86 biogeochemical processes related to N cycle and how these complex reactions alter the  
87 chemical forms and isotopic composition of the sources of N received in the ecosystem. As  
88 a consequence of the changes in the concentrations of dissolved N and their stable isotopes  
89 in the water column related to biogeochemical processes, the availability of N and its  
90 isotopic signals are spatially and temporally modified and so are the  $\delta^{15}\text{N}$  values in the  
91 macroalgae specimens. Thus, (2) we evaluated the relationship between the isotopic  
92 composition of the available N in the water column and the isotopic signals of macroalgae  
93 specimens that are being exposed. Because macroalgae metabolism can alter the signals, (3)  
94 we investigated if anatomical and morphological differences among species and/or  
95 functional groups growing along a gradient of habitats, from open marine to a restricted  
96 lagoon during two contrasting climatic seasons, also contribute to the  $\delta^{15}\text{N}$  values in  
97 macroalgae due to the fractionation.

## 98 **Methods**

### 99 *Study area*

100 Urías coastal lagoon is located in the Pacific coast of México (Southern Gulf of California)  
101 and is part of the city of Mazatlán, the most important port in fishing and industrial and



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

102 naval activities in the area (Fig. 1). This lagoon is connected to the Gulf of California and  
103 the Pacific Ocean through an artificially open mouth that functions as a port entrance. The  
104 ecosystem receives effluents from aquaculture, marine food processing plants, agricultural  
105 fields, and untreated and primary treated sewage. Uriás lagoon watersheds also receive  
106 atmospheric N derived from the combustion of fossil fuels produced by a thermoelectric  
107 power plant, automobiles and from many other stationary sources. Some of N is directly  
108 discharged to the lagoon and to the coastline bordering the ecosystem via groundwater.  
109 Finally, the coastal lagoon receives N coming from the adjacent oceanic waters. In this  
110 study, loads of N to Uriás was accounted by NLOAD model ([www.nload.mbl.edu](http://www.nload.mbl.edu); Valiela et al.  
111 1997, 2002) that consider the N derived from atmospheric deposition, agricultural and  
112 human wastewaters. We also estimated the N loads from aquaculture and marine food  
113 processing effluents and from adjacent marine waters.

114 Physicochemical characteristics of the water column are highly influenced by the  
115 contrasting climatic seasons in this region, restricted seawater exchange, and runoff inputs.  
116 Due to the environmental conditions of salinity, temperature and vegetation, three  
117 macroalgae habitats were roughly defined: 1) lagoonal with a salinity gradient varying from  
118 brackish (<10 in the lagoon during the rainy season in July-October) to hypersaline (>40  
119 during dry hot season on May-June) in the upper lagoon, 2) the transitional zone between  
120 lagoonal and marine waters (30-34 along the year), and 3) marine conditions towards the  
121 mouth and adjacent ocean waters ( $35\pm 1$ ). The seasonal distribution patterns were defined  
122 as: dry season (nominally from November to May) and rainy season (from June to  
123 October). Annual precipitation ( $1,079.5 \text{ mm y}^{-1}$ ) and evaporation ( $55.9 \text{ mm y}^{-1}$ ) rates

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

124 registered during the past 40 years were  $880.63 \pm 364.6 \text{ mm y}^{-1}$  and  $53.29 \pm 6.8 \text{ mm y}^{-1}$ ,  
125 respectively (CNA, 2012).

### 126 *Sampling surveys*

127 Samples of effluents and water (4 L) and macroalgae were collected monthly (from  
128 February 2009 to March 2010) in 19 sites distributed along the Urías lagoon and one  
129 located in the adjacent ocean. Macroalgae samples (5-6) were collected by hand in the  
130 intertidal zone, as they were available. Several specimens were collected attached to  
131 mangrove roots and floating artifacts (at 0.5-1 m depth). Adult and juvenile specimens were  
132 collected as were available.

133 We also collected rainwater samples during the rainy season, to the study the  
134 atmospheric N in two sites located in urban and rural areas. Temperature (T), salinity (S),  
135 dissolved oxygen (DO), and pH data were measured by using a sonde YSI 6600V2. The  
136 precipitation and evaporation rates for the sampling period were provided by the National  
137 Water Commission (CNA, 2012). Besides, we modeled the residence time ( $\tau$ ) based on  
138 tidal velocity data (Montano-Ley et al. 2008).

139 In the laboratory, effluents and water samples were filtered through a pre-  
140 combusted ( $500^\circ\text{C}$ , 4 h) glass fiber filter (Whatman GF/C of  $0.70 \mu\text{m}$ ) with a low strength  
141 vacuum pump. Filtered water samples were collected in polyethylene bottles; some of the  
142 sample was utilized for determination of total dissolved N (TDN) by complete oxidation to  
143 nitrates (Grassoff et al. 1983), and for ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and  
144 dissolved inorganic nitrogen (DIN) according to the methods by Strickland and Parsons

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

145 (1972). The detection limits were  $\text{NH}_4^+$   $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^- \mu\text{g L}^{-1}$  with a coefficient  
146 of variation from 12.4 to 15%. Because  $\text{NO}_2^-$  concentration represented a small fraction of  
147 the DIN, we decided to sum to  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ). The rest of the filtered sample was kept  
148 frozen until the diffusion analysis of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . Ammonium and nitrate diffusion was  
149 carried out to extract and collect inorganic nitrogen from water samples (Sigman et al.  
150 1997, Holmes et al. 1998), respectively. The inorganic N was sequestered into filters GF/D  
151 and then packed in tin cups prior to stable-nitrogen-isotope analysis ( $\delta^{15}\text{N}$ ).

152 A total of 738 macroalgae samples were collected in the Urías lagoon complex. In  
153 the laboratory, each sample was carefully brushed and rinsed with MilliQ water to  
154 eliminate visible epibionts. Whole individual of macroalgae were frozen ( $< -20^\circ\text{C}$ ) and then  
155 freeze-dried ( $-44^\circ\text{C}$ , 33-72 mmHg, 72 h). Dry specimens were ground into a fine powder  
156 using a mortar and pestle and stored in glass vials pre-cleaned with HCl 2M. On the other  
157 hand, an individual specimen of each sample was kept fresh for taxonomic identification.  
158 The taxonomic identification of the macroalgae species was done following defined  
159 protocols (Abbot and Hollenberg 1976, Ochoa-Izaguirre et al. 2007). We followed the  
160 species nomenclature according to Graham and Wilcox (2000).

161 Before the analysis of nitrogen content and stable isotopes, macroalgae samples  
162 were exposed to HCl vapor for 4 h (acid fumigation) to remove carbonates and then dried at  
163 a temperature of  $60^\circ\text{C}$  for 6 h (Harris et al. 2001); aliquots of  $\sim 5$  mg were weighed and  
164 packed in tin cups (5x9 mm) by using a micro-balance and then placed into sample trays  
165 until analysis. Packed samples of macroalgae and GF/D filters were sent to the Stable

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

166 Isotope Facility of the University of California at Davis, CA, USA. The analysis of carbon  
167 and nitrogen contents and their isotopic composition was performed on an elemental  
168 analyzer coupled to the Carlo-Erba mass spectrometer. Isotope ratios of the samples were  
169 calculated using the equation  $\delta (\text{‰}) = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000$ , where  $R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$  or  
170  ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ . The  $R_{\text{standard}}$  is relative to international standards, the Air and V-PDB (Vienna  
171 PeeDee Belemnite) for N and C, respectively. Triplicate aliquots of individual samples  
172 were analyzed to assess the method error (procedural and instrumental). Besides, several  
173 replicate samplings of specimens of the same species and condition collected from one  
174 patch or attached to the same substrate, were also analyzed to assess the sampling error.  
175 The difference of  $\delta^{15}\text{N}$  was 0.33‰ for analytical methods and 0.58‰ for sampling.

#### 176 *Processing data*

177 Analyses of macroalgae samples were binned into groups of specimens collected in the  
178 same habitat and season were classified into eight functional groups based on anatomical  
179 and morphological characteristics (e.g. thallus structure, growth form, branching pattern,  
180 and taxonomic affinities) (Steneck and Dethier 1994, Balata et al. 2011). These functional  
181 groups were: C-Filamentous uncorticated (9 spp., n=187), C-Foliose (4 spp., n=123), C-  
182 Tubular (3 spp., n=83), O-coarsely (1 sp., n=14), O-Foliose (1 spp., n=19), R-Coarsely  
183 upper ramified (6 spp., n=194), R-Filamentous corticated (8 spp., n=92), and R-Foliose (2  
184 spp., n=26). Besides the most representative species and genus (e.g. *Caulerpa*  
185 *sertularioides*, *Gracilaria vermiculophylla* and *Ulva* spp.) were also grouped and analyzed.  
186 Species of genus *Ulva* were divided based on the thallus structure in tubular and foliose.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

187 For each group of specimens the average, standard deviation and range were calculated.  
188 Because not all macroalgae species were present in sufficient numbers at three habitats  
189 during both climatic seasons, several macroalgae groups were not considered for analysis.

190 We compared the functional groups collected in the same habitat and climatic  
191 season (within-subjects factor) by multivariate analysis of variance. When differences were  
192 noted, a Tukey-Kramer HSD (Honestly Significant Difference) test was performed.  
193 Besides, variations of  $\delta^{15}\text{N}$  macroalgae specimens of the same species collected in different  
194 seasons or habitats were investigated with a Kruskal-Wallis test.

195 Multivariate techniques were also followed to detect composition differences of  
196 macroalgae assemblages related to environmental conditions (habitat and season) and to  
197 identify species or groups responsible for these differences (Clarke 1993, Dufrene and  
198 Legendre 1997). In particular, SIMPER test was used to determine which species and  
199 groups were responsible for the possible differences between conditions. Bray-Curtis  
200 dissimilarity was calculated using untransformed data. We also calculated the Shannon-  
201 Wiener diversity (log base e) as measure of diversity. Two-way ANOVA tests were used to  
202 determine the difference in concentrations and isotopic compositions of available N and in  
203 environmental variables per season and habitat.

204 In this study a general lineal model based on a physical mixing balance of the N  
205 sources which includes the effects of the biogeochemical processes related to N cycle on  
206 the original N signals was applied to predict the  $\delta^{15}\text{N}$  variability of the available N in the  
207 water column (Moore and Semmens 2008):

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

208  $\delta^{15}\text{N-DIN} = f_1(\delta_1 - \gamma_1) + f_2(\delta_2 - \gamma_2) + \dots + f_n(\delta_n - \gamma_n)$  Equation (1)

209 where  $f_i$  is the proportional contribution of the N source  $i$  to the mixture and  $\delta_i$  the isotopic  
210 signal of the source  $i$  ( $f_1 + f_2 + \dots + f_n = 1$ , Equation 2) and  $\gamma_i$  represent the specific  
211 fractionation of the source  $i$  as a result of its participation in biogeochemical reactions (e.g.  
212 ammonia volatilization, nitrification and denitrification) (Middleburg and Nieuwenhuize  
213 2001). Fractionations due to the organic matter mineralization (Kendall 1998) and  
214 biological assimilation of N (Swart et al. 2008) were considered negligible and we assumed  
215 a coupling between nitrification and the denitrification processes (Dollhopf et al. 2005).  
216 Because in this study we carried out simultaneous determinations of  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  and  $\delta^{15}\text{N-}$   
217  $\text{NO}_3^-$  in the N sources and in the water column (by the diffusion techniques) across the  
218 ecosystem along the year, the differences were considered as the resulting fractionation of  
219 mixing and biogeochemical processes ( $\gamma$ ).

220 A factor analysis was conducted to evaluate the effects on the predicted isotopic  
221 signal of DIN in the water column. The concentrations (TDN, DON, DIN,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ )  
222 and isotopic composition ( $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  and  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ) of N in the water column, the  
223 environmental conditions (e.g. temperature, salinity, dissolved oxygen and pH) controlling  
224 the type and intensity of the biogeochemical processes and other involved variables (e.g.  
225 residence time, evaporation and precipitation rates), were individually factored into our  
226 analyses.

227 Regression analyses were performed to establish the relationships between N  
228 concentrations and the isotopic composition of N in water with the environmental factors in

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

229 the coastal ecosystem. When necessary, natural logarithm transformation of datasets was  
230 first performed to obtain normal distributions and homogeneous variances. In addition, we  
231 confirmed the efficiency using macroalgae in monitoring N sources by a regression analysis  
232 between  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae with  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ ,  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ , and  $\delta^{15}\text{N-DIN}$ .

233 The effect of available N in the water column ( $\delta^{15}\text{N-DIN}$ ) and environmental  
234 conditions (defined by season and habitat) on macroalgae  $\delta^{15}\text{N}$  was investigated by a three-  
235 way ANOVA for each functional group and for selected species or genus. For this analysis  
236 we considered the site collection as nested in habitats (Factor 1: 5 sites in the “Lagoonal”  
237 level, 12 sites in the “Lagoonal-Marine” level and 3 sites in the “Marine” level), the  
238 sampling months as nested in climatic seasons (Factor 2: 7 months in the “Dry” level, and 5  
239 months in the “Rainy” level), and species as nested in the functional groups, selected genus  
240 or specific species. The statistical significance of the simple linear regression model was  
241 determined by means of an F-test. For all statistical tests, a probability (p) of 0.05 was used  
242 to determine statistical significance. Statistical analysis of the results was done using JMP  
243 10.0 software (SAS Institute Inc.) and PRIMER v6 and PERMANOVA+ (Primer-E Ltd).

244 Finally, the probable distribution of contributions from sources of N to the Urías  
245 lagoon complex, based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values, was calculated by resolution of mixture  
246 models using MixSIR (<http://conserver.iugocafe.org>) software. MixSIR is based on  
247 Bayesian statistics and the inclusion of useful information for estimating (Moore and  
248 Semmens 2008). Because in this study we determined analytically the isotopic composition  
249 of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the N sources and in the water column, as well as the fractionation

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

250 factors by ammonia volatilization, nitrification and denitrification, all this information was  
251 incorporated into the solution of the models. Considering that the variations in the  
252 assemblages between habitats and seasons, we selected the functional groups better  
253 represented to estimate the relative contributions of N.

## 254 **Results**

### 255 *Nitrogen loads and $\delta^{15}\text{N}$ signals in sources*

256 Loads of N to Urías estuary were accounted in 697-716 ton N  $\text{y}^{-1}$  (Table 1), which is  
257 equivalent to >25 kg N per watershed hectare and close to 390 kg N per hectare of water  
258 surface per year. Nitrogen is mostly derived from atmospheric deposition (29% of the total,  
259 e.g. derived from vehicle and power-plant emissions), treated and untreated sewage (27%),  
260 agricultural runoff (14%), aquaculture (6%), and marine food processing effluents (11%).  
261 The adjacent marine waters contribute also with 13%. Most of the N is discharged in  
262 organic form (PON and DON) accounting over 80%, the rest in inorganic forms ( $\text{NH}_4^+$  and  
263  $\text{NO}_3^-$ ). About 281 ton N  $\text{y}^{-1}$  of N load (40%) is exported toward the adjacent oceanic waters.

264 Nitrogen loads from the diverse sources show an elevated spatial and temporal  
265 variability, with highest inputs during the rainy season by leaching the terrestrial watershed  
266 (atmospheric), agricultural soils and urban runoff, including crude wastewater. Discharges  
267 of N occur mostly through the Infiernillo creek (atmospheric, urban runoff, and untreated  
268 sewage) and Caimanero and Barron creeks at the lagoonal head (atmospheric, agriculture  
269 and aquaculture effluents). The discharge of primary treated domestic wastewater and  
270 partially treated food-processing effluents is continuous and relatively constant along the



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

271 year. Untreated effluent discharges from shrimp farms occur for eight months in the year  
272 (August-December and April-June), although larger discharges are at the end of each cycle  
273 in November-December and June.

274 Differences in the concentrations, chemical forms and isotopic compositions of N  
275 were observed among N sources (Table 1). The isotopic composition  $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$  was  
276  $2.1\pm 0.70\text{‰}$  for agriculture effluents and  $2.8\pm 1.4\text{‰}$  for runoff, with  $\text{NO}_3^-$  and PON as the  
277 main chemical forms. The  $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$  was  $<10\text{‰}$  in untreated and  $16.1\pm 0.30\text{‰}$  in treated  
278 sewage, and  $19.1\pm 0.68\text{‰}$  in industrial effluents, where  $\text{NH}_4^+$ , DON and PON were the  
279 main chemical forms. The marine-derived N was essentially  $\text{NO}_3^-$  ranging from 1.9 to  
280  $5.5\text{‰}$  ( $3.7\pm 1.8\text{‰}$ ) with the lowest values during the rainy season. Rainwater was  
281 constituted by  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  and a low concentration of DON. The isotopic signals for  
282 both inorganic forms in rainwater were very contrasting,  $11.8\pm 4.3\text{‰}$  for  $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$  and -  
283  $13.8\pm 3.9\text{‰}$  for  $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$ . Ammonium in urban runoff averaged  $12.9\pm 1.8\text{‰}$ .

284 *Environmental data, chemical forms and isotopic composition of N along the ecosystem*

285 A statistical summary of the environmental variables and concentrations of the chemical  
286 forms of N measured in the Urías water column (grouped by habitat and season) is shown  
287 on Table 2. During 2009-2010 the precipitation rate in the Mazatlán area averaged 848.2-  
288  $958.6 \text{ mm y}^{-1}$  ranging from close to 0 (in March) to 53.1 mm during the dry season months  
289 and from 109 to 204 mm (in September) during rainy season months. The evaporation rate  
290 accounted 1,548-1,730  $\text{mm y}^{-1}$  ranging from 78.4 mm to 157.2 mm during dry season  
291 months and from 98 to 189 mm during the rainy season months (CNA, 2012). Significant

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

292 differences were observed in precipitation and evaporation rates between seasons ( $p < 0.05$ ).  
293 Residence time in Urías ranged from 3.8-5.2 d in marine habitat, 3.8-36.9 d in lagoonal-  
294 marine habitat, to 3.8-198.7 d in the lagoonal habitat. Tidal velocities varied from 0.04-  
295  $0.067 \text{ m s}^{-1}$  in the lagoonal habitat to  $>0.40 \text{ m s}^{-1}$  at marine habitat. Overall, larger  $\tau$  values  
296 and lower tidal velocities were estimated in the extremes of the narrow tidal channels in the  
297 lagoonal head, while the opposite occurred in the mouth.

298 Water temperature averaged from  $26.0 \pm 3.31^\circ\text{C}$  in dry season to  $32.2 \pm 1.52^\circ\text{C}$  in the  
299 rainy season at the lagoonal habitat. Significant differences were observed between seasons  
300 but not among habitats in the same season. Salinity averaged  $34.2 \pm 0.63$  in the rainy season  
301 at lagoonal-marine habitat and  $36.5 \pm 4.8$  in the dry season. In spite of large variability,  
302 significant differences were observed between seasons and habitats. At the lagoonal habitat,  
303 the pH ranged from  $7.80 \pm 0.22$  to  $7.94 \pm 0.28$  in the dry and rainy season, respectively.  
304 Dissolved oxygen varied  $<1 \text{ mg L}^{-1}$  to maximum of  $16.7 \text{ mg L}^{-1}$ . Lower DO values were  
305 recorded during the rainy season, in particular, at lagoonal habitat. At least 3% of DO data  
306 showed levels of  $0.77$  to  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  and 25% values  $\leq 4 \text{ mg L}^{-1}$ , mostly located in sites  
307 within the interior tidal channels and close to creeks (e.g. Infiernillo, Confites and  
308 Caimanero creeks). Anoxic conditions, evidenced by the presence of  $\text{H}_2\text{S}$  and blackish  
309 color due to the  $\text{FeS}$ , were present in the sediments of many sites at lagoonal and lagoonal-  
310 marine habitats.

311 The chemical forms of N in the water column showed a high variability.  
312 Concentrations of  $\text{NH}_4^+$  varied from  $37.4 \pm 53.6 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $120.8 \pm 86.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

313 from  $34.6 \pm 18.6 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $91.1 \pm 87.9 \mu\text{g L}^{-1}$ , TDN from  $380 \pm 317 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $1,348 \pm 1,014 \mu\text{g}$   
314  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_3$  varied from  $1.41 \pm 1.60 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $9.16 \pm 9.51 \mu\text{g L}^{-1}$  for the dry and rainy seasons,  
315 respectively. About 80% of the TDN was DON, which is related to organic matter inputs  
316 from various activities, including aquaculture, domestic wastewater and marine product  
317 processing effluents. Largest variabilities in all environmental data and N concentrations  
318 were observed at lagoonal habitat, while in marine habitat the parameters were more stable.

319 Similar to the concentrations of N, there is a high spatial and temporal variation of  
320 the isotopic values for  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  (from 9.0 to 27.7‰),  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  (from <1 to 20.4‰) and  
321  $\delta^{15}\text{N-DIN}$  (from <1 to 20.4‰) (Table 2). Lowest  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  signals were detected during  
322 the rainy season at lagoonal habitat and in the middle part of the system (0.85-2.10‰),  
323 which is N derived from agriculture soils and leaching losses of atmospherically deposited  
324 N at the catchment, respectively. Elevated  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  values (>14.2‰) were observed  
325 along ecosystem during the dry season, in particular at the lagoonal habitat. High  $\delta^{15}\text{N-}$   
326  $\text{NH}_4^+$  signals were observed in the water column across the ecosystem along the year.  
327 Lowest values of  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  ( $13.7 \pm 3.27\%$ ) were measured at the lagoonal habitat  
328 throughout the year.

329 Differences between isotopical signals in the N sources and the observed values in  
330 the water column surrounding the discharge point ( $\gamma$ ) are also shown in Table 1. Overall N  
331 signals in water column increased respect to the original sources, from >1 to 12‰ for  $\text{NO}_3^-$   
332 derived from agriculture and atmospheric deposit and >1 to 10‰ for  $\text{NH}_4^+$  derived from  
333 aquaculture, domestic and food processing wastewaters. Enrichment in the N signals is

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

334 attributable to denitrification and ammonia volatilization processes, respectively. Because  
335  $\text{NH}_4^+$  is the only inorganic chemical form in domestic and food processing wastewaters  
336 (non-direct  $\text{NO}_3^-$  source), the presence of  $\text{NO}_3^-$  in surrounding waters receiving these  
337 effluents is probably derived from the nitrification process. In this area, the  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$   
338 averaged 8.2‰, higher than nitrates (<6‰) and lower than ammonium (16.1-19.1‰)  
339 sources. This evidenced an isotopic fractionation from -8 and -11‰ due to the nitrification.

340 Based on the generalized linear equation, we calculated the  $\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}$  in the water  
341 column and reported on Table 2. Predicted values showed a large variability (0.5 to 20.3%),  
342 mainly in lagoonal and lagoonal-marine habitats. Due to this large variation, non-  
343 significant differences were observed among groups, except for lagoonal habitat with the  
344 lowest isotopical signals in both seasons.

345 Results of the factor analysis (Table 3) revealed that  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  ( $F=1,506$ ,  
346  $p<0.0001$ ) and  $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  ( $F=346.4$ ,  $p<0.0001$ ) in the water column had the highest effect  
347 on  $\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}$  signals. Followed by  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  ( $F>15.0$ ,  $p<0.0001$ ), and pH  
348 ( $F=15.4$ ,  $p<0.0001$ ), dissolved oxygen ( $F=8.2$ ,  $p=0.0043$ ), temperature ( $F=7.35$ ,  $p<0.0069$ )  
349 and salinity ( $F=6.52$ ,  $p=0.0109$ ) in the water. All these parameters explained 80% of the  
350  $\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}$  variability.

351 Results of the regression analysis (Table 4) showed that the concentrations of TDN,  
352 DON and  $\text{NH}_4^+$  increased with temperature and decreased with salinity, while  $\text{NO}_3^-$  showed  
353 the opposite behavior. Values  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  in the water column decreased with temperature,  
354 TDN, DON, and  $\text{NH}_4^+$  concentrations, but increased with salinity. The prediction model for

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

355  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN variability showed a good fit with values of  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  and  $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  observed  
356 in the field.  $\delta^{15}\text{N}$ -NID decreased with TDN levels. Non-significant correlation was  
357 observed between  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  with  $\text{NO}_3^-$  concentrations and between  $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  with  $\text{NH}_4^+$   
358 concentrations.

### 359 *Species composition of the macroalgal community*

360 From a total of 738 macroalgae samples collected in the Urías lagoon complex, 45 species  
361 belong to three-taxa macroalgae distinguished. They represented 22 Rhodophyta, 17  
362 Chlorophyta and 6 Ochrophyta species, respectively. The Shannon-Wiener index showed a  
363 higher diversity of species at lagoonal-marine habitat in both seasons [ $H'(\log_e)=2.20\text{-}2.41$ ],  
364 followed by lagoonal habitat [ $H'(\log_e)=2.00\text{-}2.10$ ], and lower at marine [ $H'(\log_e)=1.30\text{-}$   
365  $1.43$ ]. SIMPER test revealed that macroalgal assemblages were different between lagoonal  
366 and marine habitats (Table 5). The species responsible for these differences, with a  
367 contribution  $>59\%$  in the lagoonal habitat, were *Bostrychia radicans*, *Caloglossa leprieurii*,  
368 *Caulerpa sertularioides* and *Gracilaria vermiculophylla*. *Grateloupia filicina* and *Ulva*  
369 *lobata* were present at the marine (75% of the contribution) but not in the lagoonal habitat.  
370 Assemblages in lagoonal-marine habitat included species present in lagoonal and marine  
371 habitats during both seasons. The environmental changes in the dry and rainy seasons  
372 (Table 6) result in small alterations in the structure and composition of assemblages with  
373 *Bryopsis corticulans* present only in rainy season and *U. expansa* only in dry season

374 Differences in the functional groups were observed among habitats but not between  
375 seasons by SIMPER test (Table 5). Functional groups of C-Filamentous uncorticated and

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

376 R-Filamentous corticated were the responsible for the separation in the lagoonal habitat, the  
377 R-Coarsely upper ramified and C-Foliose groups were responsible in marine habitat. C-  
378 tubular group showed a similar abundance among habitats. All these functional groups  
379 showed high abundance at the lagoonal-marine habitat; except for R-Foliose that was  
380 practically present only in the lagoonal habitat. Overall, the averaged abundance for all  
381 groups was higher during the dry season than in the rainy season. Groups of O-Coarsely  
382 and O-Foliose showed a lower abundance and distribution across the ecosystem.

383  $\delta^{15}\text{N}$  of macroalgae

384 Overall, the isotopic compositions of N in macroalgae varied from 0.41 to 22.67‰.  
385 Significantly lower  $\delta^{15}\text{N}$  values were measured in specimens collected in the lagoonal  
386 habitat compared to those collected in the other habitats at the same climatic season.  
387 Besides, lower signals were also observed during the rainy season compared to the dry  
388 season for the same habitat. Separating by species, the averages of  $\delta^{15}\text{N}$  values varied from  
389  $1.86\pm 0.55$  (*C. sertularioides*) to  $17.7\pm 0.28$ ‰ (*Chaetomorpha linum*) (Table 7). The N  
390 isotope signatures exhibited a high variation among species (inter-specific up to 9-11‰)  
391 and in specimens from a same species (intra-specific up to 8-14‰).

392 Comparing by functional groups (Table 7), the  $\delta^{15}\text{N}$  values varied from  $7.66\pm 4.13$   
393 to  $13.5\pm 1.8$ ‰ in C-Filamentous uncorticated macroalgae. In C-Tubular macroalgae values  
394 were from  $6.25\pm 5.45$  to  $14.6\pm 1.92$ ‰, in C-Foliose from  $12.9\pm 1.62$  to  $14.9\pm 3.41$ ‰, in R-  
395 Coarsely upper ramified from  $9.69\pm 2.85$  to  $14.4\pm 2.5$ ‰, in R-Filamentous corticated from  
396  $9.13\pm 3.08$  to  $13.79\pm 0.8$ ‰, in R-Foliose from  $7.83\pm 2.8$  to  $11.2\pm 2.64$ ‰. Finally for O-

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

397 Coarsely and O-Foliose, the  $\delta^{15}\text{N}$  averaged from  $12.4\pm 2.23$  to  $13.3\pm 0.58\text{‰}$  and from  
398  $5.92\pm 1.26$  to  $13.1\pm 1.26\text{‰}$ , respectively. Overall significant differences were observed in  
399 specimens collected in the lagoonal habitat during the rainy seasons, except for C-Foliose  
400 with not significant differences between habitats and seasons and with only two groups of  
401 specimens for O-Coarsely.

402 In order to evaluate the spatial-temporal variability of the isotopic data more  
403 carefully, we selected the species most frequently collected along the year through the  
404 ecosystem (marked with asterisk in Table 7). Species *B. radicans* (a red species typical of  
405 mangrove forests), *D. dichotoma* (the only ubiquitous and conspicuous brown macroalgae)  
406 and *B. pennatula* collected in lagoonal habitat showed a clear temporal variation of  $\delta^{15}\text{N}$ ,  
407 with high values during the dry season decreasing through the rainy season (Fig. 2a). Three  
408 bloom forming species (*G. vermiculophylla*, *C. sertularioides* and *U. intestinalis*) in  
409 lagoonal-marine habitat showed also a well-defined oscillation with a minimum during the  
410 rainy season (Fig. 2b). Specimens of the species *G. filicina*, *U. flexuosa* and *U. lobata*  
411 collected at marine habitat, did not show a clear trend in the  $\delta^{15}\text{N}$  signals in the course of  
412 the year (Fig. 2c).

413 The affectation of the individual variation of the specimens on  $\delta^{15}\text{N}$  values, in terms  
414 of maturity, was also evaluated by comparing the signals between juvenile and adults for  
415 specimens of *G. vermiculophylla* and *C. sertularioides* (Fig. 3), two of the most abundant  
416 species. The variations of  $\delta^{15}\text{N}$  values between juveniles and adults of *G. vermiculophylla*  
417 showed a low but significant association ( $R^2=0.45$ ), a slope lower than unity and a high

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

418 intercept. Other species showed similar behavior (not-shown). *C. sertularioides* was an  
419 exception with a high association ( $R^2=0.91$ ), slope line close to unity and low intercept.

420 *Nitrogen content and  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae in function of available N and other*  
421 *environmental variables*

422 Nitrogen content in macroalgae showed a large variation from 0.40 to 8.59% (global  
423 average  $3.62\pm 0.99\%$ ). Species of *Colpomenia* spp. showed the lowest ( $2.06\pm 1.26\%$ )  
424 contents of N and *Polysiphonia pacifica* the highest ( $5.36\pm 1.76\%$ ). Nitrogen content by  
425 functional groups averaged from 2.80 to 4.41% for C-Filamentous uncorticated, 2.5 to  
426 4.8% for C-Foliose, 3.0 to 4.43% for C-Tubular, 2.78 to 3.66% for R-Coarsely upper  
427 ramified, 3.90 to 4.78% for R-Filamentous corticated, 4.42 to 5.0% for R-Foliose, 2.1 to  
428 2.6% for O-Coarsely and from 2.5 to 3.8% for O-Foliose group. Nitrogen content was  
429 significantly lower in the dry than in the rainy; lowest and highest values were observed at  
430 marine and lagoonal habitats, respectively. Exceptions were observed for R-Coarsely upper  
431 ramified and R-Filamentous corticated without significant differences among habitats and  
432 seasons.

433 A low but significant correlation was observed among macroalgae N content with  
434 all forms of dissolved N ( $R^2 > 0.11$ ) (Table 4). C:N ratio in macroalgae showed a negative  
435 relationship with TDN, DON, DIN,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  concentrations, although it was  
436 significant only for DIN,  $\text{NH}_4^+$ , but increased significantly with  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$  values. Values  
437  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae varied significantly with C:N ratio ( $R^2 = 0.14$ ) and with the isotopical  
438 signals of the available N in the water column ( $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ ,  $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$  and  $\delta^{15}\text{N}\text{-DIN}$ )



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

439 ( $R^2 > 0.26$ ). Regression analysis between  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae with  $\delta^{15}\text{N}$  in the sources showed  
440 a significant affinity ( $R^2$  of 0.26) only with  $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ . However, the relationship between  
441  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae and  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in the water column showed a higher affinity with  $R^2$  of  
442 0.61.

443 In spite of the high affinity between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae, differences in  
444 the relationship were observed in different species and functional groups (Table 8). The  
445 determination factor decreased from 0.66-0.69 in R-Foliose and O-Foliose to 0.21-0.22 in  
446 C-Foliose and R-Coarsely ramified. In a same group differences in  $R^2$  were observed. For  
447 example, in the C-Filamentous uncorticated group the  $\delta^{15}\text{N}$  in *B. corticulans* ( $R^2=0.02$ ) did  
448 not correlate significantly with  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN, while specimens of *C. sertularioides* showed the  
449 best affinity among species ( $R^2=0.71$ ). Similar results were observed in R-Coarsely upper  
450 ramified group for *G. filicina* ( $R^2=0.02$ ) and *G. vermiculophylla* ( $R^2=0.64$ ), and in R-  
451 Filamentous corticated with *Ceramium* sp. ( $R^2=0.01$ ) and *B. radicans* ( $R^2=0.70$ ),  
452 respectively. In those models with significant  $R^2$ , slopes varied from  $<0.1$  to 0.939 and  
453 intercepts from -0.95 to 10.0‰.

454 *Effect of  $\delta^{15}\text{N}$  of available N and other confounding factors on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae*

455 Previous results evidenced that  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN explained about 40% of the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae  
456 global variability. By factor analysis we evaluated the combined effect of other  
457 confounding factors (habitat and season) along  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN (source) on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae  
458 responses. The resulting global model explained 47% of the variability (Table 9).

459 Obviously,  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN alone had the highest influence ( $F=138.44$ ,  $p < 0.0001$ ). However,

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

460 habitat ( $F=19.70$ ,  $p<0.0001$ ), season ( $F=4.55$ ,  $p=0.0333$ ) and the combination of habitat  
461 with  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN ( $F=5.54$ ,  $p=0.0041$ ) and season ( $F=3.86$ ,  $p=0.0216$ ) had significant effects.  
462 In particular, specimens collected in lagoonal habitat and/or during the rainy season showed  
463 lower values than those collected in lagoonal-marine habitat and/or during the dry season,  
464 and no effect in specimens collected in the marine habitat. We also estimated the effects for  
465 those functional group and species with not data singularity. Only results for *C.*  
466 *sertularioides* were included on Table 9, which reached the highest  $R^2$  of 0.73. The  
467 available N at water column ( $\delta^{15}\text{N}$ -DIN) followed of season and habitat explained the  $\delta^{15}\text{N}$   
468 variability for this species.

#### 469 *Estimation of the relative contributions*

470 The probable distribution of contributions from sources of N to the Urías lagoon complex,  
471 based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values, were resolved by MixSIR software for macroalgae  
472 collected in all habitats in both seasons (Fig. 4a, 4b). Nitrogen derived from atmospheric  
473 deposit (10-60%), seafood processing (10-50%) and sewage (10-50%) contributed with  
474 more of the N incorporated in the specimens. N from agriculture, shrimp farm and marine  
475 adjacent waters contributed with <5 to 30% of the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae signals. Overall, the  
476 results of N contribution based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalage isotopic by isotopic mass balance agree  
477 with the estimation of the total N loads entering into aquatic ecosystems. However, a more  
478 carefully analysis evidenced differences in the N contribution depending of the habitat,  
479 season and functional groups selected for the analysis, which explained the high variability.  
480 For example, N derived from sewage and agriculture was higher during the rainy season

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

481 than in the dry season, while atmospheric N increased its contribution during the dry  
482 season. Non-significant differences were observed for shrimp farm, seafood processing and  
483 marine sources between seasons. Differences were observed among habitats for the same  
484 season, with the marine habitat showing the lowest N contribution derived from  
485 atmospheric deposit (<20%) and the highest by seafood industry (>20%) during dry season.  
486 At lagoonal and lagoonal-marine habitats, N was mainly derived from atmospheric deposit  
487 (up to 40-60%), followed from sewage and shrimp farm (20-30% each one).

488 An analysis by functional groups showed also differences in the N contribution. In  
489 this study, we compared six functional groups that included anatomical and morphological  
490 characteristics among them: (1) C-Filamentous uncorticated (e.g. *C. sertularioides*), (2) C-  
491 Foliose (e.g. *Ulva* spp. laminar form), (3) C-Tubular (e.g. *Ulva* spp. with one layered  
492 hollow tubes) (Fig. 4c), (4) R-Coarsely upper ramified (e.g. *G. vermiculophylla*), (5) R-  
493 Filamentous corticated (e.g. *Polysiphonia* spp. and *Ceramium* spp.) and (6) R-Foliose (e.g.  
494 *C. leprieurii*) (Fig. 4d). These species are common in the subtropical ecosystems associated  
495 to the Gulf of California. Results revealed that the atmospheric N (up to 60%) was the main  
496 contributor for most of the groups, except for C-Foliose and C-Tubular (<30%). The second  
497 major contributor was sewage for most of groups (<30%), except for C-Foliose and C-  
498 Tubular with a maximum of 50%. For the other sources, non-significant differences were  
499 observed among functional groups.

## 500 **Discussions**

501 *Nitrogen input to Urias lagoon complex and ecological consequences*

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

502 Nitrogen input rate at Urías watershed is higher than other agriculture-based watersheds in  
503 the region (7.3-17.3 kg ha  $\text{y}^{-1}$ ) (Páez-Osuna et al. 2007), but comparable to those reported  
504 in densely urbanized watersheds in the northeastern United States, ranging from 13 to 68 kg  
505 ha  $\text{y}^{-1}$  (most probably 31-36 kg ha  $\text{y}^{-1}$ ) (Castro and Driscoll 2002). In those areas, the N was  
506 derived from sewage treatment plants (36-81%), atmospheric deposit (14-35%) and  
507 agriculture (4-20 %) (Driscoll et al. 2003).

508 While the coastal ecosystems associated to those U.S. highly urbanized watersheds  
509 receive maximum inputs of 127 kg N per hectare of surface water per year (Castro and  
510 Driscoll 2002), Urías lagoon complex system receives over three times more. The high N  
511 loads combined to the excessive loads of organic matter have resulted in progressive  
512 ecological alterations, which is evidenced by seasonal phytoplankton and macroalgal  
513 blooms, hypoxic conditions, and anoxia events that are becoming more frequent, prolonged  
514 and covering larger areas of the Urías coastal lagoon. Adverse conditions for aquatic life  
515 are provoking the displacement of sensitive organisms and even a recurring high mortality  
516 of fish and other species, but favoring other opportunist and more tolerant species. Urías  
517 lagoon complex is an example of a highly urbanized and stressed coastal ecosystem  
518 receiving high loads of N with ecological consequences. Nowadays, Urías lagoon is  
519 characterized by ephemeral and opportunist macroalgae species and bloom forming species  
520 are often coupled to eutrophication (e.g. Valiela et al. 1997, Johansson et al. 1998, Rabalais  
521 2005, Worm et al. 2006). Nitrogen is also the largest pollution problem in the coastal  
522 waters of México. In particular in ecosystems associated to large urban settlements,

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

523 agricultural valleys and/or with animal production at large scale, located along the Gulf of  
524 California and Gulf of Mexico coastlines.

525 *Biogeochemical processes in Urías lagoon complex*

526 The application of the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique to determine the relative contributions of  
527 the sources of N is useful for evaluating the impact that the different activities are causing  
528 to the coastal ecosystems, and to develop management plans to restore them. However, in  
529 coastal bodies such as Urías, which receives high N loads from multiple sources (i.e.,  
530 fertilizers, atmospheric, sewage, aquaculture and food processing industry), the application  
531 is not simple. Although the main sources of anthropogenic N in Urías lagoon are  
532 characterized by distinct  $\delta^{15}\text{N}$  values, the isotopic interpretation of the N pools is very  
533 complex because the estuarine processes such as mixing of terrestrial and marine waters  
534 and reactions related to N cycle (e.g. nitrification, denitrification, volatilization or algal  
535 uptake) can significantly modify the concentrations, chemical forms and isotopic  
536 composition of available N in the water column (Cifuentes et al. 1989, Middelburg and  
537 Nieuwenhuize 2001, Sebilo et al. 2006). These changes affect the N isotopic composition  
538 of available N in the water column and of the macroalgae specimens.

539 In this study, simultaneous investigations of  $\delta^{15}\text{N}$  in sources and in the water  
540 allowed us to detect those changes. The differences observed between the values of  $\delta^{15}\text{N}$ -  
541  $\text{NO}_3^-$  and  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4^+$  in the water column at the discharge site with the original signals  
542 determined for the N sources were considered as the resulting fractionation  $\gamma$  induced by  
543 mixing and biogeochemical processes. For example, high  $\text{NO}_3^-$  concentrations with low

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

544  $\delta^{15}\text{N}$  values, found in sites at lagoonal habitat receiving freshwater discharges, are  
545 associated to synthetic fertilizers and to the heavy rain flush out of atmospheric N deposited  
546 during the dry months. Later on during dry month seasons,  $\text{NO}_3^-$  concentrations decreased  
547 drastically while  $\delta^{15}\text{N}$  signals increased. A denitrification process can only explain the  $^{15}\text{N}$   
548 enrichment at extreme sites of lagoonal habitat, with non-external source of  $\text{NO}_3^-$ . Low  
549 concentrations or absence of DO,  $\text{H}_2\text{S}$  production and black color sediments by sulphides  
550 precipitation, indicates that the decomposition of organic matter using another electron  
551 acceptor different to oxygen, including the nitrate reduction, is occurring in extensive areas  
552 across the system.

553 The progress of the denitrification reaction and the absence of external  $\text{NO}_3^-$  during  
554 most of the dry season, should consume this electron acceptor totally. However, even when  
555  $\text{NO}_3^-$  levels decreased markedly, it remains on water. This suggests that an internal process  
556 results in the production of nitrates, more probably by nitrification. In areas where  $\text{NH}_4^+$  is  
557 the predominant form N, for example sites at lagoonal-marine habitat receiving treated  
558 sewage and seafood processing effluents (with no direct source of  $\text{NO}_3^-$ ), the high  
559 concentrations of  $\text{NH}_4^+$  and DO in the water and pH and temperature conditions, enhance  
560 the nitrification (Middelburg and Nieuwenhuize 2001). The relatively high concentration of  
561  $\text{NO}_3^-$  in these waters evidenced that nitrification in the water column is simultaneously  
562 occurring with the denitrification in the sediments. In fact, large  $\text{NO}_3^-$  stocks with isotopical  
563 signals higher than anthropogenic (fertilizers and atmospheric) and marine sources  
564 evidenced that nitrification is an important contributor to the  $\text{NO}_3^-$  pool in the ecosystem.  
565 The  $\delta^{15}\text{N}$  signals of  $\text{NO}_3^-$  in areas without a direct source (product) were comparatively

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

566 lower than  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  from sewage and food-processing effluents (reactant), which  
567 indicates a decrease in the signals between the reactant and the product of 6-9‰  
568 (fractionation factor).

569 The role of bacterial processes (e.g. nitrification and denitrification) significantly  
570 modifies the chemical forms of N and their signals, especially in shallow and productive  
571 ecosystems characterized by high residence time, high temperatures and elevated variations  
572 of dissolved oxygen and pH. In Urías, these favorable environmental conditions are present  
573 throughout the year, but particularly during summer (high temperature and salinity, low  
574 dissolved oxygen) enhance the anoxic bacterial processes related to the organic matter  
575 degradation. On the other hand, the enrichment of  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  originally derived from  
576 aquaculture effluents at lagoonal habitat resulted from ammonia volatilization (Mantilla-  
577 Morales 1995).

578 The generally higher  $\delta^{15}\text{N-DIN}$  in the water column and changes in the chemical  
579 forms (from particulate to dissolved, and from organic dissolved to inorganic, and from  
580 ammonium to nitrates) compared to the original sources confirmed the isotopic  
581 fractionation of N within the estuary. Bacteria metabolize preferentially light  $^{14}\text{N}$  isotopes  
582 and the ammonia volatilization removes also preferably  $^{14}\text{N}$  and leaves heavy  $^{15}\text{N}$  isotopes  
583 in the environment (Cifuentes et al. 1989, Cline and Kaplan 1975, Owens 1987, Kellman  
584 and Hillaire-Marcel 1998), which leads to a  $^{15}\text{N}$ -enrichment of DIN in the system. Changes  
585 are enhanced during summer at lagoonal and lagoonal-marine habitats, which receive most  
586 of the terrestrial discharges (domestic, agriculture and aquaculture effluents and runoff) and

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

587 are subject to strong (diurnal and seasonal) environmental changes. Low temporal  
588 variations of  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and their concentrations in the marine habitat is explained by the  
589 intense and rapid mixing of lagoonal and marine waters by tidal currents and waves in the  
590 navigation channel. Overall this well-mixed habitat is less affected by the natural and  
591 anthropogenic perturbations of the biogeochemical cycle of N.

592  *$\delta^{15}\text{N}$  of macroalgae in function of  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in the water column*

593 In this study we wondered if the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values found in different species or  
594 functional groups and inhabiting in different sections of the ecosystem along the year, are  
595 efficient to distinguish N origin. N tissue content correlated with DIN concentration and  
596  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values with  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN suggesting that both parameters measured on  
597 macroalgae reflect changes in N availability in the water. However, no significant  
598 correlation was observed neither  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae with N content nor with DIN  
599 concentration in the water column, which suggested that in these waters in excess of  
600 available N any source is predominant, but it is a complex mixture of N co-occurring with  
601 opposite signals: low for atmospheric and agriculture and high for sewage and seafood  
602 effluents.

603 When we ran a regression analysis between  $\delta^{15}\text{N}$ -sources and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae,  $R^2$   
604 was significant but lower than expected and with elevated data dispersion. The lack of  
605 adjustment suggests that other variables also contributed to the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae variability.  
606 However, the regression analysis between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae showed a more  
607 elevated  $R^2$  and less dispersion compared to models with  $\delta^{15}\text{N}$  in the sources. This



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

608 suggested that  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN explained better the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae variability than  $\delta^{15}\text{N}$  in the  
609 original sources. This relationship was useful to verify that  $\delta^{15}\text{N}$  values in macroalgae  
610 reflect effectively the isotopic signals of the available N in the water column but non-  
611 directly the values of N sources receiving the estuary.

612 Besides the good correlation between  $\delta^{15}\text{N}$ -NID and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae corroborated  
613 also that the prediction model used to calculate the  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in the water was adequate to  
614 integrate the variability of N inputs to the ecosystem and the biogeochemical processes  
615 modifying the N signals (at temporal and spatial scales) during the transport of N to the  
616 adjacent open sea. The control of environmental conditions on biogeochemical processes  
617 and then on  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN was evidenced in our study. Variables such as temperature, salinity,  
618 pH and dissolved oxygen, in addition, to the isotopic signal and concentrations of the  
619 chemical form of N showed a significant effect on  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN variability.

620 On the other hand, we also wondered if physiological response of different  
621 macroalgae species to environmental conditions (e.g. abiotic parameters defined by other N  
622 forms and season and habitat) could also alter the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae signal. It is well known  
623 that environmental conditions (e.g. light, temperature or nutrient concentrations) control the  
624 uptake and growth rates of macroalgae (Taylor et al. 1998, Cohen and Fong 2004, Pedersen  
625 et al. 2004, Dudley and Shima. 2010), but the role on fractionation is not. The effect of  
626 environmental factors on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values by fractionation was also expected. The  
627 higher  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values compared to  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in the water column evidenced that  
628 an isotopic fractionation of N occurs within the organisms. Based on simultaneous analysis

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

629 of  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae in diverse species and functional groups, we observed  
630 that the model components ( $R^2$ , slope and intercept) varied for specific-species and  
631 functional groups. For example, *B. corticulans* and *G. filicina* showed not-correlation with  
632  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN, but *C. sertularioides* and *G. vermiculophylla* corresponding each one to the  
633 same functional group had the highest affinities. Former species uptake N only from the  
634 water column, however because later species collected on sediment surface could also up  
635 take N released from it. Access to different nutrient pools, with different isotope ratios, it  
636 could lead to the observed patterns.

637 In this study, results revealed that several macroalgae species and functional groups  
638 appeared more sensitive than others to changes in environmental conditions and chemical  
639 forms and isotopic composition of N in the water. A comparison among functional groups  
640 showed that  $\delta^{15}\text{N}$  values in macroalgae with the simplest structure (C-Filamentous  
641 uncorticated, C-Tubular) showed a higher affinity with  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN than more complex  
642 structure groups (R-Coarsely upper ramified and R-Filamentous corticated). Besides, the  
643 significant association between the internal content in macroalgae with DIN concentration  
644 in the water, in particular for the C-Filamentous uncorticated indicates that reflect more  
645 efficiently the concentrations and signals of the DIN in the water column. Species with the  
646 simplest structure are also characterized by faster uptake and growth rates (e.g. *C.*  
647 *sertularioides* and *U. intestinalis*), which require shorter time periods to reflect the  $\delta^{15}\text{N}$ -  
648 DIN variations more efficiently (Aguiar et al. 2003, Teichberg et al. 2008). In DIN-  
649 enriched environments, the uptake N mechanisms in faster growing species, such as *Ulva*

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

650 spp., are by diffusive DIN transport (Taylor et al. 1998) that results in a low fractionation.  
651 Thus,  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae is closer to the N signals in the water and better to track N sources.

652 Exceptions were observed for C-Foliose group with a simple structure and but a low  
653  $R^2$  value and for R-Foliose with a high  $R^2$  value and with a complex structure. This  
654 suggests the possible alteration of  $\delta^{15}\text{N}$  values by other inherent macroalgae characteristics,  
655 such as the area:volume ratio, the N uptake ways (water, sediments or both), preference of  
656 the chemical form of N, storage ability large intracellular inorganic N pools, uptake and  
657 releases rates, and transport mechanisms. For example, the combination of passive and/or  
658 active transport mechanisms of DIN that varies among macroalgae species (Taylor et al.  
659 1998) can also induce variations of  $\delta^{15}\text{N}$  values in specimens (Dudley and Shima 2010,  
660 Raimonet et al. 2013). Besides, the role of loss mechanisms of  $^{14}\text{N}$  subsequent to uptake  
661 could also explain  $\delta^{15}\text{N}$  enrichments not-linked to increases in  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN (Dudley and  
662 Shima 2010).

663 Differences among species and functional groups based in their internal structure,  
664 attachment strategies, growing rates, reproduction strategies, preference assimilation for  
665 nitrogen chemical forms, uptake kinetics, storage capacity, and isotopic fractionations of  
666 inorganic elements could explain the interspecific differences in the resulting  $\delta^{15}\text{N}$  signals.  
667 Besides, the high intraspecific variability observed for many species can be explained by  
668 the individual condition of specimens, for example if they are juvenile or adult. But also if  
669 they are growing or in senescence, or depending of the substrate type which they are  
670 attached. Thus, species take up nutrients and  $^{15}\text{N}$  in different ways and with different

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

671 chemical forms and rates of growth (e.g. Fong et al. 2001, Cohen and Fong 2004) resulting  
672 in variations of  $\delta^{15}\text{N}$  values and differences among them.

673         Based on our results, it is evident that the  $\delta^{15}\text{N}$  values were not exactly the same  
674 among species (interspecific variability) and functional groups collected at the same habitat  
675 and season. Moreover, the effect of habitat and season was to decrease  $\delta^{15}\text{N}$  for several  
676 species (e.g. *G. filicina* and *C. sertularioides*) but to increase it in others (e.g. *U. expansa*  
677 and *U. flexuosa*). This indicates that also the species is an important factor in the variation  
678 of  $\delta^{15}\text{N}$  signals. Even differences were observed among specimens of a same species  
679 (intraspecific variability), for example, the variation of the specimens on  $\delta^{15}\text{N}$  values, in  
680 terms of maturity. The differences observed in the relationships of  $\delta^{15}\text{N}$  values in DIN with  
681  $\delta^{15}\text{N}$  in adult and juvenile macroalgae highlight the possible alteration of  $\delta^{15}\text{N}$  values by  
682 metabolism related to physiological processes, e.g., growth rate variations. However, other  
683 variables such as growth rates were not measured; therefore it was not possible to quantify  
684 its impact. Further work is required to elucidate the role of metabolic processes in  
685 controlling macroalgae  $\delta^{15}\text{N}$  values and to evaluate the net fractionation in macroalgae  
686 considering different environmental conditions.

687         Tissue nutrient content (% N and C:N) in most of the collected specimens revealed  
688 that the nutrient status of the macroalgae were similar to levels found in species growing in  
689 eutrophized areas (Collado-Vides et. al. in press). Even N content found in many  
690 macroalgae specimens are in the range or well above the reported for other blooming  
691 species (Lapointe and Bedford 2010). Thus, high N concentrations in the water column and

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

692 high N content in macroalgae indicated that nutrient limitation was not the control on the  
693 isotopic composition (Anderson and Fourqurean 2003, Fong et al 2003). Another factor  
694 potentially controlling  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae is the possible uptake of DON by macroalgae (e.g.  
695 urea and amino acids) (Tyler et al. 2005). In this study, the DON concentrations were  
696 higher than  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  concentrations, which emphasize the probable contribution of  
697 DON to macroalgae  $\delta^{15}\text{N}$  values. In spite of the fact that quantitative DON loads account  
698 for 20 to 90 % of estuarine N loads (Seitzinger and Sanders 1997), the DON concentrations  
699 are rarely measured and data on the isotopic composition of DON are even scarcer.  
700 Estuarine  $\delta^{15}\text{N}$ -DON generally ranges from 3 and 10.8‰ (Guo et al. 2003). In our study,  
701 we analyzed samples of particulate organic matter for  $\delta^{15}\text{N}$  ranging from 5 to 10‰.  
702 Because mineralization of organic matter does not have effect on the isotopic composition  
703 (non-fractionation) (Kendall 1998), we assumed that  $\delta^{15}\text{N}$ -DON in Urías varies in the same  
704 range. However, studies on spatial-temporal variations of  $\delta^{15}\text{N}$ -DON and DON  
705 concentrations are required to understand the role of DON in modifying  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae  
706 values in coastal ecosystems.

707 *Implications for nitrogen contribution based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique*

708 Nitrogen contributions from diverse sources of N to the Urías lagoon complex, estimated  
709 by load N quantification and based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique, revealed that most of the  
710 N is, firstly derived from atmospheric deposit, seafood processing and sewage, and  
711 secondly from agriculture, shrimp farm and marine adjacent waters. However, the  
712 estimations of N contribution based on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae isotopic mass balance were not

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

713 exactly the same for all specimens exposed to the same N sources, and thus the contribution  
714 percentages changed depending of the habitat, season and functional groups selected for the  
715 analysis. For example, specimens collected at lagoonal habitat and in the rainy season with  
716 the lowest  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae showed more contribution by atmospheric deposit and  
717 agriculture, while those collected at lagoonal-marine habitat during the dry season  
718 displayed the highest values reflecting more influence of sewage and seafood processing  
719 effluents. The isotopic surveys from both seasons show that shrimp farm, seafood  
720 processing and marine sources did not change between seasons. Obviously, the main  
721 predictor of the spatial and temporal variation in macroalgal isotopic ratios, and then in the  
722 contribution percentages, is the changes in the N sources.

723         Although the differences observed in specimens of the same species along the year  
724 (seasons) or through the ecosystem (habitats) may be mainly related to changes in the N  
725 sources, the elevated interspecific and intraspecific variability and the significant  
726 differences observed among co-inhabiting species could not be explained by changes in the  
727 N sources. But the stable-isotopic ratios of macroalgae may also vary due to the influence  
728 of other factors independent of the N sources, such as the above mentioned estuarine  
729 processes, mainly reactions related to N cycle that modify the concentrations, chemical  
730 forms and isotopic composition of available N in the water column. These processes are  
731 often ignored in the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique application because most of the studies  
732 have been done in temperate coastal ecosystems (e.g. Savage and Elmgren, 2004).  
733 However, in subtropical environments the favorable conditions for nitrification,  
734 denitrification and ammonia volatilization (e.g. temperature, salinity, dissolved oxygen and

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

735 pH) fractionate the  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN values in the water column. Denitrification processes in the  
736 coastal ecosystems produce  $\delta^{15}\text{N}$  fractionation from 25 to 30‰, ammonia volatilization  
737 20‰, and nitrification -20‰ (Mariotti et al. 1981, Sigman et al. 2001, Swart et al. 2008).

738 Most of the published studies analyzing stable isotopes of N in macroalgae for the  
739 identification N sources are focused only in the mean isotopic signatures, but not in the  
740 analysis of isotopic variance among individuals, species or functional groups. In fact,  
741 measurements of this variation are rarely reported in the literature. In our study we focused,  
742 not only in the mean isotopic signatures, but also in the analysis of isotopic variance among  
743 individuals, species and functional groups exposed to same sources of N. The large stock of  
744 samples of this study allowed us to quantify the variability of N isotope ratios measured on  
745 macroalgae specimens corresponding to 45 species considered as ephemeral, pseudo-  
746 perennial and/or opportunist.

747 For example, when we compared the functional groups, we observed that C-Foliose  
748 and C-Tubular reflected  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae signals were different to the other groups and  
749 there were, differences in the percentages of contribution of N sources. Differences among  
750 functional groups collected at the same habitat and season and thus exposed to the same  
751 sources, can be attributed to metabolic differences. Specimens of *C. sertularioides* collected  
752 at lagoonal-marine habitat during the rainy season displayed differences close to 10‰  
753 respect to other species. If we consider that the available N (chemical form, concentration  
754 and isotopic composition) is the same for all specimens (because they are exposed to the  
755 same environmental condition and sources of N), the variations in their  $\delta^{15}\text{N}$  values are

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

756 obviously related to the differences among species of macroalgae. Thus, we assumed that  
757 physiological processes also affect distinctly the  $\delta^{15}\text{N}$  value in tissues among macroalgae  
758 species by differentiate fractionation factors. Even the condition of their specimens as was  
759 observed in the comparison between juvenile and adult of *G. vermiculophylla* collected at  
760 the same site and moment. Besides, the variations of environmental conditions modifying  
761 the uptake and growth rates of the different macroalgae species (Taylor et al. 1998, Cohen  
762 and Fong 2004, Pedersen et al. 2004, Dudley and Shima 2010), could enhance even more  
763 their fractionation factors. However, few fractionation studies exist on macroalgae (Cohen  
764 and Fong 2004, Dudley and Shima. 2010) and even scarcer are those studies on the role of  
765 environmental factors (e.g. T, S, DO, light or nutrient concentrations) in modifying  $\delta^{15}\text{N}$ -  
766 macroalgae (Dudley and Shima 2010, Raimonet et al. 2013). Thus, a better understanding  
767 of the control of environmental parameters on macroalgae fractionation is required.

768         The application of isotopic tools to distinguish N sources has showed to have high  
769 predictive power, when: a) only a one or two sources are important and those sources have  
770 distinct isotopic signatures, b) the spatial-temporal environmental condition and sources of  
771 N and their  $\delta^{15}\text{N}$  signals are relatively stables, c) only one or few macroalgae species are  
772 used as biomonitores, preferentially perennial species. However, our results imply in  
773 coastal ecosystems receiving multiples N sources, with changing environmental conditions,  
774 simultaneous biogeochemical processes co-occurring, and high diversity of macroalgae  
775 species but absence of perennial, the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique is less sensitivity and with  
776 less predictive power. The isotopic variability is more elevated due to the confounding  
777 factors evidenced that environmental condition (e.g. habitat and season) had significant



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

778 effect on  $\delta^{15}\text{N}$  values of macroalgae and thus in the estimation of the contribution of the N  
779 sources. In conclusion, the multiple N sources and biogeochemical reactions co-occurring  
780 produce a mixture of chemical species of N and of their isotopic compositions, besides the  
781 macroalgae metabolism (high diversity of species, 45), explained the elevated variability  
782 and lack of fitness. Under these conditions it is more difficult to trace the sources and to  
783 estimate the relative contribution. Even so, the  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae technique is the most  
784 useful available tool to quantify the relative contributions of N derived from different  
785 sources.

#### 786 **Acknowledgements**

787 The authors would like to thank to H. Bojórquez-Leyva, Y. Montaña-Ley, V. Montes-  
788 Montes, A. Cruz-López, S. Meraz-González and R. Velázquez-Ochoa for their invaluable  
789 assistance in the field and laboratory work. Financial support was provided by the grant  
790 UNAM-PAPIIT IN206409.

#### 791 **References**

- 792 Abbott, I. A. & Hollenberg G. J. 1976. Marine algae of California. Stanford. University Press.  
793 827 pp.
- 794 Aguiar, A. B., Morgan, J. A., Teichberg, M., Fox, S. & Valiela, I. 2003. Transplantation  
795 and isotopic evidence of the relative effects of ambient and internal nutrient supply on  
796 the growth of *Ulva lactuca*. Biol. Bull. 205:250–251.
- 797 Anderson, C. & Cabana, G. 2005.  $\delta^{15}\text{N}$  in riverine food webs: effects of N inputs from  
798 agricultural watersheds. Can. J. Fish Aquat. Sci. 62:333–340.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 799 Anderson W. T. & Fourqurean J. W. 2003. Intra- and interannual variability in seagrass  
800 carbon and nitrogen stable isotopes from south Florida, a preliminary study. *Org.*  
801 *Geochem.* 34:185–194.
- 802 Balata, D., Piazzzi, L. & Rindi, F. 2011. Testing a new classification of morphological  
803 functional groups of marine macroalgae for the detection of responses to stress. *Mar.*  
804 *Biol.* 158:2459–2469.
- 805 Castro, M., Driscoll, C. 2002. Atmospheric nitrogen deposition to estuaries in the mid-  
806 Atlantic and northeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 36:3242–3249.
- 807 Cifuentes, L. A., Fogel, M. L., Pennock, J. R., Sharp, J. H. 1989. Biogeochemical factors  
808 that influence the stable nitrogen isotope ratio of dissolved ammonium in the Delaware  
809 Estuary. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 53:2713–2721.
- 810 Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community  
811 structure. *Austr. Ecol.* 18:117–143.
- 812 Cline, J. D. & Kaplan, I. R. 1975. Isotopic fractionation of dissolved nitrate during  
813 denitrification in the eastern tropical North Pacific Ocean. *Mar. Chem.* 3:271–299.
- 814 Cohen, R. A. & Fong P. 2004. Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha*  
815 *intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using  $^{15}\text{N}$  to determine preference during  
816 simultaneous pulses of nitrate and ammonium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309:60–67.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 817 Cohen, R. A. & Fong, P. 2005. Experimental evidence supports the use of  $\delta^{15}\text{N}$  content of  
818 the opportunistic green macroalga *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) to  
819 determine nitrogen sources to estuaries. *J. Phycol.* 41:287–293.
- 820 Collado-Vides, L., Avila, C., Blair, S., Leliaert, F., Rodriguez, D., Thyberg, T., Schneider,  
821 S., Rojas, J., Sweeney, P., Drury, C. & Lirman, D. 2013. A persistent bloom of  
822 *Anadyomene* J.V. Lamouroux (Anadyomenaceae, Chlorophyta) in Biscayne Bay,  
823 Florida. *Aquat. Bot.* Article in press.
- 824 Comisión Nacional del Agua (CNA), 2012. Organismo de Cuenca Norte. Servicio  
825 Meteorológico Nacional. Datos estadísticos climatológicos del Observatorio  
826 Meteorológico de Mazatlán, Sinaloa, México.
- 827 Costanzo, S. D., O'Donohue, M. J., Dennison, W. C., Loneragan, N. R. & Thomas, M.  
828 2001. A new approach for detecting and mapping sewage impacts. *Mar. Pollut. Bull.*  
829 42:149–156.
- 830 Costanzo, S. D., O'Donohue, M. J., Dennison, W. C. 2003. Assessing the seasonal influence  
831 of sewage and agricultural nutrient inputs in a subtropical river estuary. *Estuaries*  
832 26:857–865.
- 833 Costanzo, S. D., Udy, J., Longstaff, B. & Jones, A. 2005. Using nitrogen stable isotope  
834 ratios ( $\delta^{15}\text{N}$ ) of macroalgae to determine the effectiveness of sewage upgrades: changes  
835 in the extent of sewage plumes over four years in Moreton Bay, Australia. *Mar. Pollut.*  
836 *Bull.* 51:212-217.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 837 Dailer, L. M. L., Knox, R. S., Smith, J. E., Napier, M. & Smith, C. M. 2010. Using  $\delta^{15}\text{N}$   
838 values in algal tissue to map locations and potential sources of anthropogenic nutrient  
839 inputs on the island of Maui, Hawaii, USA. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (5):655–671.
- 840 Deutsch, B. & Voss, M. 2006. Anthropogenic nitrogen input traced by means of  $\delta^{15}\text{N}$   
841 values in macroalgae: results from in-situ incubation experiments. *Sci. Total Environ.*  
842 366: 799–808.
- 843 Driscoll, C., Whittall, D., Aber, J., Boyer, E., Castro, M. & Cronan C. 2003. Nitrogen  
844 pollution in the Northeastern United States: sources, effects and management options.  
845 *Bioscience* 53:357–374.
- 846 Duarte, P. 1995. A mechanistic model of the effects of light and temperature on algal  
847 primary productivity. *Ecol. Model.* 82:151–160.
- 848 Dudley, B. D. & Shima, J. S. 2010. Algal and invertebrate bioindicators detect sewage  
849 effluent along the coast of Titahi Bay, Wellington, New Zealand. *New. Zeal. J. Mar.*  
850 *Fresh.* 44 (1):39–51
- 851 Dufrene, M. & Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species. The need for  
852 a flexible asymmetrical approach. *Ecol. Monogr.* (67) 3:345–366.
- 853 Enríquez, S., Duarte C. M. & Sand-Jensen, K. 1993. Patterns in decomposition rates among  
854 photosynthetic organisms: the importance of detritus C:N:P content. *Oecologia*  
855 94:457–471.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 856 Fong, P., Kamer, K., Boyer, K. E. & Boyle, K. A. 2001. Nutrient content of macroalgae  
857 with differing morphologies may indicate sources of nutrients to tropical marine  
858 systems. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 220:137–152.
- 859 Fong, P., Boyer, K. E., Kamer, K. & Boyle, K. A. 2003. Influence of initial tissue nutrient  
860 status of tropical marine algae on response to nitrogen and phosphorus additions. *Mar.*  
861 *Ecol. Progr. Ser.* 262:111–123.
- 862 García-Pagés, M. A. E. 2007. Impacto relativo de las fuentes de nitrógeno en el sistema  
863 lagunar Altata-Ensenada del Pabellón, mediante el estudio de las relaciones isotópicas  
864 de C y N. Tesis de Maestría. UNAM, ICMYL, Mazatlán, Sinaloa. 90 pp.
- 865 Gartner, A., Lavery, P. & Smith, A. J. 2002. Use of  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of different functional  
866 forms of macroalgae and filter-feeders to reveal temporal and spatial patterns in  
867 sewage disposal. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 235:63–73.
- 868 Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. & Imhoff, J. F. 2010. Chemical interactions between  
869 marine macroalgae and bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 409:267–300.
- 870 Graham, L. E. & Wilcox, L. W. 2000. *Algae*. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. 695 pp.
- 871 Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. 1983. *Methods of seawater analysis*. 2da. Ed.  
872 Weinheim. Verlag Chemie. 419 pp.
- 873 Guo, L., Tanaka, N., Schell, D. M. & Santschi, P. H. 2003. Nitrogen and carbon isotopic  
874 composition of high-molecular-weight dissolved organic matter in marine  
875 environments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 252:51–60.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 876 Harris, D., Horwath, R. & Van Kessel, C. 2001. Acid fumigation of soils to remove  
877 carbonates prior to total organic carbon or carbon-13 isotopic analysis. *Soil Sci. Soc.*  
878 *Am. J.* 65:1853–1856.
- 879 Heaton, T. H. E., 1986. Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and  
880 atmosphere: A review. *Chem. Geol.* 59:87–102.
- 881 Holmes, R. M., McClelland, J. W., Sigman, D. M., Fry, B. & Petersen, B. J. 1998.  
882 Measuring  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the  
883 ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Mar.*  
884 *Chem.* 60:235–243.
- 885 Howarth, R. W. 2008. Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally  
886 and regionally. *Harmful Algae* 8:14–20.
- 887 Johansson, G. Eriksson, B. K., Pedersen, M. & Snoeijs, P. 1998. Long-term changes of  
888 macroalgal vegetation in the Skagerrak area. *Hydrobiologia* 385:121–138.
- 889 Kendall, C. 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In: Kendall, C.,  
890 McDonnell, J.J. (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier,  
891 Amsterdam, pp. 519–576.
- 892 Kellman, L. & Hillaire-Marcel, C. 1998. Nitrate cycling in streams: Using natural  
893 abundances of  $\text{NO}_3^-/\delta^{15}\text{N}$  to measure in-situ denitrification. *Biochemistry* 43:372–292.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 894 Lapointe, B. E., Barile, P. J. & Matzie, W. R. 2004. Anthropogenic nutrient enrichment of  
895 seagrass and coral reef communities in the lower Florida keys: discrimination of local  
896 versus regional nitrogen sources. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308:23–58.
- 897 Lapointe, B. E. & Bedford, B. J. 2010. Ecology and nutrition of invasive *Caulerpa*  
898 *brachypus* f. *parvifolia* blooms on coral reefs off southeast Florida, U.S.A. *Harmful*  
899 *Algae* 9:1–12.
- 900 Lin, D. T. & Fong, P. 2008. Macroalgal bioindicators (growth, tissue N,  $\delta^{15}\text{N}$ ) detect  
901 nutrient enrichment from shrimp farm effluent entering Opunohu Bay, Moorea, French  
902 Polynesia. *Mar. Pollut. Bull.* 56:245–249.
- 903 Mantilla-Morales, G. 1995. Modélisation des transferts de nitrates, confrontation des  
904 concepts, des données et des informations : application au bassin de la Charente. Ph.D.  
905 Thesis, Cemagref, Antony, France, 179 pp.
- 906 Mariotti, A., Germon, J. C., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R. 1981. Experimental  
907 determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for  
908 the denitrification and nitrification processes. *Plant. Soil.* 62:413–430
- 909 McClelland, J. W. & Valiela, I. 1997. Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food  
910 webs: A record of increasing urbanization in coastal watersheds. *Limnol. Oceanogr.* 42  
911 (5):930–937.
- 912 McClelland, J. W. & Valiela, I. 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-  
913 derived sources. *Limnol. Oceanogr.* 43:577–585.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 914 McGlathery, K. J., Pedersen, M. F. & Borum, J. 1996. Changes in intracellular nitrogen  
915 pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta).  
916 J. Phycol. 32:393–401.
- 917 Middelburg J. J. & Nieuwenhuize, J. 2001. Nitrogen isotope tracing of dissolved inorganic  
918 nitrogen behavior in tidal estuaries. Estuar. Coast. Shelf. S. 53:385–391.
- 919 Montaña-Ley, Y., Peraza-Vizcarra, R. & Páez-Osuna, F. 2008. Tidal hydrodynamics and  
920 their implications for the dispersion of effluents in Mazatlán Harbor: An urbanized  
921 shallow coastal lagoon. Water Air Soil Poll. 194:343–357.
- 922 Moore, J. W. & Semmens, B. X. 2008. Incorporating uncertainty and prior information into  
923 stable isotope mixing models. Ecol Letters 11:470–480.
- 924 Ochoa-Izaguirre, M. J., Aguilar-Rosas, R. & Aguilar-Rosas, L. E. 2007. Catálogo de  
925 Macroalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. Páez-Osuna, F. (Ed.) Instituto de  
926 Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mazatlán, Sinaloa, México. Serie lagunas  
927 costeras de Sinaloa 117 pp.
- 928 Owens, N. J. P. 1987. Natural variations in  $^{15}\text{N}$  in the marine environment. Adv. Mar. Biol.  
929 24:390–451.
- 930 Páez-Osuna, F., Ramírez-Reséndiz, G., Ruiz-Fernández, A.C., Soto-Jiménez, M.F. 2007.  
931 La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: flujos, fuentes, efectos y  
932 opciones de manejo. Páez-Osuna, F. (ed.) Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,  
933 UNAM, México. Serie lagunas costeras de Sinaloa. 117 pp.



$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 934 Paerl, H. W. & Fogel, M. L. 1994. Isotopic characterization of atmospheric nitrogen inputs  
935 as sources of enhanced primary production in coastal Atlantic Ocean waters. 1994.  
936 Mar. Biol. 119:635-645.
- 937 Pedersen, M. F., Nielsen, S. L. & Banta, G. T. 2004. Interactions between vegetation and  
938 nutrient dynamics in coastal marine ecosystems: an introduction. In: Nielsen, S.L.,  
939 Banta, G.T., Pederson, M.F. (Eds.), Estuarine Nutrient Cycling: The Influence of  
940 Primary Producers. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1–15.
- 941 Piñón-Gimate, A., Soto-Jiménez, M. F., Ochoa-Izaguirre, M. J., García-Pagés, E. & Páez-  
942 Osuna, F. 2009. Macroalgae blooms and  $\delta^{15}\text{N}$  in subtropical coastal lagoons from the  
943 Southeastern Gulf of California: Discrimination among agricultural, shrimp farm and  
944 sewage effluents. Mar. Poll. Bull. 58 (8):1144–1151.
- 945 Raimonet M., Guillou G., Mornet F. & Richard P. 2013. Macroalgae  $\delta^{15}\text{N}$  values in well-  
946 mixed estuaries: Indicator of anthropogenic nitrogen input or macroalgae metabolism?  
947 Estuar. Coast. Shelf. S. 119:126–138.
- 948 Risk, M. J., Lapointe, B. E., Sherwood, O. A. & Bedford, B. J. 2009. The use of  $\delta^{15}\text{N}$  in  
949 assessing sewage stress on coral reefs. Mar. Poll. Bull. 58:793–802.
- 950 Savage, C. & Elmgren, R. 2004. Macroalgal (*Fucus vesiculosus*)  $\delta^{15}\text{N}$  values trace  
951 decrease in sewage influence. Ecol. Appl. 14:517–526.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 952 Sebiló, M., Billen, G., Mayer, B., Billiou, D., Grably, M., Garnier, J., Mariotti, A. 2006.  
953 Assessing nitrification and denitrification in the Seine River and Estuary using  
954 chemical and isotopic techniques. *Ecosystems*. 9:564–577.
- 955 Seitzinger, S. P. & Sanders, R.W. 1997. Contribution of dissolved or- ganic nitrogen from  
956 rivers to estuarine eutrophication. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 159:1–12.
- 957 Sigman, D. M., Altabet, M. A., Michener, R., McCorklr, D. C., Fry, B. & Colmes, R. M.  
958 1997. Natural abundant-level measurement of the nitrogen isotopic composition of  
959 oceanic nitrate: an adaptation of the ammonia diffusion method. *Mar. Chem.* 57:227–  
960 242.
- 961 Sigman, D. M., Casciotti, K. L., Andreani, M., Barford, C., Galanter, M. & Bohlke J.K.  
962 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and  
963 freshwater. *Anal. Chemi. Anal. Chem.* 73 (17):4145–4153.
- 964 Steneck, R. S. & Dethier, M. N., 1994. A functional group approach to the structure of  
965 algal dominated communities. *Oikos* 69:476–498.
- 966 Strauch, G., Möder, M., Wennrich, R., Osenbrück, K., Gläser, H. R., Schladitz, T., Müller,  
967 C., Schirmer, K., Reinstorf, F. & Schirmer, M. 2008. Indicators for assessing  
968 anthropogenic impact on urban surface and groundwater. *J Soils Sediments* 8 (1):23–  
969 33.
- 970 Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis.  
971 Canada. Fisheries. Research. Board of Canada Bulletin 167, 311 pp.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

- 972 Swart, P.K., Evans, S. & Capo, T. 2008. The origin of nitrogen isotope values in algae. A  
973 research project conducted by the stable isotope laboratory. University of Miami.  
974 Technical Report EPA 20080501. 29 pp.
- 975 Taylor, R., Peek, J. T. A. & Rees, T. A. V. 1998. Scaling of ammonium uptake by  
976 seaweeds to surface area:volume ratio: geographical variations and role of uptake by  
977 passive diffusion. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 169:143–148.
- 978 Teichberg, M., Fox, S. E., Aguila, C., Olsen, Y. S. & Valiela, I. 2008. Macroalgal  
979 responses to experimental nutrient enrichment in shallow coastal waters: growth,  
980 internal nutrient pools, and isotopic signatures. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 368:117–126.
- 981 Tyler, A. C., McGlathery, K. J. & Macko, S. A. 2005. Uptake of urea and amino acids by  
982 the macroalgae *Ulva lactuca* (Chlorophyta) and *Gracilaria vermiculophylla*  
983 (Rhodophyta). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 294:161–172.
- 984 Valiela, I., Collins, G., Kremer, J., Lajtha, K., Geist, M., Seely, B., Brawley, J. & Sham, C.  
985 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: new method  
986 and application. *Ecol. Appl.* 7:358–380.
- 987 Valiela I, Bowen J. L. & Kroeger K. D. 2002. Assessment of models for estimation of land-  
988 derived nitrogen loads to shallow estuaries. *Appl. Geoch.* 17(7):935–953.
- 989 Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Jackson, J.  
990 B. C., Lotze, H. K., Micheli, F., Palumbi, S. R., Sala, E., Selkoe, K. A., Stachowicz, J.  
991 J. & Watson, R., 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services.  
992 *Science* 314:787–790.

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

993

994

995

996 *Figure captions*

997 Figure 1. Sampling sites in Urías lagoon (SE Gulf of California) represented by circled  
998 numbers. Collection samples of effluents from different human activities considered as  
999 nitrogen sources (represented by a square), including: thermoelectric plant (fossil fuel  
1000 combustion), agriculture fields (use of artificial N fertilizers), seafood processing plants,  
1001 sewage from urban areas (partially treated and untreated domestic), shrimp farms (untreated  
1002 effluents), naval activities discharges (cruise, tankers, bulk-carriers, container, warships and  
1003 fishing vessels) and rainwater collection stations.

1004 Figure 2. Temporal variability of N isotopic values in representative species of macroalgae  
1005 collected at the Urías coastal lagoon: a) lagoonal habitat, b) lagoonal-marine habitat and c)  
1006 marine habitat.

1007 Figure 3. Relationships between isotopic composition of N in juveniles and adults  
1008 specimens of *G. vermiculophylla* and *C. sertularioides*.

1009 Figure 4. Relative contribution of N sources in  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae classified by habitat and  
1010 season: a) dry season, b) rainy season; and classified by functional groups: c) Chlorophyta  
1011 taxa and d) Rhodophyta taxa.

1012

$\delta^{15}\text{N}$  macroalgal variability to detect N sources

1013

1014 Table 1. Nitrogen loads (in tons per year and percentage) and isotopic composition (‰) in N  
 1015 sources receiving Uriás coastal lagoon. Isotopic fractionation based on the isotopic differences  
 1016 between the observed values at water column and the original source signals.

Nitrogen sources	N loading (ton y <sup>-1</sup> , %)	$\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ (‰)		$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ (‰)	
		Source	Fractionation	Source	Fractionation
Shrimp farm	33-52, 6.5	8.0±1.0 <sup>D</sup>	5.5±3.9	6.7±4.9 <sup>A,B</sup>	3.0±2.1
Fertilizers	97.4, 14	2.1±0.70 <sup>E</sup>	0.91±2.4	2.1±0.70 <sup>C</sup>	6.3±1.6
Sewage	195.2, 27	16.1±0.3 <sup>B</sup>	3.6±4.9	8.2±1.9 <sup>A</sup>	1.6±3.1
Seafood processing	>74.6, 10.5	19.1±0.7 <sup>A</sup>	1.4±0.79	8.2±3.3 <sup>A</sup>	2.1±1.0
Atmospheric	203, 29	11.8±4.3 <sup>C</sup>	—	-13.8±3.9 <sup>D</sup>	—
Urban runoff		12.9±1.8 <sup>C</sup>	—	2.8±1.4 <sup>C</sup>	—
Oceanic	94.1, 13	1.9±0.8 <sup>F</sup>	1.11±0.39	3.7±1.8 <sup>B</sup>	3.2±1.8

1017 —Not determined. Different letters in superscript following values indicate significant differences  
 1018 (p<0.05; Tukey's HSD).

Table 2. Physical (precipitation and evaporation rates, residence time and tidal velocity, temperature) and chemical (salinity, pH, dissolved oxygen) characteristics, concentrations of chemical forms of N (nitrates, ammonium, ammonia, TDN, DON) and isotopic composition of N ( $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ ,  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ,  $\delta^{15}\text{N-DIN}$ ) in the water column from Urías lagoon complex. Average, standard deviation and range.

	Dry season			Rainy season		
	Lagoonal	Lagoonal-Marine	Marine	Lagoonal	Lagoonal-Marine	Marine
Precipitation (mm month <sup>-1</sup> )	40.4±49.2(0.00-121) <sup>B</sup>	40.4±49.2(0.0-121) <sup>B</sup>	40.4±49.2(0.00-121) <sup>B</sup>	195±7.3(183-204) <sup>A</sup>	195±7.3(183-204) <sup>A</sup>	195±7.3(183-204) <sup>A</sup>
Evaporation (mm month <sup>-1</sup> )	107±18.5(86.7-157) <sup>B</sup>	107±18.5(86.7-157) <sup>B</sup>	107±18.5(86.7-157) <sup>B</sup>	171±20(137-189) <sup>A</sup>	171±20(137-189) <sup>A</sup>	171±20(137-189) <sup>A</sup>
Residence time (day)	70.3±53.2(3.8-198.7) <sup>A</sup>	11.3±10.1(3.8-36.9) <sup>B</sup>	5.2±0.4(3.8-5.2) <sup>B</sup>	74.5±50.8(36.9-198.7) <sup>A</sup>	9.0±9.3(3.8-36.9) <sup>B</sup>	4.9±0.3(4.1-5.2) <sup>Z</sup>
Tidal velocity (m s <sup>-1</sup> )	0.067±0.02(0.02-0.06) <sup>C</sup>	0.36±0.21(0.06-0.60) <sup>B</sup>	0.46±0.05(0.44-0.60) <sup>A</sup>	0.04±0.02(0.01-0.06) <sup>C</sup>	0.42±0.19(0.06-0.60) <sup>A,B</sup>	0.44±0.09(0.26-0.60) <sup>A,B</sup>
Temperature (°C)	26.0±3.31(20.0-33.2) <sup>C</sup>	27.3±2.53(23.4-34.7) <sup>B</sup>	27.1±2.71(23.0-31.6) <sup>B,C</sup>	31.08±1.43 (28.7-34.0) <sup>A</sup>	32.19±1.52 (29.0-34.9) <sup>A</sup>	31.2±1.20(29.0-32.7) <sup>A</sup>
Salinity (ups)	36.5±4.83(20.0-43.2) <sup>A</sup>	35.5±2.12(28.0-39.0) <sup>B</sup>	35.6±1.1(32.0-38.0) <sup>A,B,C</sup>	34.4±0.86(33.3-36.6) <sup>C,D</sup>	34.2±0.63(33.4-37.0) <sup>D</sup>	34.6±4.83(20-43.2) <sup>B,C,D</sup>
Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )	6.65±2.74(2.32-11.6) <sup>A,B</sup>	6.4±2.04(2.38-10.1) <sup>A,B,C</sup>	6.96±0.59(5.59-8.98) <sup>A</sup>	4.54±1.07(3.28-7.15) <sup>D</sup>	5.88±2.16(2.57-10.25) <sup>C</sup>	5.52±1.9(2.34-7.99) <sup>B,C,D</sup>
pH	7.80±0.22(7.40-8.17) <sup>C</sup>	7.85±0.24(7.31-8.54) <sup>B,C</sup>	7.94±0.21(7.49-8.29) <sup>A</sup>	7.94±0.28(7.09-8.53) <sup>A,B</sup>	7.83±0.25(7.09-8.48) <sup>B,C</sup>	7.9±0.17(7.65-8.16) <sup>A,B,C</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg L <sup>-1</sup> )	41.5±26.9(0.3-113.5) <sup>C</sup>	43.1±45.8(0.3-399.7) <sup>C</sup>	37.4±53.6(0.3-284.6) <sup>C</sup>	120.8±86.2(6.7-354.2) <sup>A</sup>	89.6±49.2(1.3-197.0) <sup>B</sup>	55.8±45.2(0.3-155.4) <sup>C</sup>
NH <sub>3</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	1.41±1.60(0.0-8.64) <sup>C</sup>	1.98±3.65(0.0-31.9) <sup>C</sup>	1.71±3.19(0.0-20.53) <sup>C</sup>	9.16±9.51(0.2-38.7) <sup>A</sup>	5.31±4.74(0.0-25.61) <sup>B</sup>	3.60±4.15(0.0-13.87) <sup>B,C</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μg L <sup>-1</sup> )	87.7±68.4(10.6-459) <sup>A</sup>	91.1±87.9(7.7-340.0) <sup>A</sup>	72.0±68.4(5.7-234.5) <sup>A,B</sup>	73.2±42.1(28.5-169) <sup>A,B</sup>	72.1±49.6(9.8-196.2) <sup>A,B</sup>	34.6±18.6(3.3-80.8) <sup>B</sup>
DON (μg L <sup>-1</sup> )	323±250(70.2-1085) <sup>B</sup>	364±434(23.4-3441) <sup>B</sup>	270±315(61.6-1160) <sup>B</sup>	1001±519(234-2787) <sup>A</sup>	1186±1005(110-4944) <sup>A</sup>	1114±823(153-2433) <sup>A</sup>
TDN (μg L <sup>-1</sup> )	453±246(185.7-1593) <sup>B</sup>	498±458(157-3861) <sup>B</sup>	380±317(127-1233) <sup>B</sup>	1195±538(458-3102) <sup>A</sup>	1348±1014(181-5111) <sup>A</sup>	1205±835(228-2543) <sup>A</sup>
$\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ (‰) at water	16.99±2.52(9.0-27.69) <sup>B</sup>	18.78±2.64(9.0-23.60) <sup>A</sup>	16.6±2.47(14.5-21.0) <sup>B</sup>	13.69±3.27(9.0-20.23) <sup>C</sup>	19.18±1.58(15.3-23.6) <sup>A</sup>	17.9±2.81(14.6-20.9) <sup>A</sup>
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ (‰) at water	9.57±4.31(2.10-20.41) <sup>A</sup>	10.45±4.1(2.12-17.43) <sup>A</sup>	10.5±4.05(5.53-14.20) <sup>A</sup>	3.21±2.32(0.85-14.39) <sup>C</sup>	5.80±3.90(2.10-15.35) <sup>B</sup>	7.11±3.34(5.53-16.8) <sup>B</sup>
$\delta^{15}\text{N-DIN}$ (‰) at water	12.58±3.18(1.27-19.8) <sup>B</sup>	13.88±3.02(1.67-20.3) <sup>A</sup>	13.38±2.64(5.9-19.9) <sup>A,B</sup>	8.57±3.62(0.49-16.32) <sup>C</sup>	13.3±3.82(1.04-19.1) <sup>A,B</sup>	13.3±2.00(9.28-18.0) <sup>A,B</sup>

Different letters in superscript following values indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey's HSD).

Table 3. Results of three-way ANOVA on  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN depending on interacting environmental factors (temperature, salinity, dissolved oxygen, and pH) and chemical forms ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) and isotopic composition of N ( $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4^+$  and  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NO}_3^+$ ) in the water column.

Factors	F	Prob > F
Dissolved oxygen	8.2008	0.0043
pH	15.4318	<0.0001
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	7.3525	0.0069
Salinity	6.5232	0.0109
$\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4^+$	346.3835	<0.0001
$\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NO}_3^+$	1506.266	<0.0001
$\text{NH}_4^+$	21.568	<0.0001
$\text{NO}_3^-$	18.147	<0.0001
$\text{NH}_3$	16.1811	<0.0001

Table 4. Regression analysis among environmental parameters temperature (T, °C), salinity (S, ups), and chemical forms of N including total dissolved (TDN), dissolved organic and inorganic N (DON and DIN), nitrates+nitrites and ammonium (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), content of N and C (in  $\text{mg g}^{-1}$ ) and C:N ratio in macroalgae and isotopic composition of N and C (in ‰). Only significant  $R^2$  included.

Relationship	$R^2$	F ratio	Prob>F
$\text{Log}(\text{TDN}) = 1.44 + 0.164 * T$	0.24	10.327	0.003
$\text{Log}(\text{DON}) = 0.605 + 0.192 * T$	0.52	37.48	<0.0001
$\text{Log}(\text{NH}_4^+) = 0.569 + 0.112 * T$	0.24	11.00	0.0021
$\text{Log}(\text{NO}_3^-) = 6.593 - 0.083 * T$	0.12	4.353	0.045
$\text{Log}(\delta^{15}\text{N-NO}_3^-) = 4.876 - 0.107 * T$	0.25	11.18	0.002
$\text{Log}(\text{TDN}) = 19.511 - 0.375 * S$	0.38	19.26	0.000
$\text{Log}(\text{DON}) = 11.83 - 0.161 * S$	0.12	4.63	0.039
$\text{Log}(\text{NO}_3^-) = -4.258 + 0.242 * S$	0.27	12.32	0.001
$\text{Log}(\delta^{15}\text{N-NO}_3^-) = -5.09 + 0.193 * S$	0.25	10.73	0.003
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = 25.768 - 3.024 * \text{Log}(\text{DON})$	0.47	30.59	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = -0.453 + 1.826 * \text{Log}(\text{NO}_3^-)$	0.15	5.46	0.026
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = 19.145 - 3.106 * \text{Log}(\text{NH}_4^+)$	0.37	19.87	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = 23.401 - 2.597 * \text{Log}(\text{TDN})$	0.52	35.09	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-DIN} = 16.45 - 0.748 * \text{Log}(\text{TDN})$	0.12	4.56	0.041
$\delta^{15}\text{N-DIN} = 1.61 + 0.629 * \delta^{15}\text{N-NH}_4^+$	0.26	12.308	0.001
$\delta^{15}\text{N-DIN} = 9.73 + 0.318 * \delta^{15}\text{N-NO}_3^-$	0.25	11.453	0.002
$\text{N-macroalgae} = 27.66 + 2.4 * \text{Log}(\text{NH}_4^+)$	0.30	69.75	<0.0001
$\text{N-macroalgae} = 30.36 + 1.41 * \text{Log}(\text{NO}_3^-)$	0.13	13.44	0.0003
$\text{N-macroalgae} = 23.92 + 1.971 * \text{Log}(\text{TDN})$	0.15	17.27	<0.0001
$\text{N-macroalgae} = 20.01 + 3.458 * \text{Log}(\text{DIN})$	0.26	53.28	<0.0001
$\text{N-macroalgae} = 29.96 + 1.073 * \text{Log}(\text{DON})$	0.11	9.06	0.0022
$\text{C:N-macroalgae} = 8.83 + 0.374 * (\delta^{15}\text{N-NO}_3^-)$	0.15	5.95	0.020
$\text{C:N-macroalgae} = 18.64 - 1.89 * \text{Log}(\text{NH}_4^+)$	0.14	5.88	0.021
$\text{C:N-macroalgae} = 24.17 - 2.61 * \text{Log}(\text{DIN})$	0.15	6.25	0.017
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 9.47 + 0.351 * [\delta^{15}\text{N-NO}_3^-]_{\text{source}}$	0.26	12.49	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 8.16 + 0.266 * [\delta^{15}\text{N-NH}_4^+]_{\text{source}}$	0.07	34.69	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 10.04 + 0.331 * [\delta^{15}\text{N-NO}_3^-]_{\text{water}}$	0.33	16.78	0.0002
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 0.818 + 0.67 * [\delta^{15}\text{N-NH}_4^+]_{\text{water}}$	0.36	19.52	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 3.92 + 0.711 * [\delta^{15}\text{N-DIN}]_{\text{water}}$	0.61	54.18	<0.0001
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 9.971 + 0.222 * \text{C:N}$	0.14	5.71	0.022
$\delta^{15}\text{N-macroalgae} = 16.68 + 0.233 * \delta^{13}\text{C-macroalgae}$	0.38	21.81	<0.0001



Table 5. SIMPER test showing taxa or morphological groups that mostly contribute to the variation among habitats.

Species	Lagoonal		Lagoonal-Marine		Marine	
	Av.Abund	%Contrib	Av.Abund	%Contrib	Av.Abund	%Contrib
<i>Bryopsis corticulans</i>	<0.1	3.4	1.57	5.5	0	0
<i>Bostrychia radicans</i>	1.92	15.6	0.29	6.08	0	0
<i>Caloglossa leprieurii</i>	1.58	14.7	0.36	4.51	0	0
<i>Caulerpa sertularioides</i>	2.33	18.7	3.43	15.3	0	0
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	1.33	9.5	4.43	17.5	<0.5	5.1
<i>Grateloupia filicina</i>	0	0	2.36	6.5	2.23	27.8
<i>Ulva expansa</i>	0.67	4.6	3.00	12.0	0	0
<i>Ulva intestinalis</i>	0.83	6.6	2.21	9.8	0.23	3.8
<i>Ulva lobata</i>	<0.1	4.41	1.64	6.2	2.69	46.7
<b>Functional group</b>						
C-Filamentous						
uncorticated	6.55	24.05	4.13	26.55	1.5	28.29
R-Coarsely upper ramified	1.64	22.51	5.25	20.36	6.25	21.65
R-Filamentous						
corticated	3.09	13.75	1.92	18.75	1.5	19.4
C-Foliose	0.82	13.34	3.17	11.68	4.75	11.64
C-Tubular	1.09	10.57	2.25	8.57	2.13	11.23
R-Foliose	1.73	10.21	0.29	8.08	0	0

Table 6. SIMPER test showing taxa that mostly contribute to the variation between seasons.

Species	Dry		Rainy	
	Av.Abund	Contrib%	Av.Abund	Contrib%
<i>Bryopsis corticulans</i>	0	0	1.38	7.94
<i>Bostrychia radicans</i>	0.77	5.72	0	0
<i>Bryopsis pennatula</i>	0.92	5.18	0	0
<i>Caloglossa leprieurii</i>	0.58	4.21	0.69	6.77
<i>Caulerpa sertularioides</i>	2.31	13.16	1.23	8.09
<i>Cladophora columbiana</i>	0.42	2.57	0.46	4.62
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	1.81	9.18	2.46	13.04
<i>Grateloupia filicina</i>	1.46	8.76	1.92	16.58
<i>Ulva expansa</i>	1.62	7.93	0	0
<i>Ulva flexuosa</i>	0.73	3.4	1.08	6.26
<i>Ulva intestinalis</i>	1.23	7.11	0	0
<i>Ulva lobata</i>	1.42	15.77	1.69	15.27

Table 7. Isotopic composition of N (‰) and content of N (%) in macroalgae species classified by functional groups, which were collected at three habitats from Urías lagoon complex during two contrasting climatic seasons. Average, standard deviation and range.

	Dry			Rainy		
	Lagoonal	Lagoonal-Marine	Marine	Lagoonal	Lagoonal-Marine	Marine
<b>Chlorophyta</b>						
<b>C-Filamentous uncorticated: Uniseriate filaments, either branched or not. Algae consisting of branched, single-celled filaments.</b>						
<i>Bryopsis corticulans</i> Setchell		14.6±1.75 (12.5-16.5)		10.5	12.1±2.81 (5.96-16.1)	
		4.95±0.37 (4.57-5.43)		8.59	4.75±0.77 (3.15-6.00)	
<i>Bryopsis pennatula</i> J. Agardh*	13.5±1.00 (12.6-15.1)	13.8±2.99 (4.68-20.5)		9.89±3.83 (7.18-12.6)		
	5.16±0.52 (4.54-5.96)	4.46±0.61 (3.18-5.70)		5.23±0.60 (4.80-5.65)		
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G. Gmelin) Howe*	10.3±3.33 (3.78-16.2)	11.5±2.79 (1.12-15.5)		4.45±2.24 (0.41-10.6)	1.86±0.55 (1.57-2.25)	
	3.66±0.50 (2.74-4.79)	3.70±0.78 (2.56-6.12)		4.51±1.04 (3.13-7.06)	4.12±2.08 (3.97-4.27)	
<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory de Saint-Vincent) Kützing			12.5±1.34 (10.8-14.4)		9.96±4.31 (5.33-13.9)	
			2.64±0.50 (2.15-3.28)		3.61±0.63 (3.16-4.32)	
<i>Chaetomorpha linum</i> (O.F. Müller) Kützing	14.1±0.94 (13.5-14.8)	17.7±0.28 (17.5-17.9)		12.3		
	2.74±0.51 (2.38-3.10)	3.08±0.02 (3.07-3.09)		4.58		
<i>Cladophora albida</i> (Nees) Kützing	14.2±1.01 (13.5-15.0)	11.5±3.25 (6.74-13.6)	15.9		11.2	
	5.93±1.42 (4.92-6.93)	3.60±1.08 (2.58-5.08)	3.7		3.78	
<i>Cladophora columbiana</i> F.S. Collins	14.1±2.79 (9.62-19.9)	14.4±0.20 (14.2-14.5)		12.0±2.11 (9.77-15.4)	13.0	
	2.54±1.25 (0.77-4.75)	2.34±0.03 (2.32-2.36)		2.61±0.71 (1.44-3.23)	2.52	
<i>Cladophora microcladioides</i> F.S. Collins		12.4±0.59 (11.9-12.8)	14.7±1.20 (13.9-15.6)			
		3.85±0.46 (3.52-4.18)	2.76±0.46 (2.44-3.08)			
<i>Rhizoclonium riparium</i> F.S. Collins	13.2±0.72 (12.3-14.1)	13.7±0.35 (13.5-14.0)		10.4±3.08 (6.48-14.0)	12.5	
	3.03±0.93 (1.98-4.73)	2.69±0.23 (2.52-2.85)		3.97±0.77 (2.62-4.48)	4.0	

<b>Average <math>\delta^{15}\text{N}</math>-group (‰)</b>	12.0±3.1(3.78-19.9) <sup>A,B</sup>	12.7±3.11(1.12-20.5) <sup>A</sup>	13.5±1.80(10.8-16.0) <sup>A</sup>	7.66±4.13(0.41-15.4) <sup>C</sup>	11.1±3.9(1.47-14.4) <sup>B,C</sup>
<b>Average N content (%)</b>	3.63±1.13(0.77-6.93) <sup>A</sup>	3.90±0.88(2.32-6.12) <sup>A</sup>	2.80±0.54(2.15-3.68) <sup>B</sup>	4.28±1.45(1.44-8.59) <sup>A</sup>	4.41±0.88(2.52-6.0)
<b>C-Foliose (Blade-like): Thalli with variable types of growth, forming blades one to few layers of cells thick</b>					
<i>Ulva expansa</i> (Setchell) Setchell	14.9±3.41 (8.74-21.4)	14.7±2.26 (11.1-22.7)		15.5	14.3±2.79 (8.18-16.8)
& L.N. Gardner	2.50±0.96 (1.26-4.12)	2.65±0.74 (1.12-4.14)		4.77	3.42±0.34 (3.03-3.90)
<i>Ulva fasciata</i> Delile		18.5	11.8±0.60 (11.3-12.2)		
		3.17	2.72±0.19 (2.59-2.86)		
<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus		13.4±1.44 (11.5-15.3)	11.3		12.2±0.63 (11.4-12.9)
		2.85±0.36 (2.34-3.45)	1.8		3.69±0.47 (3.42-4.39)
<i>Ulva lobata</i> (Kützinger) Harvey*		13.2±1.48 (10.7-16.7)	13.1±1.65 (10.6-16.7)		13.9±1.81 (9.65-16.7)
		3.07±0.61 (2.44-4.82)	2.73±0.61 (1.47-4.23)		3.65±0.43 (2.80-4.29)
					3.02±0.23 (2.54-3.27)
<b>Average <math>\delta^{15}\text{N}</math>-group (‰)</b>	14.9±3.41(8.74-12.6) <sup>A</sup>	14.2±2.15 (10.7-22.7) <sup>A</sup>	12.9±1.62 (10.6-16.7) <sup>A</sup>	15.5	13.7±2.07(8.78-16.8) <sup>A</sup>
<b>Average N content (%)</b>	2.49±0.96 (1.26-4.12) <sup>B</sup>	2.81±0.81 (1.12-4.82) <sup>B</sup>	2.69±0.60(1.47-4.23) <sup>B</sup>	4.77±0.11(3.4-5.3) <sup>A</sup>	3.58±0.41(2.80-4.39) <sup>A</sup>
					3.02±0.23(2.54-3.3) <sup>A,B</sup>
<b>C-Tubular: Macroscopic thalli consisting of 1-layered hollow tubes.</b>					
<i>Ulva clathrata</i> (Roth) C.Agardh		13.9±1.26 (12.8-15.2)			15.9±1.26 (14.9-16.7)
		2.54±0.20 (1.39-4.83)			4.28±0.98 (4.21-4.35)
<i>Ulva flexuosa</i> Wulfen*	13.9	13.9±2.47 (9.84-18.2)	14.9±1.35 (13.2-16.7)		13.7±2.73 (9.76-11.1)
	2.28	3.59±1.08 (1.62-4.80)	2.83±0.6 (1.89-3.51)		4.17±0.59 (3.36-5.09)
					3.72±0.69 (3.16-4.61)
<i>Ulva intestinalis</i> Linnaeus*	13.0±2.44(9.22-16.0)	13.9±2.81(5.23-20.1)	16.3	6.25±5.45(2.40-10.1)	13.0±3.88(5.21-17.2)
	3.03±1.21(1.61-5.14)	3.25±0.92(1.83-5.52)	5.5	4.43±1.81(3.15-5.71)	4.25±0.57(3.43-5.00)
					13.5
					2.3
<b>Average <math>\delta^{15}\text{N}</math>-group (‰)</b>	13.1±2.31(9.21-16.0) <sup>A</sup>	13.9±2.56 (5.23-20.1) <sup>A</sup>	14.6±1.92 (10.5-16.7) <sup>A</sup>	6.25±5.45 (2.40-10.1) <sup>B</sup>	13.6±3.18 (5.21-17.2) <sup>A</sup>
<b>Average N content (%)</b>	2.95±1.16 (1.61-5.14) <sup>B</sup>	3.29±1.07 (1.39-5.52) <sup>B</sup>	3.04±1.04(1.89-5.49) <sup>B</sup>	4.43±1.81(3.15-5.7) <sup>A,B</sup>	4.22±0.54(3.6-5.09) <sup>A</sup>
					3.43±0.88(2.29-4.6) <sup>A,B</sup>
<b>Ochrophyta</b>					
<b>O-Coarsely: Hollow with spherical or subspherical shape. Macroscopic thalli consisting of few-layered hollow rounded vesicles</b>					
<i>Colpomenia</i> spp. (Endlicher)		12.4±2.23(10.8-14.0)	13.3±0.58(13.0-14.0)		

Derbes & Solier 2.06±1.26(19.7-21.5) 2.57±0.65(2.10-3.31)

**O-Foliose: Compressed with branched or divided thallus. Corticated algae producing flattened branched thalli with**

**erect habit**

*Dictyota dichotoma* (Hudson) 12.0±1.64(9.66-15.3) 13.1±1.26(10.5-14.6) 5.92±1.26(5.04-6.81) 5.68  
 J.V. Lamouroux\* 3.17±0.83(2.37-4.75) 2.51±0.30(2.07-2.92) 3.80±1.68(2.64-4.98) 2.41

**Rhodophyta**

**R-Coarsely upper ramified (Larger-sized corticated): Branched corticated algae with erect habit and comparatively thick axes (more than 2 mm wide)**

*Ahnfeltiopsis leptophylla* (J. Agardh) P.C. Silva & DeCew 12.3±2.05(8.58-14.0) 12.7±0.54(11.8-13.3)  
*Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss\* 13.7±13.7(6.61-17.9) 14.4±2.75(8.41-19.5) 11.3 10.5±3.85(5.56-19.1) 12.5±2.93(8.63-17.1)  
 (Ohmi) Papenfuss\* 3.22±0.60(1.61-4.19) 3.28±0.76(1.16-5.16) 3.7 3.77±0.43(3.41-4.97) 3.50±0.44(2.89-4.31)  
*Grateloupia filicina* (J.V. Lamouroux) C. Agardh\* 13.1±1.61(9.11-15.2) 13.8±0.88(12.1-15.2) 11.7±2.01(8.17-15.4) 12.7±0.54 (11.8-13.3)  
 C. Agardh\* 3.93±0.54(2.80-4.72) 3.39±0.62(2.28-4.26) 3.93±0.51(2.68-4.67) 2.95±0.40 (2.50-3.41)  
*Grateloupia howeii* Setchell & Gardner 10.1±1.20(9.18-11.4) 14.1±0.97(13.0-15.0) 12.1±2.86(9.77-15.8) 10.0  
 2.94±0.30(2.59-3.17) 2.96±0.83(2.22-4.33) 2.91±0.62(2.09-3.56) 2.4  
*Grateloupia versicolor* (J. Agardh) J. Agardh 12.3±1.29(11.2-13.7) 13.8±0.65(13.0-15.0) 11.9±0.28(11.6-12.2) 16.3  
 3.11±1.23(1.69-3.91) 2.63±0.25(2.33-3.01) 3.34±0.94(2.01-4.22) 1.6  
*Hypnea* spp. 14.9 14.9±1.49(15.6-17.8) 12.7±0.98(12.0-13.4)  
 2.21 3.26±0.80(1.62-4.16) 3.06±0.90(2.42-3.69)

**Average δ<sup>15</sup>N-group (‰)** 13.8±3.04(6.6-17.9)<sup>A,B</sup> 13.6±2.27(8.40-19.5)<sup>A</sup> 13.5±0.99(11.3-15.2)<sup>A</sup> 9.69±2.85(5.56-13.7)<sup>C</sup> 12.1±2.4(8.17-17.1)<sup>B,C</sup> 14.4±2.5(10.0-17.0)<sup>A,B</sup>  
**Average N content (%)** 3.17±0.63(1.61-4.19)<sup>A</sup> 3.41±0.78(1.16-5.16)<sup>A</sup> 3.16±0.66(2.22-4.41)<sup>A</sup> 3.66±0.22(3.41-4.05)<sup>A</sup> 3.62±0.60(2.01-4.67)<sup>A</sup> 2.78±0.85(1.60-3.64)<sup>A</sup>

**R-Filamentous corticated: Filamentous uniseriate and pluriseriate with erect thallus. Thin filaments (up to 2 mm wide), forming bushy branched thalli devoid of (or with limited) prostrate parts.**

*Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne\* 11.8±2.48(7.24-15.2) 9.35±3.09(4.58-13.6) 12.3  
 4.59±0.87(3.06-6.63) 4.36±0.96(3.05-5.45) 4.63  
*Ceramium* spp. Roth 10.8±0.64  
 4.19±0.50

<i>Ceramium mazatlanense</i> E.Y. Dawson	12.8±1.94(8.77-14.8) 4.18±0.54(3.52-5.27)	13.0 4.29	12.0±2.32 (10.5-15.4) 4.54±0.78 (4.00-5.69)			
<i>Ceramium sinicola</i> Setchell & Gardner	11.6±2.74(7.16-14.3) 3.79±0.73(2.08-4.47)	14.8±0.69 (14.3-15.3) 3.63±0.04 (3.61-3.66)	12.3±2.45 (9.41-15.1) 4.31±0.20 (4.04-4.51)	13.79±0.8(13.0-14.1) 4.78±1.1(3.12-6.18)		
<i>Polysiphonia johnstonii</i> Setchell & N.L Gardner	10.6±2.53(8.76-12.4) 3.92±0.56(3.52-4.32)	9.45±1.59(7.57-11.6) 4.08±0.59(3.46-4.95)	6.81±2.72 (4.89-8.74) 4.51±1.76 (4.11-6.61)	3.97±0.90 (3.33-4.60) 5.36±0.40 (5.08-5.64)		
<i>Polysiphonia mollis</i> J.D. Hooker & Harvey	12.5±1.01(11.8-13.2) 4.72±0.52(4.35-5.09)	12.8±0.81 (12.0-13.6) 3.73±0.43 (3.24-4.03)				
<i>Polysiphonia pacifica</i> Hollenberg	10.6±1.99(8.35-12.1) 3.85±0.59(3.23-4.40)	9.67±2.76(5.53-12.9) 4.00±0.52(3.46-4.76)	16.2 5.3	11.5±0.90 (10.8-12.1) 7.92±2.99 (5.24-13.0) 4.53±0.10 (4.39-4.63)		
<i>Callithamnion</i> sp. Lyngbye	9.41±2.60(7.80-12.4) 4.31±0.40(3.86-4.60)					
<b>Average <math>\delta^{15}\text{N}</math>-group (‰)</b>	11.6±2.28(7.2-15.2) <sup>A,B</sup>	10.9±2.55(5.5-14.8) <sup>A,B</sup>	13.6±1.56(11.7-16.2) <sup>A</sup>	9.13±3.08(4.58-13.6) <sup>B</sup>	9.81±3.71(3.33-15.4) <sup>B</sup>	13.79±0.8(13.0-14.1) <sup>A</sup>
<b>Average N content (%)</b>	4.41±0.85(3.05-6.63) <sup>A</sup>	4.04±0.57(2.08-5.27) <sup>A</sup>	3.90±0.66(3.24-5.26) <sup>A</sup>	4.72±0.92(3.07-6.60) <sup>A</sup>	4.59±0.50(3.95-5.69) <sup>A</sup>	4.78±1.1(3.12-6.18) <sup>A</sup>
<b>R-Foliose: Flattened macrophytes with cortication. Flattened corticated algae producing expanded blades with erect habit</b>						
<i>Caloglossa lepriourii</i> (Montagne) G. Martens	11.3±2.71(6.85-14.8) 4.79±0.58(3.60-5.65)	16.4 4.41	8.06±2.73(3.37-12.9) 4.92±0.86(3.35-6.17)	12.3 4.52		
<i>Halymenia megaspora</i> E.Y. Dawson	3.59±0.44(3.28-3.90) 4.43±0.87(3.82-5.05)					
<b>Average <math>\delta^{15}\text{N}</math>-group (‰)</b>	11.2±2.64(6.85-14.8) <sup>A</sup>	7.85±7.38(3.28-16.4) <sup>A</sup>	7.83±2.8(3.37-12.9) <sup>A</sup>	12.3		
<b>Average N content (%)</b>	4.75±0.57(3.60-5.65) <sup>A</sup>	4.42±0.61(3.82-5.05) <sup>A</sup>	5.0±0.88(3.35-6.17) <sup>A</sup>	4.52		

\*Macroalgae species more representative in Urías lagoon complex. Different letters in superscript following values indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Tukey's HSD).

Table 8. Results of the regression analysis between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in the water and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae in different functional groups and species or genus more representatives from Urías lagoon complex.

	Intercept	Slope	R <sup>2</sup>	n
C-Filamentous uncorticated	3.30	0.664	0.48	187
<i>Bryopsis corticulans</i>	12.82	0.000	0.02*	23
<i>Bryopsis pennatula</i>	5.89	0.342	0.57	26
<i>Caulerpa sertularioides</i>	1.87	0.622	0.71	76
<i>Cladophora</i> sp.	7.30	0.455	0.38	29
C-Foliose	8.58	0.375	0.22	123
<i>Ulva expansa</i>	10.00	0.084	0.31	50
<i>Ulva lobata</i>	8.64	0.358	0.35	59
C-Tubular	5.78	0.567	0.40	83
<i>Ulva flexuosa</i>	8.65	0.187	0.40	33
<i>Ulva intestinalis</i>	4.33	0.507	0.65	44
O-Foliose ( <i>D. dichotoma</i> )	-0.95	0.939	0.66	19
R-Coarsely upper ramified	7.66	0.400	0.21	194
<i>G. vermiculophylla</i>	4.45	0.455	0.64	79
<i>Grateluopia filicina</i>	12.63	0.001	0.02*	63
R-Filamentous corticated	5.51	0.450	0.26	92
<i>Bostrychia radicans</i>	3.41	0.693	0.70	27
<i>Ceramium</i> spp.	11.09	0.089	0.01*	31
<i>Polysiphonia</i> spp.	4.32	0.446	0.26	34
R-Foliose	2.94	0.721	0.79	26
<i>Caloglossa leprieurii</i>	3.25	0.717	0.70	24

\*Non-significant

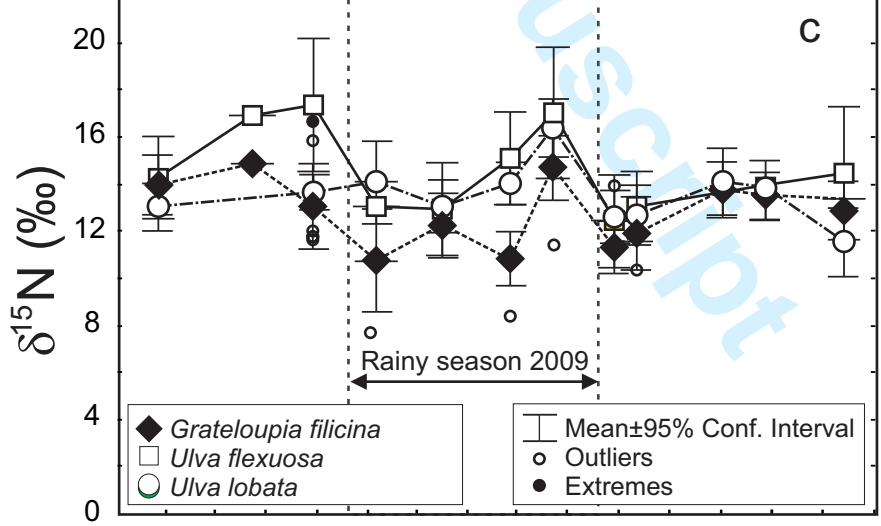
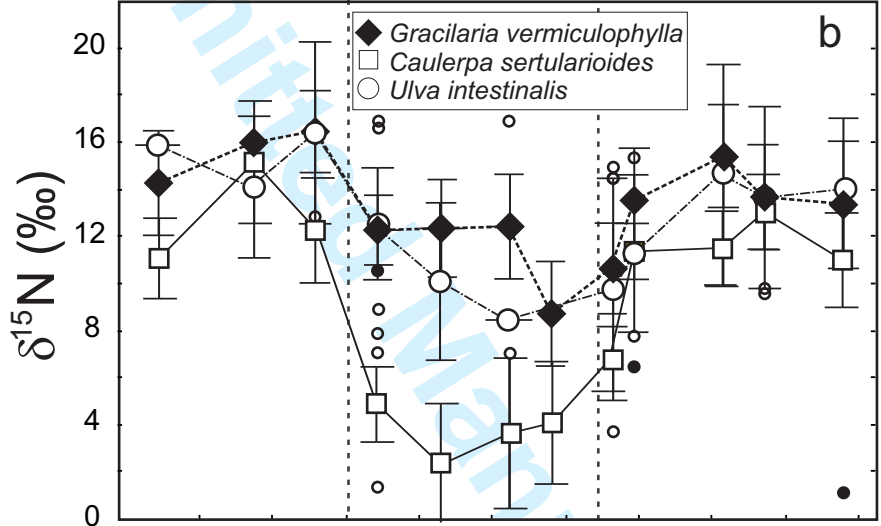
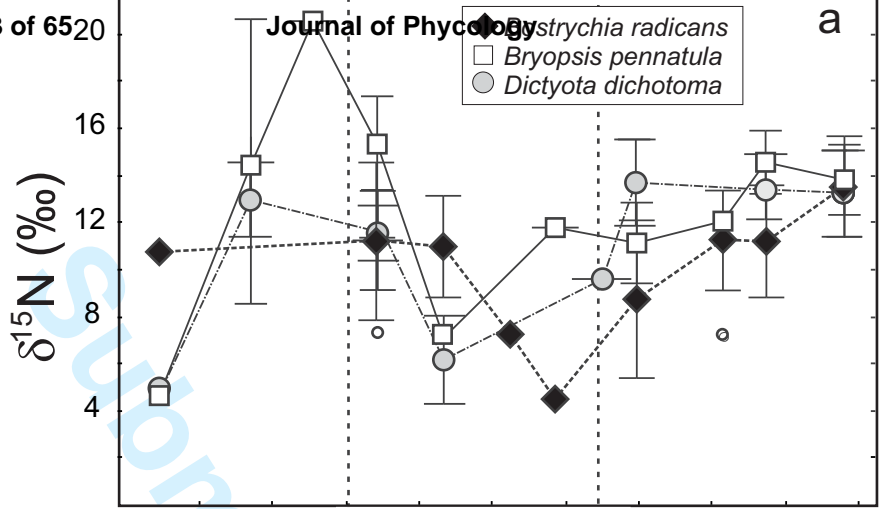
Table 9. Results of three-way ANOVA on  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae values depending on interacting factors season, habitat and functional group.

Functional group/Species	Season	Habitat	Season Habitat	$\delta^{15}\text{N}$ -DIN	Season $\delta^{15}\text{N}$ -DIN	Habitat $\delta^{15}\text{N}$ -DIN	SH $\delta^{15}\text{N}$ -DIN
All macroalgae specimens (n=737, $R^2=0.47$ )							
F value	4.29	19.43	4.31	138.83	0.12	5.67	0.05
p value	0.039*	<0.0001*	0.014*	<0.0001*	0.7313	<0.0036*	0.96
R-Coarsely upper ramified (n=194, $R^2=0.45$ )							
F value	0.072	3.42	5.65	23.8817	0.16	16.47	1.22
p value	0.7887	0.0349*	0.0042*	<0.0001*	0.70	<0.0001*	0.2981
R-Filamentous corticated (n=92, $R^2=0.48$ )							
F value	5.67	1.79	1.37	8.15	3.58	2.55	1.37
p value	0.0196*	0.1739	0.2589	0.0055*	0.0623	0.0855	0.2607
C-Tubular (n=83, $R^2=0.55$ )							
F value	0.19	6.49	0.65	33.43	0.13	0.69	0.60
p value	0.6638	0.0026*	0.5267	<0.0001*	0.7157	0.5065	0.5542
<i>Caulerpa sertularioides</i> (n=76, $R^2=0.73$ )							
F value	10.76	0.59	0.30	29.61	0.36	0.19	0.53
p value	0.0016*	0.4454	0.5843	<0.0001*	0.5488	0.6608	0.4678





Fig 1. Ochoa&Soto



Feb/09 Apr/09 Jun/09 Aug/09 Oct/09 Dec/09 Feb/10 Apr/10

Date

Fig. 2. Ochoa&Soto

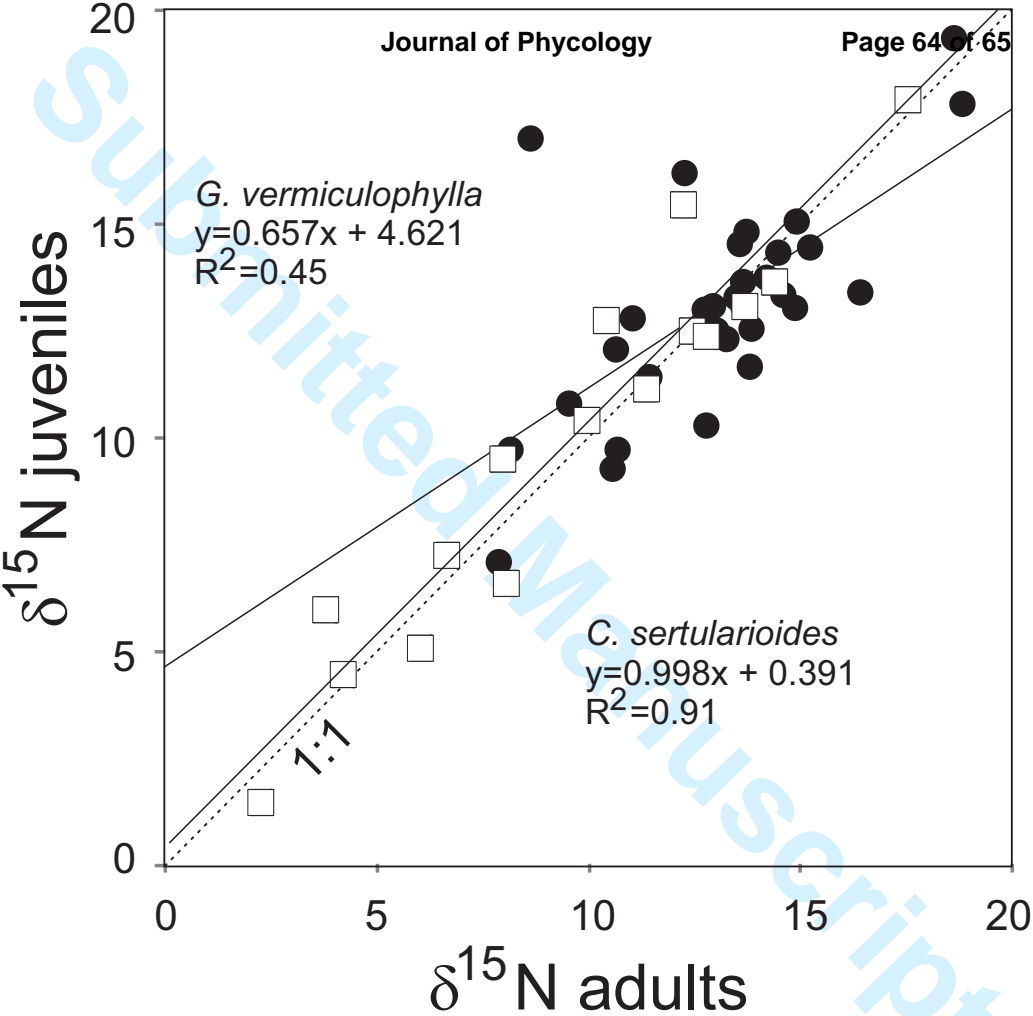


Fig. 3. Ochoa&amp;Soto

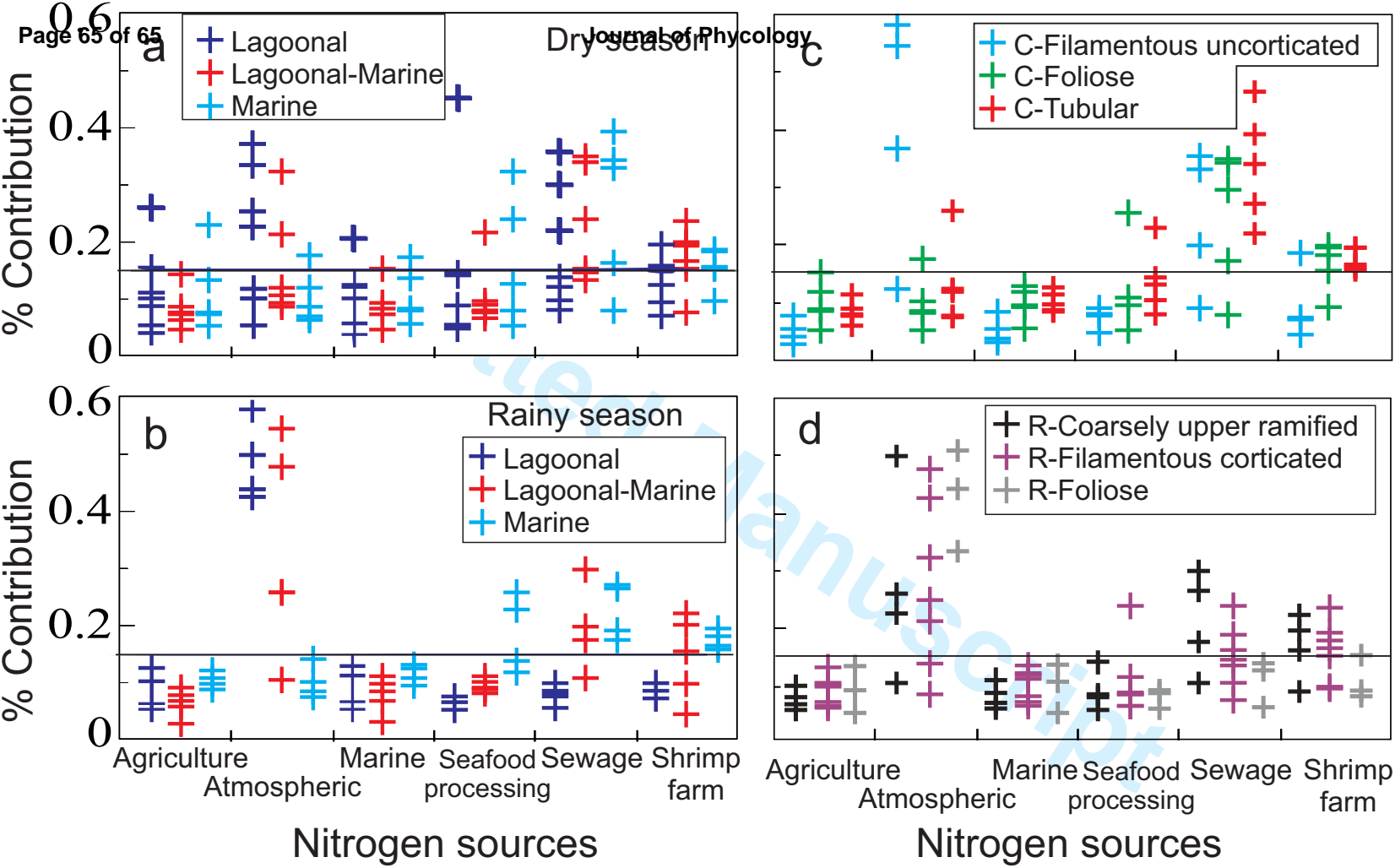


Fig. 4. Ochoa&Soto

Anexo 11.

María Julia Ochoa-Izaguirre, Martín F. Soto-Jiménez. 2013. Evaluation of nitrogen sources in the Urías lagoon system, Gulf of California, based on stable isotopes in macroalgae  
*Ciencias Marinas*, 39(4):413–430.

## Evaluation of nitrogen sources in the Urías lagoon system, Gulf of California, based on stable isotopes in macroalgae

### Evaluación de las fuentes de nitrógeno en el sistema lagunar de Urías, golfo de California, mediante el uso de isótopos estables en macroalgas

María Julia Ochoa-Izaguirre<sup>1,2</sup>, Martín Federico Soto-Jiménez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Apdo. postal 811, Mazatlán 82040, Sinaloa, México.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, Apdo. postal 610, Mazatlán 82000, Sinaloa, México.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UAM-ICMyL-UNAM), A. P. 811, Mazatlán 82040, Sinaloa, México.

\* Corresponding author. E-mail: martin@ola.icmyl.unam.mx

**ABSTRACT.** The concentrations of chemical forms of nitrogen (N) and their isotopic composition in the water column and the  $\delta^{15}\text{N}$  signals in 738 samples of macroalgae collected during one year across the Urías lagoon system (Mazatlán, Sinaloa, Mexico) were analyzed in order to study the N sources. The  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae premise is that they register and integrate the variability of N and may provide time-integrated information about N pollution. To validate this premise, we applied two models to predict the isotopic variability of N available in the water column ( $\delta^{15}\text{N}$ -DIN): one is based on a physical mixing balance of N sources (simple model), and the second includes the effects of the biogeochemical processes on the signals (coupled model, CM). Both models showed significant  $R^2$ , but CM better explained the  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN variability. The relation between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN<sub>CM</sub> and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae also showed a good fit, although lower than expected and with higher dispersion. The multiple N sources and co-occurring biogeochemical reactions, which produce a mixture of chemical species of N and of their isotopic compositions, as well as the high diversity of species (45) explained the elevated variability and lack of fit. Even so,  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae is the most useful available tool to quantify the relative contributions of N to ecosystems from different sources. Based on Bayesian isotopic mixing models, the main anthropogenic sources of N to the Urías lagoonal system were domestic effluents (50%), atmospheric deposition (24%), and seafood processing plant effluents (21%), and to a lesser extent, aquaculture effluents (3%), agriculture runoff (1%), and oceanic N (1%).

*Key words:*  $\delta^{15}\text{N}$ , eutrophication, biogeochemical cycle, NLOAD model, MixSIR.

**RESUMEN.** Las concentraciones de las formas químicas de nitrógeno (N) y su composición isotópica en la columna de agua y las señales de  $\delta^{15}\text{N}$  en 738 muestras de macroalgas recolectadas durante un año en el sistema lagunar de Urías (Mazatlán, Sinaloa, México) fueron analizadas para estimar las fuentes de N. La premisa sobre el uso de  $\delta^{15}\text{N}$  en macroalgas es que las macroalgas asimilan  $^{15}\text{N}$  en proporción a la disponibilidad y reflejan la fuente de N de una manera predecible. Para validar esta premisa, se aplicaron dos modelos para la predicción de la variabilidad isotópica del N en el agua ( $\delta^{15}\text{N}$ -NID): el primero se basa en una mezcla física de las fuentes de N (modelo simple), y el segundo integra los efectos de procesos biogeoquímicos sobre sus señales isotópicas (modelo acoplado, MA). Ambos modelos mostraron valores de  $R^2$  significativos, pero el MA explicó mejor la variabilidad del  $\delta^{15}\text{N}$ -NID. La relación entre  $\delta^{15}\text{N}$ -NID<sub>MA</sub> y  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgas también mostró un buen ajuste, aunque menor al esperado y con una alta dispersión. Las múltiples fuentes de N y reacciones biogeoquímicas concurrentes, que producen una mezcla compleja de especies químicas de N y de sus composiciones isotópicas, además de la alta diversidad de especies (45), explicaron la elevada variabilidad y la falta de ajuste. Aun así, la técnica de  $\delta^{15}\text{N}$  en macroalgas es la herramienta más útil que existe para cuantificar las contribuciones relativas de N a los ecosistemas derivadas de diferentes fuentes. Con base en la resolución de ecuaciones de mezcla isotópica por estadística Bayesiana, las principales fuentes de N antropogénico en el sistema lagunar de Urías fueron los efluentes domésticos (50%), el depósito atmosférico (24%), los efluentes del procesamiento de productos pesqueros (21%) y, en menor proporción, los efluentes acuícolas (3%) los escurrimientos agrícolas (1%) y N oceánico (1%).

*Palabras claves:*  $\delta^{15}\text{N}$ , eutrofización, ciclo biogeoquímico, modelo NLOAD, MixSIR.

## INTRODUCTION

Nitrogen (N) is considered the nutrient that most frequently limits primary productivity in coastal waters (Nixon 1995). Anthropogenic activities have increased N inputs to coastal ecosystems and thus altered the biogeochemical cycles in these ecosystems with environmental and ecological consequences (McClelland and Valiela 1998, Savage 2005). Over the past few decades, the natural availability of N in coastal ecosystems of the Gulf of California (Mexico) has changed due to the substantial increase in human-caused N deposition (Soto-Jiménez *et al.* 2003a, Piñón-Gimate *et al.* 2009). The Urías lagoon system is one of the ecosystems most affected by anthropogenic N inputs, as evidenced by the progressive eutrophication (Ochoa-Izaguirre *et al.* 2002).

Stable N isotopes ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) in macroalgae have become a useful tool for identifying N sources in coastal ecosystems (e.g., Deutsch and Voss 2006, Dailer *et al.* 2010, Kaldy 2011, Ricaurte-Villota *et al.* 2013). The basic premise of the method is that the  $^{15}\text{N}$  of exposed macroalgae reflects the N source in a predictable manner (Cohen and Fong 2005). In this study, we quantified the N sources to the Urías lagoon system (Mazatlán, Sinaloa, Mexico) and measured their chemical and isotopic compositions, and related them to the spatiotemporal variation of the concentrations and chemical forms of N in the water column. We also compared the variations in the isotopic composition of N in water with those recorded in macroalgae from the same ecosystem.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

The Urías lagoon system is located at the entrance to the Gulf of California (fig. 1) and covers an area of 1800 ha (Montaño-Ley *et al.* 2008). The region has a tropical-subtropical climate and three seasons: rainy from July to October, dry-cold from November to April, and dry-warm from May to June. The lagoon system has three different habitats classified according to salinity: lagoonal habitat (LH, saline [salinity < 30] and hypersaline [salinity > 36]), lagoonal-marine habitat (LMH, salinity of 30 to 34), and marine habitat (MH, salinity of  $35 \pm 1$ ).

The three habitats (fig. 1) can also be associated with the diverse human activities carried out in the area: (1) the upper zone, LH, which is covered by mangroves and influenced by tide channels, receives greater freshwater inputs from streams and agricultural lands (8100 ha), as well as aquaculture effluents (>400 ha) and domestic wastewater discharges; (2) the intermediate zone, LMH, which comprises most of the system and is where the Mazatlán thermoelectric power plant (capacity of 600 MW) and fishing

## INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es considerado el nutriente que limita con mayor frecuencia la productividad primaria en las aguas costeras (Nixon 1995). Las actividades antropogénicas han incrementado los aportes de N a los ecosistemas costeros, alterando el ciclo biogeoquímico en estos ecosistemas con consecuencias ambientales y ecológicas (McClelland y Valiela 1998, Savage 2005). En las últimas décadas ha ocurrido una alteración en la disponibilidad natural de N en los ecosistemas costeros del golfo de California (México) debido a que se han incrementado sustancialmente los aportes de N por actividades humanas (Soto Jiménez *et al.* 2003a, Piñón-Gimate *et al.* 2009). El sistema lagunar de Urías es uno de los ecosistemas más impactados por el aporte antropogénico de N, lo cual es evidenciado por la eutrofización progresiva (Ochoa-Izaguirre *et al.* 2002).

El uso de los isótopos estables de N ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) en macroalgas se ha convertido en una herramienta útil para identificar las fuentes de N en los ecosistemas costeros (e.g., Deutsch y Voss 2006, Dailer *et al.* 2010, Kaldy 2011, Ricaurte-Villota *et al.* 2013). La premisa fundamental de la técnica es que las macroalgas expuestas asimilan  $^{15}\text{N}$  en proporción a la disponibilidad y reflejan la fuente de N de una manera predecible (Cohen y Fong 2005). En este estudio, se realizó la cuantificación de las cargas de N que llegan al sistema lagunar de Urías (Mazatlán, Sinaloa, México) y su caracterización química e isotópica, y se relacionaron con la variación espaciotemporal de las concentraciones y formas químicas del N disponibles en la columna de agua. Además, se compararon las variaciones de la composición isotópica del N en el agua con las registradas en las macroalgas del ecosistema.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El sistema lagunar de Urías se localiza en la entrada al golfo de California (fig. 1) y cubre una superficie de 1800 ha (Montaño-Ley *et al.* 2008). El clima de la región es tropical-subtropical y presenta un patrón que define tres épocas: lluviosa de julio a octubre, seca-fría de noviembre a abril y seca-cálida de mayo a junio. El sistema lagunar tiene tres hábitats que se clasifican según la salinidad: hábitat lagunar (HL, salobre [salinidad < 30] e hipersalino [salinidad > 36]), hábitat lagunar-marino (HLM, salinidad de 30 a 34) y hábitat marino (HM, salinidad de  $35 \pm 1$ ).

Los tres hábitats (fig. 1) también se pueden asociar con las actividades humanas que se desarrollan en los alrededores: (1) la zona superior, HL, que está cubierta por manglar e influenciada por canales de marea, recibe los mayores aportes de agua dulce de los escurrimientos terrestres y de tierras agrícolas (8100 ha), así como de efluentes acuícolas (>400 ha) y aguas residuales domésticas; (2) la zona intermedia, HLM, que comprende la mayor parte del sistema y es donde se localiza la planta termoeléctrica de Mazatlán

boat docks are located, receives the effluents discharged by seafood processing plants (tuna canning, fishmeal production, shrimp freezing), domestic wastewater discharges (partially and untreated sewage of close to 170,000 inhabitants), and rainfall runoff from one third of the Mazatlán area; and (3) the marine zone, MH, which includes the mouth of the navigation channel (where tourist, merchant, and fishing vessels concentrate) and adjacent offshore waters, receives atmospheric deposition resulting from the emissions from fossil fuel combustion in vehicles and from the thermoelectric plant.

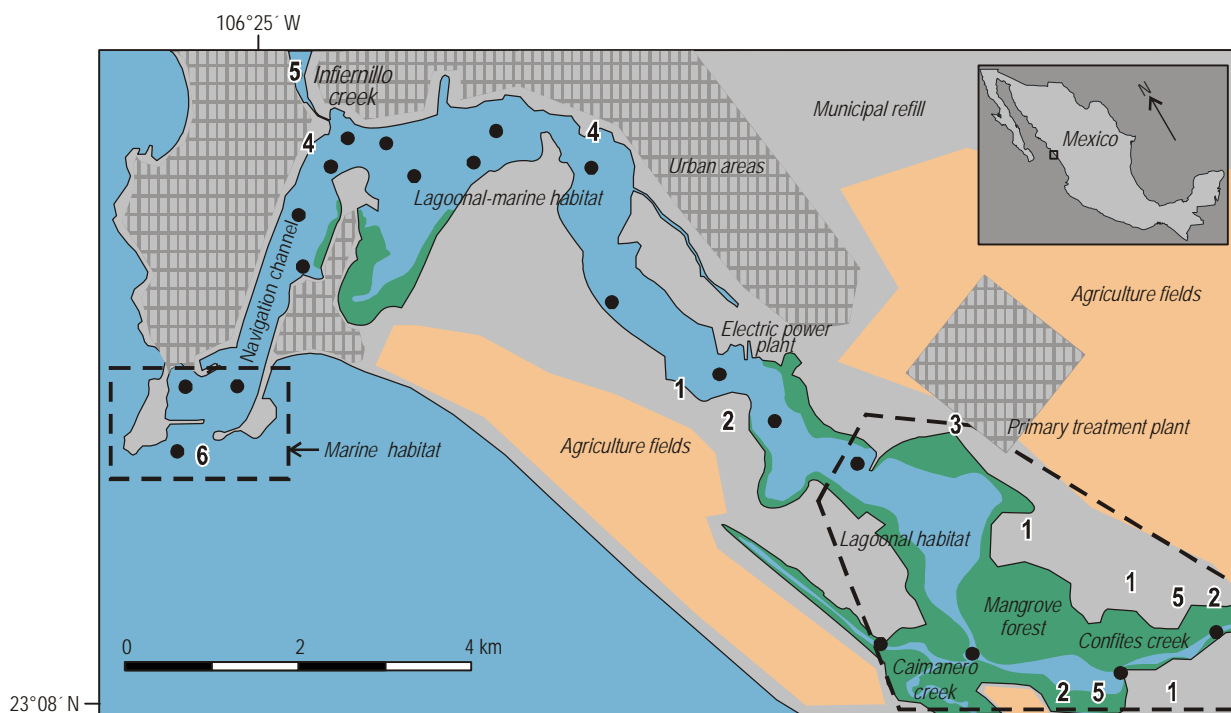
### Collection of samples

Effluent, water column, and macroalgal samples were collected monthly from February 2009 to March 2010 at 20 sites. At each site, we collected 5 to 6 specimens of each species of macroalga found and 4 L of seawater and effluent. A total of 738 macroalgal specimens and close to 250 water and effluent samples were obtained. *In situ* temperature (T), salinity (S), dissolved oxygen (DO), and pH measurements were taken with a YSI 6600V2 sensor. The residence time ( $\tau$ )

(capacidad 600 MW) y los muelles para la flota pesquera, recibe las descargas de aguas residuales de las industrias que procesan alimentos marinos (enlatado de atún, producción de harina de pescado y congelación de camarón), las descargas de aguas residuales domésticas (parcialmente tratadas y sin tratar de cerca de 170,000 habitantes) y los escurrimientos de agua de lluvia de una tercera parte del área de Mazatlán; y (3) la zona marina, HM, que incluye la boca del canal de navegación (donde se concentra la flota naviera turística, mercante y pesquera), la boca de entrada al puerto y el mar adyacente al sistema, recibe el depósito atmosférico derivado de la quema de combustibles fósiles de vehículos y emisiones de la planta termoeléctrica.

### Recolección de muestras

Las muestras de efluentes, de la columna de agua y de macroalgas fueron recolectadas mensualmente de febrero de 2009 a marzo de 2010 en 20 sitios. En cada sitio se recolectaron de 5 a 6 especímenes de cada especie de macroalga presente y 4 L de agua de la columna y de cada efluente. En total se recolectaron 738 especímenes y cerca de 250 muestras de agua y efluentes. Se tomaron datos *in situ* de temperatura (T),



**Figure 1.** Location of sampling sites (filled circles) and indication of the anthropogenic activities identified as potential sources of nitrogen to the Urias lagoon system (Mazatlán, Sinaloa, Mexico). Potential nitrogen sources: 1, shrimp farm effluents; 2, agriculture effluents; 3, primary wastewater treatment plant effluents; 4, seafood processing plant effluents; 5, urban and rural runoff; and 6, adjacent marine waters. Dashed lines indicate the limits of the habitats under study.

**Figura 1.** Localización de los sitios de muestreo (círculos rellenos) e indicación de las actividades antropogénicas identificadas como fuentes potenciales de nitrógeno al sistema lagunar de Urias (Mazatlán, Sinaloa, México). Fuentes potenciales de nitrógeno: 1, efluentes de granjas de camarón; 2, efluentes agrícolas; 3, efluentes de planta de tratamiento primario de aguas residuales; 4, efluentes de planta de procesamiento de productos pesqueros; 5, escurrimiento de áreas urbanas y rurales; y 6, agua marina adyacente. Las líneas discontinuas definen los hábitats estudiados.



of water in the lagoon system was also modelled (Montaño-Ley *et al.* 2008).

In the laboratory, the water and effluent samples were filtered through nitrogen-free Whatman GF/F filters (0.70  $\mu\text{m}$ ). The filtered water was examined for total dissolved nitrogen (TDN), by complete oxidation to nitrates following Grasso *et al.* (1983), and for ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), according to the methods described by Strickland and Parsons (1972). Dissolved inorganic nitrogen (DIN) was obtained by adding the concentrations of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$ , whereas dissolved organic nitrogen (DON) was calculated as the difference between TDN and DIN. The detection limits were 0.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{NH}_4^+$  and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$ , with a coefficient of variation of 12.4–15% for all three. Since the concentration of  $\text{NO}_2^-$  represents a very small fraction of DIN, it was added to that of  $\text{NO}_3^-$ .

Depending on the dominant inorganic N forms in the filtered effluent and water samples,  $\text{NO}_3^-$  and/or  $\text{NH}_4^+$  were isolated by diffusion according to the methods proposed by Sigman *et al.* (1997) and Holmes *et al.* (1998). To determine  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  was converted to  $\text{NH}_3$  under alkaline conditions. To determine  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  was reduced to  $\text{NH}_4^+$  and converted to  $\text{NH}_3$  under alkaline conditions.  $\text{NH}_3$  is transported by diffusion and retained in the GF/D filters. For the isolation of  $\text{NH}_4^+$  and/or  $\text{NO}_3^-$ , we used standards prepared with artificial seawater containing salts corresponding to the chemical forms and in the concentration ranges of the samples analyzed (5, 10, 50, and 100  $\mu\text{M}$ ) and blanks of Milli-Q water containing all the reagents except the nutrient. To estimate fractionation during the diffusion process, the GF/D filters of the standards and the 1-mg replicates of  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  were analyzed by determining the N content and isotopic composition. Fractionation by diffusion ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{diffusion}}$ ) was calculated by the simple difference between the original isotopic relation of the salt and the resulting relation in the standard after diffusion. The efficiency of the  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  extraction process was estimated by N recovery in the standard or the sample retained by the GF/D filter. Only recoveries greater than 80% were accepted and corrected as follows (Holmes *et al.* 1998):

$$\Delta^{15}\text{N}_{\text{diffusion}} = 0.2[\% \text{ recovery}] - 19.95 \quad (1)$$

Macroalgae were rinsed with Milli-Q water to remove epibionts and freeze-dried ( $-44^\circ\text{C}$ , 33–72 mm Hg, 72 h). A sample of 5 mg of each dry and ground macroalga was placed in a 6  $\times$  4 mm tin vial. The filters with the trapped N were packed in 9  $\times$  5 mm tin capsules and sent, together with the macroalgal samples, to the Stable Isotope Facility at the University of California, Davis, for isotopic analysis. The

salinidad (S), oxígeno disuelto (OD) y pH con una sonda YSI 6600V2. También se modeló el tiempo de residencia ( $\tau$ ) del agua del sistema lagunar (Montaño-Ley *et al.* 2008).

En el laboratorio, las muestras de agua y efluentes se filtraron con filtros Whatman GF/F (0.70  $\mu\text{m}$ ) libres de N. Al agua filtrada se le determinó la concentración de N disuelto total (NDT), por oxidación completa a nitratos según Grasso *et al.* (1983), y de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), según las técnicas descritas por Strickland y Parsons (1972). El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se obtuvo como la suma de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , mientras que el nitrógeno orgánico disuelto (NOD) se calculó como la diferencia entre el NDT y el NID. El límite de detección de  $\text{NH}_4^+$  fue de 0.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  y el de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  fue de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , con un coeficiente de variación de 12.4–15% para las tres formas químicas. Debido a que la concentración de  $\text{NO}_2^-$  representa una fracción muy baja del NID, se sumó a la de  $\text{NO}_3^-$ .

Dependiendo de las formas inorgánicas de N dominantes en las muestras filtradas de los efluentes y de la columna de agua, se aisló el  $\text{NO}_3^-$  y/o  $\text{NH}_4^+$  por difusión siguiendo los métodos propuestos por Sigman *et al.* (1997) y Holmes *et al.* (1998). Para determinar el  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ , se convirtió el  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  bajo condiciones alcalinas. Para determinar el  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ , se realizó una reducción total del  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  y su posterior conversión a  $\text{NH}_3$  bajo condiciones alcalinas. El  $\text{NH}_3$  es transportado por difusión y capturado en los filtros GF/D. Para el aislamiento de  $\text{NH}_4^+$  y/o  $\text{NO}_3^-$ , se incluyeron estándares preparados con agua de mar artificial que contenía sales correspondientes a las formas químicas y en los intervalos de las concentraciones de las muestras analizadas (5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) y blancos con agua Milli-Q que contenían todos los reactivos excepto el nutriente. Para calcular el fraccionamiento durante el proceso de difusión, se analizaron los filtros GF/D de los estándares y las réplicas de 1 mg de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para determinar el contenido de N y la composición isotópica. El fraccionamiento por difusión ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{diffusion}}$ ) se calculó por medio de una simple diferencia entre la relación isotópica original de la sal y la relación resultante en el estándar después de la difusión. La eficiencia del proceso de extracción de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  se estimó como la recuperación del N en el estándar o en la muestra capturada en el filtro GF/D. Sólo las recuperaciones mayores que 80% fueron aceptadas y corregidas como sigue (Holmes *et al.* 1998):

$$\Delta^{15}\text{N}_{\text{difusión}} = 0.2[\% \text{ de recuperación}] - 19.95 \quad (1)$$

Se enjuagaron las macroalgas con agua Milli-Q para eliminar a los epibiontes y se secaron por liofilización ( $-44^\circ\text{C}$ , 33–72 mmHg, 72 h). Se colocó una muestra de 5 mg de cada macroalga seca y molida en viales de estaño de 6  $\times$  4 mm. Los filtros con el N atrapado fueron empacados en cápsulas de estaño de 9  $\times$  5 mm y se enviaron, junto con las muestras de macroalgas, al Laboratorio de Isótopos Estables de la Universidad de California (Davis) para su análisis

isotopic values of N were expressed in parts per thousand with reference to atmospheric N, which is the internationally accepted standard. The  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic signals of the analyzed samples were expressed using delta ( $\delta$ ) notation:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left( \frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N sample}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N reference}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

## Data processing

### Nitrogen loading model

The NLOAD model described by Valiela *et al.* (1997, 2002) was used to identify the N sources and the total N load received by the Urías system from the catchment basin. Briefly, NLOAD calculates the N fluxes to a coastal ecosystem from the catchment area considering the land use (natural vegetation, agriculture, urban, parks and gardens, marshes, etc.), the number of inhabitants (% of treated sewage and type of treatment), and human activities such as the burning of fossil fuels (vehicular, industrial) and food production (e.g., agriculture, livestock raising, food processing). The model estimates the loss of N during its transport from the catchment basin to the coastal ecosystem by different processes, such as adsorption, assimilation, volatilization, and denitrification.

### Simple and coupled mixing models

To explain the variability of  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in water, a physical mixing model was used (simple model) based on an isotopic balance using the concentrations of the inorganic N forms and their isotopic compositions, according to the source:

$$\delta^{15}\text{N-DIN} = f_1(\delta_1) + f_2(\delta_2) + \dots f_n(\delta_n) \quad (3)$$

$$f_1 + f_2 + \dots f_n = 1 \quad (4)$$

where  $f_i$  is the proportional contribution of source  $i$  to the mixture and  $\delta_i$  is the isotopic signature of source  $i$ . Since the sources of  $\text{NO}_3^-$  are terrestrial (e.g., agriculture, atmospheric) and oceanic, for the prediction of  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NO}_3^-$  it was first necessary to apply a mixed binary balance (marine and terrestrial) based on salinity to calculate the fraction of seawater (and  $\text{NO}_3^-$ ), following Middleburg and Nieuwenhuize (2001):

$$\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = [(\delta^{15}\text{N-Nm})(f) + (\delta^{15}\text{N-Nr})(1-f)] / \text{N} \quad (5)$$

isotópico. Los valores isotópicos del N fueron registrados en partes por mil con referencia al nitrógeno atmosférico, que es el estándar convenido internacionalmente. Las señales isotópicas  $\delta^{15}\text{N}$  de las muestras analizadas fueron registradas usando la notación delta ( $\delta$ ):

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left( \frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N muestra}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N referencia}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

## Procesamiento de datos

### Modelo de carga de N

Se utilizó el modelo NLOAD descrito por Valiela *et al.* (1997, 2002) para identificar las fuentes de N, y se estimó la carga total de N que recibe el sistema de Urías desde la cuenca de captación. Brevemente, NLOAD calcula las cargas de N que llegan a un ecosistema costero desde la cuenca de captación considerando el uso de suelo del ecosistema (vegetación natural, agricultura, urbana, parques y jardines, humedales, etc.), el número de habitantes (% de agua residual tratada y tipo de tratamiento) y las actividades humanas tales como la quema de combustibles fósiles (vehicular, industrial) y producción de alimento (e.g., agricultura, crianza de animales, procesamiento de alimentos). El modelo estima las pérdidas de N durante su transporte desde la cuenca de captación hasta el ecosistema costero por diferentes procesos, como la adsorción, asimilación, volatilización y desnitrificación.

### Modelos de mezcla simple y acoplado

Para explicar la variabilidad del  $\delta^{15}\text{N}$ -NID en el agua, se utilizó un primer modelo de mezcla de intercambio físico (modelo simple) basado en un balance isotópico utilizando las concentraciones de las formas inorgánicas de N y sus composiciones isotópicas, según su fuente de origen:

$$\delta^{15}\text{N-NID} = f_1(\delta_1) + f_2(\delta_2) + \dots f_n(\delta_n) \quad (3)$$

$$f_1 + f_2 + \dots f_n = 1 \quad (4)$$

donde  $f_i$  es la contribución proporcional de la fuente  $i$  a la mezcla y  $\delta_i$  es la firma isotópica de la fuente  $i$ . Debido a que las fuentes del  $\text{NO}_3^-$  son terrestres (e.g., agricultura, atmosférica) y marina, para la predicción del  $\delta^{15}\text{N}$ - $\text{NO}_3^-$  fue necesario primero hacer un balance de mezcla binario (marino y terrestre) basado en la salinidad para calcular la fracción de agua de mar (y de  $\text{NO}_3^-$ ), de acuerdo con Middleburg y Nieuwenhuize (2001):

where  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ,  $\delta^{15}\text{N-Nm}$ , and  $\delta^{15}\text{N-Nr}$  are the isotopic values of  $\text{NO}_3^-$  in the water column, the oceanic sample, and the terrestrial sample, respectively.

The sources of  $\text{NH}_4^+$  were considered to be anthropogenic activities and the decomposition of organic matter (allochthonous and autochthonous). The marine source was considered negligible due to the low concentrations of  $\text{NH}_4^+$  in the adjacent seawater.

Nitrogen is highly reactive and its concentrations, chemical forms, and distinct isotopic composition change systematically as it participates in reactions associated with its biogeochemical cycle (Middleburg and Nieuwenhuize 2001). This isotopic change is called fractionation, and its magnitude depends on the type and intensity of the reaction, which in turn depends on the environmental conditions and time elapsed. Biogeochemical processes such as ammonium volatilization, nitrification, and denitrification result in isotopic fractionation that diverts the signals generated by the simple model relative to those observed in the field. A general linear model (coupled model) was thus designed that considers the effects of these processes on the variability in isotopic ratio (Moore and Semmens 2008):

$$\delta^{15}\text{N-DIN} = f_1(\delta_{1-\gamma_1}) + f_2(\delta_{2-\gamma_2}) + \dots f_n(\delta_{n-\gamma_n}) \quad (6)$$

where  $\gamma_i$  is the specific fractionation of source  $i$  participating in some biogeochemical process. Although organic matter mineralization is an important source of inorganic N in the water column, it has no effect on isotopic composition (Kendall 1998). Neither does biological N fixation produce isotopic fractionation (Swart *et al.* 2008). On the other hand, we assume that  $\text{NO}_3^-$  produced by denitrification is associated with the denitrification process (Dollhopf *et al.* 2005).

#### Volatilization ( $V_{\text{NH}_3}$ )

In seawater, the equilibrium of the  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3$  reaction is mainly affected by pH, and to a lesser extent by T and S. We thus estimated the fraction of  $\text{NH}_3$  ( $x_{\text{NH}_3}$ ) produced and removed from the water column, following Spotte and Adams (1983):

$$x_{\text{NH}_3} = 1 + \text{antilog}(\text{pK} - \text{pH}) \quad (7)$$

$$\text{pK} = [0.0902 + 2727.9/(T + 273.1) + (0.155 - 3.15 \times 10^{-4})][19.973 \text{ S}/(1000 - 1.2005 \text{ S})] \quad (8)$$

where pK is the equilibrium constant of the reaction as a function of T and S.

donde  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ,  $\delta^{15}\text{N-Nm}$  y  $\delta^{15}\text{N-Nr}$  son los valores isotópicos del  $\text{NO}_3^-$  en la columna de agua, en la muestra marina y en la muestra terrestre, respectivamente.

Para el caso del  $\text{NH}_4^+$ , se consideró que las fuentes fueron antropogénicas y resultado de la descomposición de materia orgánica (alóctona y autóctona). La fuente marina se consideró despreciable debido a las bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en el agua del mar adyacente.

El N es altamente reactivo y sus concentraciones, sus formas químicas y su composición isotópica distintiva de la fuente de origen cambian sistemáticamente conforme participa en reacciones asociadas a su ciclo biogeoquímico (Middleburg y Nieuwenhuize 2001). Al cambio isotópico se le denomina fraccionación, y su magnitud está en función del tipo e intensidad de la reacción, que a su vez depende de las condiciones ambientales y del tiempo transcurrido. Los procesos biogeoquímicos tales como la nitrificación, desnitrificación y volatilización de amonio resultan en una fraccionación isotópica que desvía las señales generadas por el modelo simple con respecto a las observadas en el campo. Se diseñó un modelo lineal general que considerara los efectos de tales procesos sobre la variabilidad en la proporción isotópica (modelo acoplado) (Moore y Semmens 2008):

$$\delta^{15}\text{N-NID} = f_1(\delta_{1-\gamma_1}) + f_2(\delta_{2-\gamma_2}) + \dots f_n(\delta_{n-\gamma_n}) \quad (6)$$

donde  $\gamma_i$  representa la fraccionación específica de la fuente  $i$  que resulta de su participación en algún proceso biogeoquímico. Aunque la mineralización de la materia orgánica es fuente importante de N inorgánico a la columna de agua, no tiene efecto sobre la composición isotópica (Kendall 1998). Tampoco la fijación biológica de N produce fraccionación isotópica (Swart *et al.* 2008). Por otro lado, suponemos que el  $\text{NO}_3^-$  producido por nitrificación está acoplado al proceso de desnitrificación (Dollhopf *et al.* 2005).

#### Volatilización ( $V_{\text{NH}_3}$ )

El equilibrio de la reacción  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3$  en el agua de mar se ve afectado principalmente por el pH, y en menor medida por la T y S. Por lo tanto, siguiendo el modelo propuesto por Spotte y Adams (1983), se estimó la fracción de  $\text{NH}_3$  ( $x_{\text{NH}_3}$ ) producida y removida de la columna de agua:

$$x_{\text{NH}_3} = 1 + \text{antilog}(\text{pK} - \text{pH}) \quad (7)$$

donde pK es la constante de equilibrio de la reacción en función de la T y S.

### Denitrification ( $D_{\text{NO}_3}$ )

The denitrification reaction ( $\text{CHONP} + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ ) mainly depends on the absence of DO and presence of  $\text{NO}_3^-$ , but is also influenced by T, pH, and  $\tau$ . The effect of this reaction was estimated by the general denitrification equation (Heinen 2006):

$$D_{\text{NO}_3} = \alpha f_{\text{NO}_3} f_T f_S f_{\text{pH}} \quad (9)$$

where  $\alpha$  is the denitrification potential based on DO, according to the following criterion:  $\alpha = 0$  for  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg L}^{-1}$  and  $\alpha = 1$  for  $\text{DO} = 0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $f_{\text{NO}_3}$  refers to the effect of the concentration of  $\text{NO}_3^-$  required for the reaction that follows a nonlinear Michaelis–Menten behavior:

$$f_{\text{NO}_3} = N / (K + N) \quad (10)$$

where  $f_{\text{NO}_3}$  is dimensionless and ranges from 0 to 1, N is the concentration of  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ), and K is the mean saturation constant with a value of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  for  $f_{\text{NO}_3} = 0.5$  (Heinen 2006).

Since denitrification is a biological process, the rate of reaction increases exponentially with T according to the Arrhenius law. Bacterial activity is zero ( $f_T = 0$ ) at  $0^\circ\text{C}$  and optimum ( $f_T = 1$ ) at  $20^\circ\text{C}$  (Heinen 2006). Optimum pH for the reaction ranges from 7.0 to 7.5 ( $f_{\text{pH}} = 1$ ), the reaction ceasing at  $\text{pH} < 4$  or  $\text{pH} > 10$  ( $f_{\text{pH}} = 0$ ) (Heinen 2006). Finally, the magnitude of  $\text{NO}_3^-$  loss increases in relation to  $\tau$ . The fraction of  $\text{NO}_3^-$  ( $x_{\text{NO}_3}$ ) potentially lost by denitrification can be calculated with the general equation (eq. 9).

### Model validation

After estimating the effects of volatilization and denitrification on the  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  signals, respectively, and constructing the simple and coupled models to predict the isotopic signals of DIN, the results were validated using the water column  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  and  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  values determined by diffusion methods. The model with highest affinity to the values determined in the field by linear regression analysis was selected. The macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  values were plotted in relation to the  $\delta^{15}\text{N-DIN}$  signals predicted by the validated model.

### Estimating the relative contributions

The MixSIR program based on Bayesian statistics (Moore and Semmens 2008) was used to solve the mixing models (simple and coupled) constructed to estimate the probable distribution of the contributions of N sources in the lagoon system. The isotopic composition of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$

### Desnitrificación ( $D_{\text{NO}_3}$ )

La reacción de la desnitrificación ( $\text{CHONP} + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ ) depende primordialmente de la ausencia de OD y presencia de  $\text{NO}_3^-$ , pero también es influenciada por la T, el pH, y el  $\tau$ . El efecto de esta reacción se evaluó mediante la ecuación general de la desnitrificación (Heinen 2006):

$$D_{\text{NO}_3} = \alpha f_{\text{NO}_3} f_T f_S f_{\text{pH}} \quad (9)$$

donde  $\alpha$  representa el potencial de desnitrificación basado en el OD, según el siguiente criterio:  $\alpha = 0$  para  $\text{OD} \geq 2 \text{ mg L}^{-1}$  y el valor se incrementa hasta  $\alpha = 1$  cuando  $\text{OD} = 0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $f_{\text{NO}_3}$  se refiere al efecto de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  requerido para la reacción que sigue un comportamiento no lineal del tipo Michaelis–Menten:

$$f_{\text{NO}_3} = N / (K + N) \quad (10)$$

donde  $f_{\text{NO}_3}$  es adimensional y varía de 0 a 1, N es la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y K es la constante media de saturación con un valor de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para  $f_{\text{NO}_3} = 0.5$  (Heinen 2006).

Dado que la desnitrificación es un proceso biológico, la velocidad de reacción se incrementa exponencialmente con la T según la ley de Arrhenius. La actividad bacteriana es cero ( $f_T = 0$ ) a una T de  $0^\circ\text{C}$  y se incrementa en función de la T hasta alcanzar su óptimo ( $f_T = 1$ ) a  $20^\circ\text{C}$  (Heinen 2006). El pH óptimo para la reacción varía de 7.0 a 7.5 ( $f_{\text{pH}} = 1$ ); la reacción cesa a  $\text{pH} < 4$  o  $\text{pH} > 10$  ( $f_{\text{pH}} = 0$ ) (Heinen 2006). Finalmente, la magnitud de la pérdida de  $\text{NO}_3^-$  se incrementa en función de  $\tau$ . La resolución de la ecuación general (ec. 9) permite calcular la fracción de  $\text{NO}_3^-$  ( $x_{\text{NO}_3}$ ) potencialmente perdida por desnitrificación.

### Validación de los modelos

Una vez que se estimaron los efectos de volatilización y desnitrificación en las señales del  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente, y que se resolvieron los dos modelos (simple y acoplado) para predecir las señales isotópicas en el NID, se validaron los resultados con los valores de  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  y  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  determinados en la columna de agua por las técnicas de difusión. Se seleccionó el modelo con mayor afinidad a los valores determinados en el campo mediante un análisis de regresión lineal. Los valores isotópicos  $\delta^{15}\text{N}$  en las macroalgas fueron graficados en función de las señales del  $\delta^{15}\text{N-NID}$  predichas por el modelo validado.

### Estimación de las contribuciones relativas

La resolución de los dos modelos de mezcla para estimar la probable distribución de las contribuciones de N al sistema

in the N sources and in representative samples of the water column, as well fractionation factors during ammonium volatilization and denitrification ( $\gamma$ ) were incorporated into solving the models. The relative contributions of the different N sources to macroalgae were also estimated using their isotopic signals according to their chemical form and the estimated fractionation effects.

## RESULTS

### Nitrogen sources and loading to the system

We identified five human-related sources of N that discharge into the Urias system: agricultural runoff, aquaculture effluents, atmospheric deposition, domestic wastewater effluents (sewage), and seafood processing plant (industrial) effluents (table 1). The total N loads ranged from 692 to 711 t yr<sup>-1</sup>; atmospheric deposition (29%) and treated and untreated sewage (28%) were responsible for the highest N inputs. The N load of marine origin, estimated by multiplying the volume of tidal flux for the Urias system by the mean concentration of N in the adjacent sea, was 94.1 t yr<sup>-1</sup> (13%); however, N export was 281 t yr<sup>-1</sup>. The N load per unit area of the microbasin and agricultural lands was 25.3 kg ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>, whereas the N load entering the Urias system was 384 to 395 kg yr<sup>-1</sup> per hectare of water mirror.

The N sources reaching the Urias system varied temporally. During the rainy season, terrestrial leachates from the Urias microbasin and agricultural soil washing were discharged mainly by the channels in the upper zone (LH) and the Infiernillo estuary in the intermediate zone (LMH), in addition to aquaculture effluents from two farms operating in LH (from August to December and April to June). Sewage and industrial effluents discharge into LMH and are relatively constant year-round sources.

The isotopic characterization of the N sources (table 1) varied from low signals for agricultural runoff ( $2.1 \pm 0.70\%$ ; mean  $\pm$  standard deviation) to very high for treated sewage ( $16.1 \pm 0.30\%$ ) and industrial effluents ( $19.1 \pm 0.68\%$ ). On average, the signal derived for leachates from the Urias microbasin varied little (1.4–2.8%), depending on the agricultural land drained. Marine NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ranged from 1.9% to 5.5% according to the sampling season. Groundwater N loads were not considered, but we believe that the main N sources to the aquifer are atmospheric deposition and, to a lesser extent, agricultural runoff to the Mazatlán sub-basin and sewage from suburban and rural areas.

### Environmental variables, chemical forms, and isotopic composition of nitrogen

The spatiotemporal variation of T, S, pH, and DO in the Urias system is summarized in table 2: T ranged from 22.2  $\pm$  1.5 to 33.6  $\pm$  0.59 °C; S ranged from 25.9  $\pm$  2.5 to 39.8  $\pm$  2.8; mean pH was 7.81  $\pm$  0.26, with minimum and maximum

lagunar se realizó con el programa MixSIR basado en estadística Bayesiana (Moore y Semmens 2008). La composición isotópica del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las fuentes de N y en muestras representativas de la columna de agua, así como los factores de fraccionación por volatilización de amonio y desnitrificación ( $\gamma$ ), fueron incorporados en la solución de los modelos. También se estimaron las contribuciones relativas de las diferentes fuentes de N a las macroalgas utilizando sus señales isotópicas según su forma química y los efectos de fraccionación estimados.

## RESULTADOS

### Fuentes y cargas de nitrógeno al sistema

Se identificaron cinco fuentes antropogénicas de N que descargan en el sistema de Urias: escurrimientos agrícolas, efluentes acuícolas, depósito atmosférico, aguas residuales domésticas (en adelante aguas residuales) y efluentes del procesamiento de productos pesqueros (tabla 1). Las cargas totales de N se calcularon entre 692 y 711 t año<sup>-1</sup>. Los mayores aportes provinieron del depósito atmosférico (29%) y de las aguas residuales tratadas y sin tratar (28%). La carga de N de origen marino, estimada multiplicando el volumen de flujo de marea para el sistema de Urias por la concentración promedio de N del mar adyacente, fue de 94.1 t año<sup>-1</sup> (13%); sin embargo, la exportación de N fue de 281 t año<sup>-1</sup>. La carga de N por unidad de área de la microcuenca y de los suelos agrícolas fue de 25.3 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, mientras que la carga de N que entra al sistema de Urias fue de 384 a 395 kg año<sup>-1</sup> por hectárea de espejo de agua.

Las fuentes de N que llegan al sistema de Urias variaron temporalmente. En la época lluviosa se produce la entrada de lixiviados terrestres de la microcuenca del sistema de Urias y del lavado de suelos agrícolas, principalmente por los canales del HL y por el estero Infiernillo en el HLM, además de los aportes de efluentes acuícolas de dos granjas que operan en el HL (de agosto a diciembre y de abril a junio). Las aguas residuales y los efluentes del procesamiento de productos pesqueros descargan en la zona intermedia (HLM) y son fuentes relativamente constantes a lo largo del año.

La caracterización isotópica de las fuentes de N (tabla 1) varió desde señales bajas para los escurrimientos agrícolas ( $2.1 \pm 0.70\%$ ; media  $\pm$  desviación estándar) hasta muy elevadas para las aguas residuales tratadas ( $16.1 \pm 0.30\%$ ) y los efluentes del procesamiento de productos pesqueros ( $19.1 \pm 0.68\%$ ). En promedio, la señal derivada de los lixiviados de la microcuenca del sistema de Urias varió poco (1.4–2.8%), dependiendo de los terrenos que fueron lavados. El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de origen marino varió de 1.9% a 5.5% según la temporada de muestreo. El N descargado vía aguas subterráneas no fue considerado. Sin embargo, consideramos que la fuente principal de N al acuífero es el depósito atmosférico y, en menor proporción, los escurrimientos agrícolas que descargan en la

**Table 1.** Nitrogen loads and isotopic composition of nitrogen sources discharging into the Uriás lagoon system. The isotopic and fractionation values of the sources are based on the differences between the signals observed in the water column and those of the original sources.**Tabla 1.** Cargas de nitrógeno y composición isotópica de las fuentes de nitrógeno que llegan al sistema lagunar de Uriás. Se muestran los valores isotópicos de las fuentes y su fraccionación basada en las diferencias de las señales observadas en la columna de agua y las de las fuentes originales.

N sources	N loading (t yr <sup>-1</sup> , %)	$\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ (‰)		$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ (‰)	
		Source	Fractionation	Source	Fractionation
Aquaculture	33–52, 6.5	8.00 ± 1.00	5.51 ± 3.91	6.71 ± 4.89	3.01 ± 2.10
Agriculture	97.4, 14	4.00 ± 1.00	0.91 ± 2.40	2.10 ± 0.70	6.28 ± 1.59
Sewage	195.2, 27	16.10 ± 0.30	3.59 ± 4.91	8.19 ± 1.89	1.57 ± 3.09
Seafood processing industry	>74.6, 10.5	19.10 ± 0.68	1.42 ± 0.79	8.17 ± 3.25	2.10 ± 1.03
Oceanic	94.1, 13	1.90 ± 0.80	1.11 ± 0.39	3.70 ± 1.80	3.18 ± 1.78
Atmospheric deposit	203, 29	11.80 ± 4.30	ND	-13.80 ± 3.90	ND

ND, not determined.

values during the dry and rainy seasons, respectively; and DO on average ranged from  $2.40 \pm 0.98$  to  $10.2 \pm 0.98$  mg L<sup>-1</sup>, with values as low and high as <1 and 16.7 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Minimum values of DO ( $0.77$ – $2.0$  mg L<sup>-1</sup>) were mainly observed within the tidal channels in LH and LMH (e.g., Infiernillo and Confites estuaries) and at other sites in LMH. In these low DO zones, sediments display anoxic conditions (H<sub>2</sub>S formation and blackish color).

The levels of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ranged from  $13.1 \pm 10.2$  µg L<sup>-1</sup> (December, MH) to  $245 \pm 172$  µg L<sup>-1</sup> (May, LMH) (table 3). Note that NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations  $\geq 1180$  µg L<sup>-1</sup> were recorded at one site in LMH, associated with industrial effluents. The concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> plus NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ranged from  $6.18 \pm 1.56$  µg L<sup>-1</sup> (March, MH) to  $204 \pm 80.1$  µg L<sup>-1</sup> (November, LMH). The TDN levels also varied widely, between  $134 \pm 4.63$  µg L<sup>-1</sup> (February, MH) and  $2836 \pm 1231$  µg L<sup>-1</sup> (May, LMH). A high percentage (~80%) of TDN corresponded to DON, which is related to diverse anthropogenic inputs of organic matter, in particular sewage and industrial effluents.

Similar to the N concentrations, the isotopic values for both chemical forms also showed high spatial and temporal variation:  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ , from  $13.0 \pm 2.8$ ‰ to  $20.1 \pm 1.8$ ‰;  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ , from  $0.85 \pm 0.06$ ‰ to 13‰ (table 4). The lowest values for  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  (13.0–14.4‰) and  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  (0.85–3.93‰) were recorded during the rainy season in LH, whereas the highest were recorded in LMH throughout the year (17.4–20.1‰) and in LH during the dry-cold season (8.3–13‰).

The differences between the  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  and  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  values measured in the water column and in the original sources ( $\gamma$ ) (table 1) indicated enrichment. The mean differences were 1.6‰ to 6.3‰ (range of 0‰ to 12‰) for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and ~1.0‰ to 5.5‰ (range of 0‰ to 10‰) for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Considering that NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is the predominant form of sewage and industrial effluents and given that there is no direct source of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the area that receives such effluents

sub-cuenca de Mazatlán y las aguas residuales de sistemas de letrinas en asentamientos suburbanos y rurales.

#### Variables ambientales, formas químicas y composición isotópica del nitrógeno

La variación espaciotemporal de la T, S, pH y OD en el sistema de Uriás durante el periodo de estudio se resume en la tabla 2. La T varió de  $22.2 \pm 1.5$  a  $33.6 \pm 0.59$  °C. La S varió de  $25.9 \pm 2.5$  a  $39.8 \pm 2.8$ . El pH promedió  $7.81 \pm 0.26$ , con mínimos en secas y máximos en lluvias. El OD varió en promedio de  $2.40 \pm 0.98$  a  $10.2 \pm 0.98$  mg L<sup>-1</sup>, con valores tan bajos como <1 mg L<sup>-1</sup> a máximos de 16.7 mg L<sup>-1</sup>. Se observaron mínimos de OD (de 0.77 a 2.0 mg L<sup>-1</sup>) principalmente en el interior de los canales de marea del HL y HLM (e.g., esteros Infiernillo y Confites) y en otros sitios del HLM. En estas zonas de bajo OD, los sedimentos evidencian condiciones de anoxia (formación de H<sub>2</sub>S y coloración negruzca).

El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> varió de  $13.1 \pm 10.2$  µg L<sup>-1</sup> (diciembre, HM) a  $245 \pm 172$  µg L<sup>-1</sup> (mayo, HLM) (tabla 3). Cabe destacar que en uno de los sitios del HLM se registraron concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  $\geq 1180$  µg L<sup>-1</sup>, asociadas a la descarga de efluentes del procesamiento de productos pesqueros. La suma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> varió de  $6.18 \pm 1.56$  µg L<sup>-1</sup> (marzo, HM) a  $204 \pm 80.1$  µg L<sup>-1</sup> (noviembre, HLM). El NDT también presentó una amplia variabilidad, de  $134 \pm 4.63$  µg L<sup>-1</sup> (febrero, HM) a  $2836 \pm 1231$  µg L<sup>-1</sup> (mayo, HLM). Un alto porcentaje (~80%) del NDT correspondió a NOD, lo cual está relacionado con los aportes de materia orgánica de diversas actividades, en particular las aguas residuales y el procesamiento de productos pesqueros.

Al igual que ocurrió con las concentraciones de N, se observó una alta variación espacial y temporal en los valores isotópicos para ambas formas químicas:  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  varió de  $13.0 \pm 2.8$ ‰ a  $20.1 \pm 1.8$ ‰ y  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  varió de  $0.85 \pm 0.06$ ‰ a 13‰ (tabla 4). Los valores más bajos del  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$

**Table 2.** Monthly variation (mean  $\pm$  standard deviation) of temperature, salinity, dissolved oxygen, and pH in the water column in the Urías lagoon system from February 2009 to March 2010. LH, lagoonal habitat; LMH, lagoonal-marine habitat; MH, marine habitat.

**Tabla 2.** Variación mensual (media  $\pm$  desviación estándar) de la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH en la columna de agua del sistema lagunar de Urías de febrero de 2009 a marzo de 2010. LH, hábitat lagunar; LMH, hábitat lagunar marino; MH, hábitat marino.

Date (mm/yr)	Temperature (°C)			Salinity			Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )			pH		
	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH
02/09	24.5 $\pm$ 0.72	26.7 $\pm$ 0.61	ND	36.0 $\pm$ 0.22	35.4 $\pm$ 0.35	ND	4.67 $\pm$ 0.57	5.08 $\pm$ 0.56	ND	7.42 $\pm$ 0.07	7.54 $\pm$ 0.03	ND
04/09	27.5 $\pm$ 0.52	27.5 $\pm$ 1.41	29.5	38.6 $\pm$ 1.72	35.0 $\pm$ 1.26	35.2	10.20 $\pm$ 0.44	9.47 $\pm$ 1.00	7.36	7.83 $\pm$ 0.05	7.89 $\pm$ 0.06	7.49
05/09	ND	30.2 $\pm$ 0.79	30.9 $\pm$ 0.97	ND	35.8 $\pm$ 0.68	35.2 $\pm$ 0.28	ND	7.33 $\pm$ 0.13	7.04	ND	8.07 $\pm$ 0.13	7.70
06/09	31.6 $\pm$ 0.52	32.9 $\pm$ 0.96	30.0	39.8 $\pm$ 2.80	36.6 $\pm$ 1.11	35.0	2.58 $\pm$ 0.29	2.64 $\pm$ 0.21	5.59	8.02 $\pm$ 0.12	8.08 $\pm$ 0.03	7.80
07/09	32.5 $\pm$ 0.95	33.6 $\pm$ 0.59	32.6 $\pm$ 0.05	33.9 $\pm$ 0.51	33.6 $\pm$ 0.14	31.7 $\pm$ 1.56	4.63 $\pm$ 1.64	7.76 $\pm$ 1.19	7.73 $\pm$ 0.23	7.73 $\pm$ 0.43	7.95 $\pm$ 0.08	7.95 $\pm$ 0.13
08/09	30.0 $\pm$ 0.75	31.5 $\pm$ 0.47	30.9 $\pm$ 0.06	34.1 $\pm$ 0.67	34.5 $\pm$ 0.50	34.7 $\pm$ 0.02	5.35 $\pm$ 0.93	7.10 $\pm$ 1.27	6.72 $\pm$ 0.04	8.28 $\pm$ 0.11	7.92 $\pm$ 0.50	8.11 $\pm$ 0.05
09/09	32.3 $\pm$ 1.03	32.8 $\pm$ 0.20	32.0 $\pm$ 0.33	35.5 $\pm$ 0.56	34.5 $\pm$ 0.38	34.7 $\pm$ 0.05	4.98 $\pm$ 1.14	2.88 $\pm$ 0.36	2.40 $\pm$ 0.98	7.86 $\pm$ 0.11	7.70 $\pm$ 0.13	7.85 $\pm$ 0.06
10/09	29.3 $\pm$ 0.47	29.8 $\pm$ 0.38	29.4 $\pm$ 0.55	34.7 $\pm$ 0.47	34.5 $\pm$ 0.68	35.6 $\pm$ 0.55	4.68	4.79 $\pm$ 0.40	5.57	7.69	7.69 $\pm$ 0.03	7.65
11/09	25.0 $\pm$ 0.88	27.9 $\pm$ 0.73	27.4 $\pm$ 0.07	37.6 $\pm$ 0.87	35.6 $\pm$ 0.23	35.4 $\pm$ 0.08	10.0 $\pm$ 0.78	7.57 $\pm$ 1.04	6.64 $\pm$ 0.09	7.76 $\pm$ 0.21	7.79 $\pm$ 0.14	8.01 $\pm$ 0.04
12/09	24.3 $\pm$ 1.18	25.6 $\pm$ 0.53	25.1 $\pm$ 0.11	37.5 $\pm$ 0.84	36.1 $\pm$ 0.46	35.7 $\pm$ 0.01	8.25 $\pm$ 0.45	8.17 $\pm$ 0.28	8.86 $\pm$ 0.24	7.67 $\pm$ 0.04	7.72 $\pm$ 0.06	7.65
01/10	22.2 $\pm$ 1.53	25.3 $\pm$ 0.51	24.9 $\pm$ 0.38	25.9 $\pm$ 2.52	32.1 $\pm$ 1.46	35.0	6.16 $\pm$ 0.29	6.10 $\pm$ 0.25	6.58	7.65 $\pm$ 0.18	7.73 $\pm$ 0.13	8.08 $\pm$ 0.02
02/10	24.7 $\pm$ 1.19	26.1 $\pm$ 0.40	24.9 $\pm$ 0.19	35.5 $\pm$ 0.04	35.7 $\pm$ 0.13	35.8 $\pm$ 0.13	6.47 $\pm$ 0.29	6.56 $\pm$ 0.23	6.60 $\pm$ 0.05	7.62 $\pm$ 0.14	7.89 $\pm$ 0.14	8.08 $\pm$ 0.05
03/10	29.0	27.3 $\pm$ 1.54	24.1 $\pm$ 0.68	41.0	37.7 $\pm$ 0.92	37.1 $\pm$ 1.36	ND	ND	ND	8.03	8.20 $\pm$ 0.14	8.24 $\pm$ 0.04

ND, not determined.

**Table 3.** Monthly variation (mean  $\pm$  standard deviation) of ammonium, nitrate + nitrite, and total dissolved nitrogen in the Urías lagoon system from February 2009 to March 2010. LH, lagoonal habitat; LMH, lagoonal-marine habitat; MH, marine habitat.**Tabla 3.** Variación mensual (media  $\pm$  desviación estándar) del amonio, nitrato + nitrito, y nitrógeno disuelto total en el sistema lagunar de Urías de febrero de 2009 a marzo de 2010. LH, hábitat lagunar; LMH, hábitat lagunar marino; MH, hábitat marino.

Date (mm/yr)	Ammonium ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Nitrate + nitrite ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			Total dissolved nitrogen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH
02/09	43.7 $\pm$ 21.1	37.1 $\pm$ 17.6	ND	115.0 $\pm$ 49.1	57.1 $\pm$ 44.9	ND	364.0 $\pm$ 80.9	388.0 $\pm$ 82.9	ND
04/09	39.7 $\pm$ 16.3	38.7 $\pm$ 7.19	43.3	60.3 $\pm$ 49.7	65.2 $\pm$ 20.0	29.7	339.0 $\pm$ 46.5	539.0 $\pm$ 219.0	1233.0
05/05	ND	245.0 $\pm$ 172.0	69.5 $\pm$ 91.4	ND	35.3 $\pm$ 17.5	81.7 $\pm$ 54.8	ND	2840.0 $\pm$ 1231.0	572.0 $\pm$ 416.0
06/09	32.1 $\pm$ 26.2	63.4 $\pm$ 37.3	40.9	28.8 $\pm$ 19.9	47.3 $\pm$ 14.7	11.2	581.0 $\pm$ 356.0	949.0 $\pm$ 374.0	1012.0
07/09	150.0 $\pm$ 39.0	122.0 $\pm$ 45.8	26.9 $\pm$ 21.4	77.9 $\pm$ 53.7	78.3 $\pm$ 66.1	21.3 $\pm$ 16.5	1253.0 $\pm$ 376.0	1377.0 $\pm$ 706.0	532.0 $\pm$ 97.2
08/09	180.0 $\pm$ 112.0	106.0 $\pm$ 37.4	82.8 $\pm$ 52.7	116.0 $\pm$ 53.5	67.2 $\pm$ 20.6	38.2 $\pm$ 8.33	1670.0 $\pm$ 890.0	2610.0 $\pm$ 1044.0	2030.0 $\pm$ 546.0
09/09	33.7 $\pm$ 17.2	83.4 $\pm$ 36.9	30.5 $\pm$ 39.7	70.2 $\pm$ 30.6	77.5 $\pm$ 27.7	44.6 $\pm$ 30.2	748.0 $\pm$ 33.0	707.0 $\pm$ 323.0	1023.0 $\pm$ 577.0
10/09	39.1 $\pm$ 22.2	33.4 $\pm$ 19.6	55.3 $\pm$ 8.80	89.9 $\pm$ 32.4	39.3 $\pm$ 32.1	25.8 $\pm$ 7.77	1398.0 $\pm$ 702.0	468.0 $\pm$ 253.0	364.0 $\pm$ 102.0
11/09	72.2 $\pm$ 21.9	51.5 $\pm$ 16.7	18.5 $\pm$ 8.30	109.0 $\pm$ 43.5	204.0 $\pm$ 80.1	173.0 $\pm$ 26.9	490.0 $\pm$ 161.0	521.0 $\pm$ 178.0	350.0 $\pm$ 18.4
12/09	21.7 $\pm$ 13.1	44.0 $\pm$ 23.2	13.1 $\pm$ 10.2	202.0 $\pm$ 90.1	185.0 $\pm$ 84.5	113.0 $\pm$ 86.6	423.0 $\pm$ 289.0	594.0 $\pm$ 211.0	336.0 $\pm$ 62.2
01/10	37.3 $\pm$ 17.9	30.1 $\pm$ 18.4	21.6 $\pm$ 25.8	133.0 $\pm$ 63.7	71.9 $\pm$ 64.6	26.8 $\pm$ 3.59	393.0 $\pm$ 209.0	457.0 $\pm$ 176.0	375.0 $\pm$ 46.1
02/10	44.5 $\pm$ 21.6	39.0 $\pm$ 32.3	36.9 $\pm$ 11.4	62.1 $\pm$ 41.5	112.0 $\pm$ 101.0	24.8 $\pm$ 5.41	317.0 $\pm$ 154.0	275.0 $\pm$ 8 6.8	134.0 $\pm$ 4.63
03/10	0.30	23.4 $\pm$ 18.4	21.3 $\pm$ 5.36	29.5	18.6 $\pm$ 5.67	6.1 $\pm$ 1.56	402	247.0 $\pm$ 79.1	141.0 $\pm$ 48.4

ND, not determined.



**Table 4.** Monthly variation (average  $\pm$  standard deviation) of the isotopic signals of ammonium ( $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ ) and nitrates ( $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ) in the water column of the Urías lagoon system and dissolved inorganic nitrogen ( $\delta^{15}\text{N-DIN}$ ) modeling. LH, lagoonal habitat; LMH, lagoonal-marine habitat; MH, marine habitat.

**Tabla 4.** Variación mensual (media  $\pm$  desviación estándar) de las señales isotópicas del amonio ( $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ ) y nitratos ( $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ ) en la columna de agua del sistema lagunar Urías y del nitrógeno disuelto total modelado ( $\delta^{15}\text{N-DIN}$ , por sus siglas en inglés). LH, hábitat lagunar; LMH, hábitat lagunar marino; MH, hábitat marino.

Date (mm/yr)	$\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$			$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$			$\delta^{15}\text{N-DIN}$		
	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH	LH	LMH	MH
02/09	17.2 $\pm$ 1.58	18.7 $\pm$ 2.48	ND	9.01 $\pm$ 4.90	9.09 $\pm$ 4.07	ND	11.40 $\pm$ 3.85	13.10 $\pm$ 2.22	ND
04/09	17.6 $\pm$ 0.19	18.4 $\pm$ 2.92	15.2	12.80 $\pm$ 0.03	11.70 $\pm$ 2.89	4.33	15.00 $\pm$ 0.39	14.40 $\pm$ 1.51	10.8
05/09	ND	19.8 $\pm$ 1.14	17.3 $\pm$ 2.46	ND	5.66 $\pm$ 3.44	9.10 $\pm$ 4.23	ND	17.30 $\pm$ 2.40	14.20 $\pm$ 2.35
06/09	17.2 $\pm$ 2.03	18.5 $\pm$ 2.42	15.3	6.41 $\pm$ 0.11	7.84 $\pm$ 3.51	4.25	12.20 $\pm$ 1.81	13.70 $\pm$ 2.53	12.9
07/09	14.6 $\pm$ 3.01	19.0 $\pm$ 1.97	18.3 $\pm$ 2.75	1.22 $\pm$ 0.05	3.35 $\pm$ 3.45	4.04 $\pm$ 0.07	9.82 $\pm$ 2.02	14.00 $\pm$ 2.18	12.10 $\pm$ 1.85
08/09	13.0 $\pm$ 2.83	19.6 $\pm$ 1.31	18.0 $\pm$ 2.61	0.85 $\pm$ 0.06	4.23 $\pm$ 3.32	4.21 $\pm$ 0.04	8.03 $\pm$ 1.67	13.50 $\pm$ 2.62	12.60 $\pm$ 1.81
09/09	14.2 $\pm$ 3.72	19.5 $\pm$ 1.39	19.1 $\pm$ 2.32	3.93 $\pm$ 5.57	6.61 $\pm$ 4.76	9.46 $\pm$ 4.40	8.06 $\pm$ 4.17	13.20 $\pm$ 2.80	11.50 $\pm$ 2.31
10/09	14.4 $\pm$ 3.35	19.4 $\pm$ 1.41	15.9 $\pm$ 1.87	1.89 $\pm$ 0.33	3.68 $\pm$ 2.21	4.29 $\pm$ 0.03	5.44 $\pm$ 1.77	11.90 $\pm$ 4.05	12.30 $\pm$ 2.27
11/09	16.0 $\pm$ 2.89	18.8 $\pm$ 1.75	16.6 $\pm$ 2.35	3.06 $\pm$ 3.85	5.72 $\pm$ 3.32	11.90 $\pm$ 2.82	8.45 $\pm$ 2.61	8.58 $\pm$ 2.82	12.40 $\pm$ 2.17
12/09	16.6 $\pm$ 1.46	19.4 $\pm$ 1.66	19.6 $\pm$ 1.58	10.40 $\pm$ 2.80	9.90 $\pm$ 3.71	7.85 $\pm$ 4.40	11.13 $\pm$ 2.40	11.70 $\pm$ 2.77	8.96 $\pm$ 3.60
01/10	16.1 $\pm$ 1.42	19.5 $\pm$ 1.67	16.5 $\pm$ 2.37	10.90 $\pm$ 3.91	8.41 $\pm$ 4.33	10.40 $\pm$ 4.15	12.10 $\pm$ 3.61	12.60 $\pm$ 2.52	13.50 $\pm$ 0.54
02/10	18.7 $\pm$ 2.54	20.1 $\pm$ 1.77	15.1 $\pm$ 0.01	8.26 $\pm$ 3.43	10.10 $\pm$ 3.72	10.30 $\pm$ 4.05	13.90 $\pm$ 0.62	13.90 $\pm$ 1.58	12.90 $\pm$ 2.05
03/10	17.5	17.4 $\pm$ 4.41	15.1 $\pm$ 0.02	13.0	9.58 $\pm$ 4.13	4.56 $\pm$ 0.01	13.0	14.60 $\pm$ 1.71	12.50 $\pm$ 1.53

ND, not determined.

(LMH), the presence of  $\text{NO}_3^-$  in these waters is due to nitrification. The signals observed for  $\text{NO}_3^-$  averaged  $\sim 8.2\%$  (product), whereas those for  $\text{NH}_4^+$  ranged from 16.1‰ to 19.1‰ (reactive).

### Modelling $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae

Two mixing models were used to estimate the isotopic signals of N available in the water column ( $\delta^{15}\text{N}$ -DIN) and they were compared to the  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  signals observed ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{obs}}$ ) using diffusion methods. According to the results of the linear regression analysis, a better fit was obtained with the coupled model than with the simple model for both  $\text{NH}_4^+$  (coupled model:  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+ = 1.04[\delta^{15}\text{N-NH}_4^+_{\text{obs}}] - 0.64$ ,  $R^2 = 0.78$ ; simple model:  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+ = 0.93[\delta^{15}\text{N-NH}_4^+_{\text{obs}}] - 0.89$ ,  $R^2 = 0.51$ ) and  $\text{NO}_3^-$  (coupled model:  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = 1.02[\delta^{15}\text{N-NO}_3^-_{\text{obs}}] - 0.07$ ,  $R^2 = 0.87$ ; simple model:  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^- = 0.88[\delta^{15}\text{N-NO}_3^-_{\text{obs}}] - 1.40$ ,  $R^2 = 0.69$ ). Both forms showed a lower slope and more negative intercept in the simple model, which indicates lower signals relative to the coupled model.

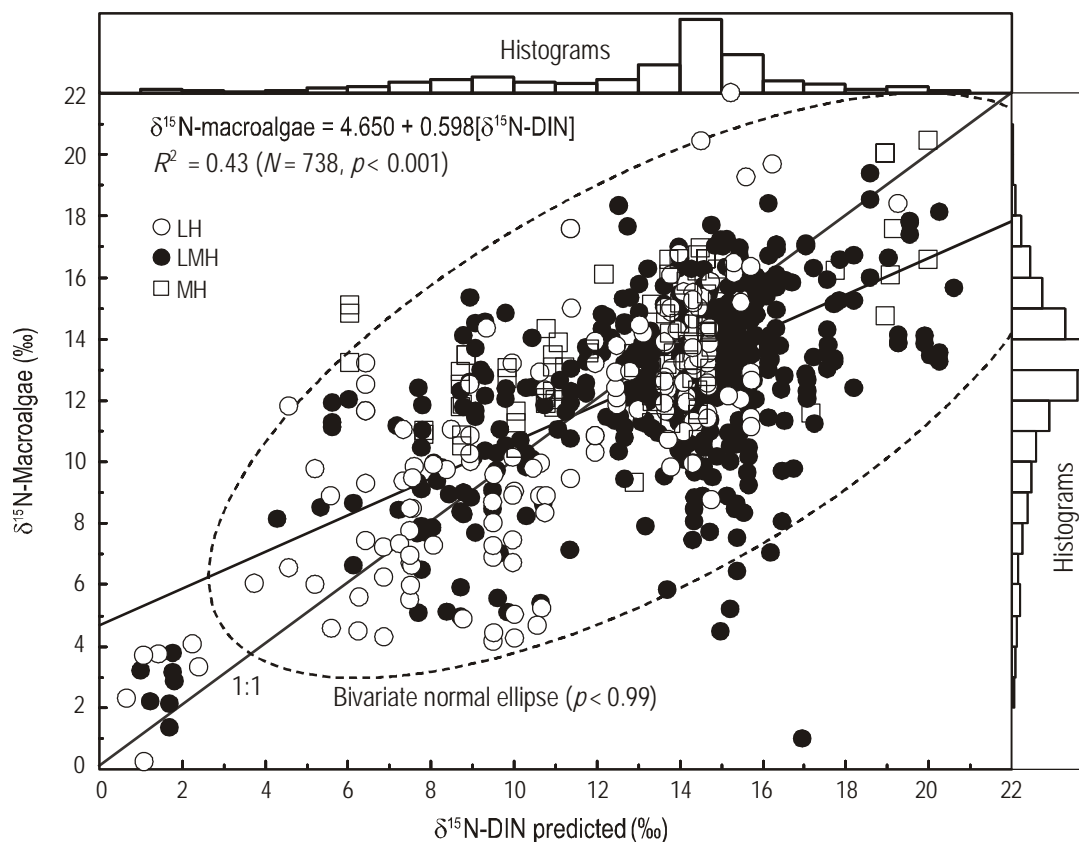
To validate the premise that macroalgae can be used as biomonitors of N pollution, we established the relation

(13.0–14.4‰) y del  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  (0.85–3.93‰) se registraron durante la época de lluvias en el HL, y los más altos se registraron en el HLM todo el año (17.4–20.1‰) y en el HL en la época seca-fría (8.3–13‰).

Las diferencias entre los valores de  $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$  y  $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$  medidos en la columna de agua y en las fuentes originales ( $\gamma$ ) (tabla 1) mostraron un enriquecimiento en la señales. Las diferencias promedio fueron de 1.6‰ a 6.3‰ (rango de 0‰ a 12‰) para  $\text{NO}_3^-$  y de  $\sim 1.0\%$  a 5.5‰ (rango de 0‰ a 10‰) para  $\text{NH}_4^+$ . Considerando que el  $\text{NH}_4^+$  es la forma predominante en los efluentes del procesamiento de productos pesqueros y las aguas residuales y dado que no hay fuente directa de  $\text{NO}_3^-$  en el área que recibe tales efluentes (HLM), la presencia de  $\text{NO}_3^-$  en estas aguas es producto de la nitrificación. Las señales observadas para el  $\text{NO}_3^-$  promediaron en  $\sim 8.2\%$  (producto), mientras que las de  $\text{NH}_4^+$  variaron de 16.1‰ a 19.1‰ (reactivo).

### Modelación del $\delta^{15}\text{N}$ -NID y $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgas

Con el modelo simple y el modelo acoplado se estimaron las señales isotópicas del N disponible en el agua ( $\delta^{15}\text{N}$ -NID),



**Figure 2.** Results of the linear regression analysis between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN available in the water column and  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae from the Urías lagoon system. LH, lagoonal habitat; LMH, lagoonal-marine habitat; MH, marine habitat.

**Figura 2.** Resultados del análisis de regresión lineal entre el  $\delta^{15}\text{N}$ -NID (DIN, por sus siglas en inglés) disponible en el agua y el  $\delta^{15}\text{N}$  en las macroalgas recolectadas en el sistema lagunar de Urías. LH, hábitat lagunar; LMH, hábitat lagunar-marino; MH, hábitat marino.

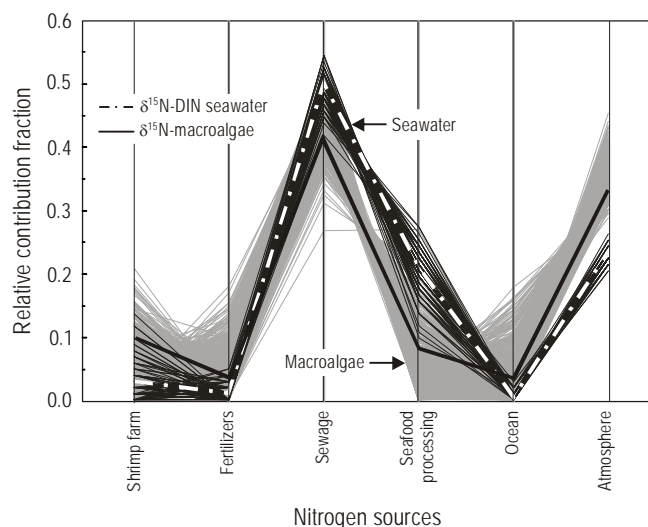
between  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and the isotopic signals of the 738 samples of macroalgae collected (fig. 2). The analysis revealed that all specimens had a significant  $R^2$  (0.43;  $n = 738$ ;  $P < 0.001$ ); however, there was high data dispersion related to the high isotopic variability in algae and DIN, as well as a lower than expected  $R^2$ .

### Relative contribution of nitrogen sources to $\delta^{15}\text{N}$ -DIN and $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae

The sewage effluents contributed 50% (45–56%) of N in the water column, atmospheric deposition contributed 24% (22–28%), industrial effluents 21% (12–29%), aquaculture 3% (0–12%), and agriculture 1% (0–7%), and 1% was of oceanic origin (0–3%) (fig. 3). The relative contributions in all the macroalgal specimens reflected that 41% (27–51%) of N was derived from sewage, 33% (2–45%) from atmospheric deposition, 10% (0–21%) from aquaculture, 8% (0–25%) from industrial effluents, and 4% (0–18%) from agriculture, and 4% (0–22%) was of oceanic origin.

## DISCUSSION

The method of  $\delta^{15}\text{N}$  in macroalgae used to determine the relative contributions of N sources to the Urías lagoon system is useful to assess the effect of different human activities on the ecosystem and thus be able to establish preventive measures. This is the first step in any management program aiming to restore coastal zones; however, in the case of the



**Figure 3.** Relative contribution of nitrogen sources to  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN available in the water column and to  $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgae from the Urías lagoon system.

**Figura 3.** Contribución relativa de las fuentes de nitrógeno al  $\delta^{15}\text{N}$ -NID (DIN, por sus siglas en inglés) disponible en la columna de agua y al  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas recolectadas en el sistema lagunar de Urías.

y éstas fueron comparadas con las señales de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  observadas ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{obs}}$ ) utilizando las técnicas de difusión. De acuerdo con los resultados del análisis de regresión lineal, se observó que el modelo acoplado tuvo un mejor ajuste que el modelo simple, tanto para  $\text{NH}_4^+$  (modelo acoplado:  $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+ = 1.04[\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+_{\text{obs}}] - 0.64$ ,  $R^2 = 0.78$ ; modelo simple:  $\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+ = 0.93[\delta^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+_{\text{obs}}] - 0.89$ ,  $R^2 = 0.51$ ) como para  $\text{NO}_3^-$  (modelo acoplado:  $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^- = 1.02[\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-_{\text{obs}}] - 0.07$ ,  $R^2 = 0.87$ ; modelo simple:  $\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^- = 0.88[\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-_{\text{obs}}] - 1.40$ ,  $R^2 = 0.69$ ). Ambas formas químicas presentaron una pendiente más baja y un intercepto más negativo en el modelo simple, lo cual indica señales más bajas respecto al modelo acoplado.

Para validar la premisa del uso de las macroalgas como biomonitores de contaminación por N, se estableció la relación entre el  $\delta^{15}\text{N}$ -NID modelado en la columna de agua con las señales isotópicas en las 738 muestras de macroalgas recolectadas (fig. 2). El análisis reveló que los especímenes en conjunto tuvieron un valor significativo de  $R^2$  (0.43;  $n = 738$ ;  $P < 0.001$ ). Sin embargo, se observó una alta dispersión de los datos relacionada con la alta variabilidad isotópica en las algas y en el NID, además de un  $R^2$  más bajo del esperado.

### Contribución relativa de las fuentes de nitrógeno al $\delta^{15}\text{N}$ -NID y al $\delta^{15}\text{N}$ -macroalgas

Las aguas residuales aportaron el 50% (45–56%) del N reflejado en el agua, el depósito atmosférico el 24% (22–28%), los efluentes del procesamiento de productos pesqueros el 21% (12–29%), los efluentes acuícolas el 3% (0–12%), los escurrimientos agrícolas el 1% (0–7%) y la fuente marina el 1% (0–3%) (fig. 3). Las contribuciones relativas en todos los especímenes de macroalgas reflejaron que el 41% (27–51%) del N se derivó de las aguas residuales, el 33% (2–45%) del depósito atmosférico, el 10% (0–21%) de efluentes acuícolas, el 8% (0–25%) de los efluentes del procesamiento de productos pesqueros y el 4% (0–18%) de escurrimientos agrícolas, y el 4% (0–22%) de N fue de origen oceánico.

## DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica del  $\delta^{15}\text{N}$  en macroalgas para determinar las contribuciones relativas de las fuentes de N que entran al sistema de Urías es útil para evaluar el impacto que están ocasionando las diferentes actividades humanas al ecosistema y poder tomar medidas en consecuencia. Este es un primer paso en cualquier plan de manejo para restaurar las zonas costeras prioritarias del país; sin embargo, siendo el sistema de Urías un ecosistema tan estresado y complejo, con múltiples fuentes de N, condiciones ambientales cambiantes en el tiempo y espacio, y una amplia diversidad de especies de macroalgas, se obtiene como resultado una

Urías system, which is such a stressed and complex ecosystem, with multiple N sources, a diversity of macroalgal species, and changing environmental conditions in space and time, the result is high isotopic variability that tends to obscure any distinction of the N sources in macroalgae.

There are three explanations for this “lack of fit” and high variability of the data: (a) the multiple N sources that enter the system and vary spatially and temporarily, with different chemical forms of N and a wide range of isotopic signals; (b) the complex biogeochemical processes related to the N cycle alter its chemical form and isotopic composition; and (c) the high diversity of macroalgal species collected (45), with an additional effect due to fractionation by assimilation. This results in high spatial and temporal variation of the concentration and isotopic signal of N in the water column and, consequently, the macroalgae.

Most of the biogeochemical processes such as ammonium volatilization, nitrification, denitrification, ammonification, and N assimilation alter the concentration, chemical form, and/or isotopic composition of N in the water column (Valiela *et al.* 1997, Kendall and Cadwell 1998, McClelland and Valiela 1998, Ricaurte-Villota *et al.* 2013). Based on the spatial and temporal variations of T, S, pH, and DO, and the chemical forms of N in the system, we suggest that the processes that have most impact are ammonium volatilization and denitrification. The relatively high values of pH, T, and S at the LH and LMH sites, as well as the high rates of organic matter decomposition and consequent production of  $\text{NH}_4^+$ , favor the conversion of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NH}_3$  and subsequent volatilization in the water column. The low DO levels observed in LH and at different LMH sites, together with the high concentrations of  $\text{NO}_3^-$  and accumulation of organic matter (1.2–4.1% of organic carbon) (Soto-Jiménez and Páez-Osuna 2001), high temperatures ( $T > 20^\circ\text{C}$ ), optimum pH (7.4–8.54), and long residence times, accelerate the denitrification process. The preferential removal of  $^{14}\text{N-NH}_4^+$  and  $^{14}\text{N-N}_2$  results in an enrichment of residual  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  relative to their original signal.

Simultaneous nitrification-denitrification is controversial because the biogeochemical processes of the N cycle that occur in the water column and sediments are not always coupled (Valiela *et al.* 1997, Soto-Jiménez *et al.* 2003b), particularly in highly eutrophized environments such as the Urías system. Although little research has been done on these processes in subtropical coastal environments, we maintain that coupling occurs in the Urías system when conditions are stable (e.g., dry-cold season), as has been observed in other coastal ecosystems (Dollhopf *et al.* 2005). Coupling occurs mainly in areas where mangroves grow, where the oxygen released from the roots promotes nitrification close to the anoxic sediment zone, in turn stimulating denitrification (Ottosen *et al.* 1999). Coupling, however, does not occur during the rainy season, when most of the N inputs are in the form of  $\text{NO}_3^-$  and organic matter.

elevada variabilidad isotópica que tiende a oscurecer cualquier distinción de las fuentes de N en las macroalgas.

La “falta de ajuste” y la alta variabilidad de los datos observados pueden ser explicadas por (a) las múltiples fuentes de N que entran al sistema y que varían espacial y temporalmente, con diferentes formas químicas de N y un rango de señales isotópicas muy amplio; (b) los procesos biogeoquímicos complejos relacionados con el ciclo de N que alteran su forma química y composición isotópica; y (c) la gran diversidad de especies de macroalgas recolectadas (45), con un efecto adicional debido a la fraccionación por asimilación. Todo lo anterior resulta en una amplia variabilidad espacial y temporal en la concentración y señal isotópica del N en la columna de agua y, como consecuencia, en la macroalga.

La mayoría de los procesos biogeoquímicos como la nitrificación, desnitrificación, amonificación, volatilización de amonio y asimilación de N alteran la concentración, forma química y/o la composición isotópica del N en la columna de agua (Valiela *et al.* 1997, Kendall y Cadwell 1998, McClelland y Valiela 1998, Ricaurte-Villota *et al.* 2013). Con base en las variaciones espaciotemporales de T, S, pH y OD, y las formas químicas del N en el sistema, consideramos que los procesos que tienen mayor impacto son la volatilización de amonio y la desnitrificación. Los valores relativamente altos de pH, T y S en sitios del HL y HLM, así como las altas tasas de descomposición de materia orgánica con su consecuente producción de  $\text{NH}_4^+$ , favorecen la conversión de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  y su posterior volatilización en la columna de agua. Los bajos niveles de OD observados en el HL y en distintos sitios del HLM, junto con las altas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y acumulación de materia orgánica (1.2–4.1% de carbono orgánico) (Soto-Jiménez y Páez-Osuna 2001), las altas temperaturas ( $T > 20^\circ\text{C}$ ), el pH en el intervalo óptimo (7.4–8.54) y los largos tiempos de residencia, aceleran la desnitrificación al máximo. La remoción preferencial del  $^{14}\text{N-NH}_4^+$  y  $^{14}\text{N-N}_2$  resulta en un enriquecimiento del  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  residual con respecto a su señal original.

La nitrificación-desnitrificación es controversial dado que los procesos biogeoquímicos del ciclo del N que ocurren en la columna de agua y en los sedimentos no siempre se encuentran acoplados (Valiela *et al.* 1997, Soto-Jiménez *et al.* 2003b), en particular en ambientes altamente eutrofizados como el sistema de Urías. Aunque el estudio de estos procesos en ambientes costeros subtropicales es muy limitado, nosotros sostenemos la hipótesis del acoplamiento en el sistema de Urías en épocas con condiciones estables (e.g., en la época seca-fría), como ha sido observado en otros ecosistemas costeros (Dollhopf *et al.* 2005). Dicho acoplamiento ocurre mayormente en las áreas con manglar, donde el oxígeno liberado desde las raíces fomenta la nitrificación cerca de la zona anóxica de los sedimentos, estimulando a su vez la desnitrificación (Ottosen *et al.* 1999). Sin embargo, el acople se rompe en la época lluviosa, cuando se da el mayor aporte de N en la forma de  $\text{NO}_3^-$  y de materia orgánica.

In addition to the different N sources and biogeochemical processes, the diversity and condition (e.g., juvenile, adult) of the macroalgal species also contribute to high isotopic variability. Few studies have measured fractionation factors during N uptake by macroalgae. Swart *et al* (2008) reported values of 2–4‰ for  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  uptake, and Kaldy (2011) obtained values of 3‰ for  $\text{NH}_4^+$  uptake and of 0‰ for  $\text{NO}_3^-$  uptake.

In general, the macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  values obtained in this study fall within the range of values reported for other sites in the world affected by the same sources (Deutsch and Voss 2006, Dailer *et al.* 2010, Kaldy 2011). In Mexico, few similar studies have been conducted. Atmospheric deposition, wastewater discharges, agriculture, aquaculture, and livestock rearing were found to be the main sources of anthropogenic N in three coastal ecosystems of Sinaloa (Soto-Jiménez *et al.* 2003b, Piñón-Gimate *et al.* 2009). Untreated sewage pollutes the coastal zone of the Yucatán Península (Carruthers *et al.* 2005) and the Mexican Caribbean (Mutchler *et al.* 2007). In the Urias system, atmospheric deposit, sewage and industrial effluents are the most apparent sources in the water column and macroalgae and, therefore, have a greater impact on the system. Aquaculture and agricultural activities and oceanic N are less important.

In summary, macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  is widely used to determine N sources and evaluate N pollution in coastal ecosystems; however, the different sources of variability observed in this study hampered the precise resolution of the mixing models used to estimate the N sources. It is necessary to use models that integrate factors which alter the chemical forms and isotopic signals of N (Moore and Semmens 2008) rather than the simple physical mixing models that do not consider fractionation (Phillips and Gregg 2003). Our coupled model allowed a better prediction of the available N isotopic signals relative to those observed in the water, and in turn the predicted  $\delta^{15}\text{N}$  values showed a close association with those measured in the macroalgae. Biogeochemical processes such as volatilization and denitrification and even macroalgal uptake that increase the signal by several parts per thousand are among the most important factors to consider.

By applying physical mixing models and adding the effects of the biogeochemical processes associated with the N cycle, it was possible to largely explain the variability of  $\delta^{15}\text{N}$ -DIN in water and, therefore, in macroalgae. Though macroalgae are excellent biomonitors of N in the ecosystem, their signals are a reflection of the N available in water and not necessarily of the sources that contribute it. Macroalgae integrate all the variability and reflect the isotopic signal resulting from all the processes. On the other hand, macroalgae (and their condition) can modify the N signal. So, for macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  analysis to be a reliable tool for the evaluation of the contribution of each source to the ecosystem, it is necessary to consider all the sources of variation. Otherwise, erroneous conclusions may be reached.

Además de las múltiples fuentes de N y los procesos biogeoquímicos, la alta diversidad de especies de macroalgas y su condición (e.g., juvenil, adulta) también contribuyen a la elevada variabilidad isotópica. Pocos trabajos han medido los factores de fraccionación durante la asimilación de N por las macroalgas. Swart *et al* (2008) registraron valores de 2–4‰ para la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$ , y Kaldy (2011) registró valores de 3‰ para la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  y 0‰ para  $\text{NO}_3^-$ .

En general, los valores  $\delta^{15}\text{N}$  de las macroalgas registrados en este estudio se ubicaron en el rango de los valores  $\delta^{15}\text{N}$  registrados para otros sitios del mundo impactados con las mismas fuentes (Deutsch y Voss 2006, Dailer *et al.* 2010, Kaldy 2011). En Mexico, los estudios de este tipo realizados en ecosistemas costeros son escasos, pero tales trabajos han revelado que el depósito atmosférico, las aguas residuales, los escurrimientos agrícolas, los efluentes acuícolas y los desechos de engorda de animales fueron las principales fuentes de N antropogénico en tres ecosistemas costeros de Sinaloa (Soto-Jiménez *et al.* 2003b, Piñón-Gimate *et al.* 2009). Las aguas residuales sin tratar contaminan la zona costera de la península de Yucatán (Carruthers *et al.* 2005) y del Caribe mexicano (Mutchler *et al.* 2007). En el sistema de Urias, las aguas residuales, los efluentes del procesamiento de productos pesqueros y el depósito atmosférico son las fuentes que mejor se reflejan en la columna de agua y en las macroalgas y, por tanto, las de mayor impacto al sistema. La actividad acuícola y agrícola y el N marino son menos importantes.

En resumen, el análisis del  $\delta^{15}\text{N}$  en macroalgas para determinar las fuentes de N y evaluar la contaminación de N en los ecosistemas costeros es una herramienta muy utilizada a nivel mundial; sin embargo, las diferentes fuentes de variabilidad observadas en este estudio dificultan la resolución precisa de los modelos de mezcla para la estimación de las fuentes de aporte. Para esto, es necesario utilizar modelos que integren los factores que alteran las formas químicas y señales isotópicas del N (Moore y Semmens 2008) más allá de los simples modelos de intercambio físico que no consideran la fraccionación (Phillips y Gregg 2003). En este estudio, el modelo acoplado permitió una mejor predicción de las señales isotópicas del N disponible respecto a las observadas en el agua, y los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  predichos a su vez mostraron una alta asociación con aquellos medidos en las macroalgas. Los procesos biogeoquímicos tales como la volatilización y desnitrificación y la propia asimilación de la macroalga que incrementan la señal en varias partes por mil están entre los factores más importantes a considerar.

Mediante la aplicación de modelos de mezcla de intercambio físico y la adición de los efectos de los procesos biogeoquímicos asociados al ciclo del N, fue posible explicar gran parte de la variabilidad del  $\delta^{15}\text{N}$ -NID en el agua y, por ende, en las macroalgas. Si bien, las macroalgas actúan como excelentes biomonitores del N en el ecosistema, sus señales son un reflejo del N disponible en el agua y no necesariamente de las fuentes que lo aportaron. Las macroalgas

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the project UNAM-PAPIIT IN206409. We thank Humberto Bojórquez-Leyva, Arcelia Cruz-López, and Roberto Velázquez-Ochoa for help in the field and laboratory, and Yovani Montano-Ley and Victoria Montes-Montes for revising the manuscript. The valuable comments and suggestions of two anonymous reviewers are appreciated.

English translation by Christine Harris.

## REFERENCES

- Carruthers TJB, van Tussenbroek BI, Dennison WC. 2005. Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 64: 191–199  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2005.01.015>
- Cohen RA, Fong P. 2005. Experimental evidence supports the use of  $\delta^{15}\text{N}$  content of the opportunistic green macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) to determine nitrogen sources to estuaries. *J. Phycol.* 41: 287–293.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04022.x>
- Dailer ML, Knox RS, Smith JE, Napier M, Smith CM. 2010. Using  $\delta^{15}\text{N}$  values in algal tissue to map locations and potential sources of anthropogenic nutrient inputs on the island of Maui, Hawaii, USA. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 655–671.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.021>
- Deusch B, Voss M. 2006. Anthropogenic nitrogen input traced by means of  $\delta^{15}\text{N}$  values in macroalgae: Results from *in-situ* incubation experiments. *Sci. Total Environ.* 366: 799–808.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.013>
- Dollhopf SL, Hyun JH, Smith AC, Adams HJ, O'Brien S, Kostka JE. 2005. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 240–246.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.1.240-246.2005>
- Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. 2nd. ed. Verlag Chemie, Weinheim, 419 pp.
- Heinen M. 2006. Application of a widely used denitrification model to Dutch data sets. *Geoderma* 13: 464–473.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.08.011>
- Holmes RM, McClelland JW, Sigman DM, Fry B, Petersen BJ. 1998. Measuring  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Mar. Chem.* 60: 235–243.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00099-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00099-6)
- Kaldy J. 2011. Using a macroalgal  $\delta^{15}\text{N}$  bioassay to detect cruise ship wastewater effluent inputs. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 1762–1771.
- Kendall C. 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. In: Kendall C, McDonnell JJ (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 519–576.
- Kendall C, Caldwell EA. 1998. Fundamentals of isotope geochemistry. In: Kendall C, McDonnell JJ (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 51–86.
- McClelland JW, Valiela I. 1998. Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnol. Oceanogr.* 43: 577–585.  
<http://dx.doi.org/10.4319/lo.1998.43.4.0577>
- Middleburg JJ, Nieuwenhuize J. 2001. Nitrogen isotope tracing of dissolved inorganic nitrogen behavior in tidal estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 53: 385–391.  
<http://dx.doi.org/10.1006/ecss.2001.0805>
- Montaño-Ley Y, Peraza-Vizcarra R, Páez-Osuna F. 2008. Tidal hydrodynamics and their implications for the dispersion of effluents in Mazatlán Harbor: An urbanized shallow coastal lagoon. *Water Air Soil Pollut.* 194: 343–357.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-008-9721-0>
- Moore JW, Semmens BX. 2008. Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models. *Ecol. Lett.* 11: 470–480.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01163.x>
- Mutchler T, Dunton KH, Townsend-Small A, Fredriksen S, Rasser MK. 2007. Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74: 449–457.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2007.04.005>
- Nixon SW. 1995. Coastal eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41: 199–220.
- Ochoa-Izaguirre MJ, Carballo JL, Páez-Osuna F. 2002. Qualitative changes in macroalgal assemblages under two contrasting climatic conditions in a subtropical estuary. *Bot. Mar.* 45: 130–138.  
<http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2002.014>
- Ottosen M, Risgaard-Petersen N, Nielsen LP. 1999. Direct and indirect measurements of nitrification and denitrification in the rhizosphere of aquatic macrophytes. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 19: 81–91.
- Phillips DL, Gregg JW. 2003. Source partitioning using stable isotopes: Coping with too many sources. *Oecologia* 136: 261–269.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00442-003-1218-3>
- Piñón-Gimate A, Soto-Jiménez MF, Ochoa-Izaguirre MJ, García-Pagés E, Páez-Osuna F. 2009. Macroalgae blooms and  $\delta^{15}\text{N}$  in subtropical coastal lagoons from the southeastern Gulf of California: Discrimination between agricultural, shrimp farm and sewage effluents. *Mar. Pollut. Bull.* 58: 1144–1151.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.004>

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó con fondos del proyecto UNAM-PAPIIT IN206409. Los autores agradecen el apoyo en los trabajos de campo y de laboratorio a Humberto Bojórquez-Leyva, Arcelia Cruz-López y Roberto Velázquez-Ochoa. Agradecemos también a Yovani Montano-Ley y Victoria Montes-Montes la revisión del manuscrito, y a los dos revisores anónimos sus comentarios y sugerencias.

- Ricaurte-Villota C, González-Yajimovich O, Sánchez A. 2013. Coupled response of rainfall and denitrification to solar forcing during the Holocene in Alfonso Basin. *Cienc. Mar.* 39: 151–164.  
<http://dx.doi.org/10.7773/cm.v39i2.2224>
- Savage C. 2005. Tracing the influence of sewage nitrogen in a coastal ecosystem using stable nitrogen isotopes. *Ambio* 34: 145–150.  
<http://dx.doi.org/10.1579/0044-7447-34.2.145>
- Sigman DM, Altabet MA, Michener R, McCorkle DC, Fry B, Holmes RM. 1997. Natural abundant-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: An adaptation of the ammonia diffusion method. *Mar. Chem.* 57: 227–242.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00009-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00009-1)
- Soto-Jiménez MF, Páez-Osuna F. 2001. Distribution and normalization of heavy metal concentrations in mangrove and lagoonal sediments from Mazatlán Harbor (SE Gulf of California). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 53: 259–274.  
<http://dx.doi.org/10.1006/ecss.2000.0814>
- Soto-Jiménez MF, Páez-Osuna F, Bojórquez-Leyva H. 2003a. Nutrient cycling at the sediment-water interface and sediments at Chiricahueto marsh: A subtropical ecosystem associated with agricultural land uses. *Water Res.* 37: 719–728.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00380-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00380-9)
- Soto-Jiménez M, Páez-Osuna F, Ruiz-Fernández AC. 2003b. Organic matter and nutrients in an altered subtropical marsh system, Chiricahueto, NW Mexico. *Environ. Geol.* 43: 913–921.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00254-002-0711-z>
- Spotte S, Adams G. 1983. Estimation of the allowable upper limit of ammonia in saline waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 207–210.
- Strickland JDH, Parsons TR. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Fish. Res. Bd. Canada, Bull.* 167, 311 pp.
- Swart PK, Evans S, Capo T. 2008. The origin of nitrogen isotope values in algae. A research project conducted by the stable isotope laboratory. Technical Report EPA 20080501, University of Miami, 29 pp.
- Valiela I, Collins G, Kremer J, Lajtha K, Geist M, Seely B, Brawley J, Sham CH. 1997. Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: New method and application. *Ecol. Appl.* 7: 358–380.
- Valiela I, Bowen JL, Kroeger KD. 2002. Assessment of models for estimation of land-derived nitrogen loads to shallow estuaries. *Appl. Geochem.* 17: 935–953.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00073-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00073-2)

*Received January 2013,  
received in revised form November 2013,  
accepted November 2013.*