

Effects of sulfide concentration, pH, and anoxia on photosynthesis and respiration of *Zostera marina*

Efecto de la concentración del sulfuro, pH y anoxia sobre la fotosíntesis y respiración de *Zostera marina*

LK Korhonen¹, V Macías-Carranza¹, R Abdala², FL Figueroa², A Cabello-Pasini^{1*}

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, apartado postal 453, Ensenada 22800, Baja California, México.

² Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, E-29071, Málaga, Spain.

* Corresponding author. E-mail: acabello@uabc.edu.mx

ABSTRACT. Sulfide produced in marine sediments by sulfate reduction is toxic for several macrophytes, and high sediment sulfide concentrations have been associated with seagrass die-off events. Sulfide has been shown to reduce growth in a number of seagrasses, but little is known about its effect on the photosynthetic and respiratory metabolism. Consequently, the aim of this research was to evaluate the effect of sulfide on photosynthesis and respiration of the seagrass *Zostera marina*. Photosynthetic oxygen evolution and respiration were determined polarographically, while the optimum quantum yield was used as a measure of the photosynthetic performance of photosystem II in the leaves of *Z. marina*. The results showed that sulfide concentrations of approximately 1000 μM could be considered an upper threshold limit for the survival of *Z. marina* in the coastal lagoons of Baja California (Mexico) studied. Respiration was not inhibited by sulfide concentrations up to 1000 μM during 48-h incubations, while photosynthetic performance was reduced by short exposure to sulfide concentrations of 25 μM but also by long exposure to concentrations as low as 50 μM . This is the first study that shows that the photosynthetic capacity of *Z. marina* is not recovered once the sulfide-free conditions have been re-established.

Key words: aerobic respiration, optimum quantum yield, sulfide, photosynthesis, *Zostera marina*.

RESUMEN. El sulfuro producido en los sedimentos a consecuencia de la reducción del sulfato es tóxico para algunas macrófitas. De la misma manera, altas concentraciones de sulfuro en el sedimento han sido asociadas con eventos de mortalidad en pastos marinos. Se ha observado que la presencia de sulfuro reduce el crecimiento en algunos pastos marinos; sin embargo, el efecto sobre el metabolismo fotosintético y respiratorio es poco conocido. En consecuencia, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de sulfuro sobre la fotosíntesis y la respiración de la fanerógama marina *Zostera marina*. La evolución del oxígeno fotosintético y la respiración fueron determinados polarográficamente, en tanto que el rendimiento cuántico óptimo fue utilizado como una medida del desempeño fotosintético del fotosistema II en las hojas de *Z. marina*. Los resultados mostraron que las concentraciones de sulfuro cercanas a 1000 μM pueden ser consideradas como el límite superior para la supervivencia de *Z. marina* en las lagunas costeras de Baja California (México) consideradas en este estudio. La respiración no presentó inhibición cuando las plantas fueron expuestas a concentraciones de sulfuro de 1000 μM durante incubaciones de 48 h, mientras que el desempeño fotosintético disminuyó al ser expuestas a concentraciones de 25 μM por cortos periodos de tiempo, pero también a exposiciones prolongadas en concentraciones de tan solo 50 μM . Este es el primer estudio que muestra que la capacidad fotosintética de *Z. marina* no se recupera una vez que las condiciones libres de sulfuro son restablecidas.

Palabras clave: respiración aeróbica, rendimiento cuántico óptimo, sulfuro, fotosíntesis, *Zostera marina*.

INTRODUCTION

Sulfate reduction is the main source of carbon remineralization in marine sediments (Jorgensen and Revsbech 1983, Canfield *et al.* 1993). Dissimilatory sulfate reduction by bacteria yields sulfide as a final product, which exists in sediment pore waters as a chemical equilibrium between S^{2-} , HS^- , and H_2S , mainly controlled by pH. At pH 6, 90% of the sulfide will be present as H_2S , while at pH 8, 80% of the sulfide will be present as HS^- and only 20% as H_2S . Sulfide produced by these sediment bacteria has been found to impact physiological functions of other aquatic organisms (Bagarinao 1992). Sulfide concentrations of only 1–10 μM in

INTRODUCCIÓN

La reducción del sulfato es la principal fuente de remineralización de carbono en los sedimentos marinos (Jorgensen y Revsbech 1983, Canfield *et al.* 1993). La reducción del sulfato por bacterias genera sulfuro como producto final, el cual se disocia y mantiene un equilibrio químico entre S^{2-} , HS^- y H_2S , controlados principalmente por el pH. A pH 6, el 90% del sulfuro estará presente como H_2S , mientras que a pH 8, el 80% del sulfuro estará presente como HS^- y sólo el 20% como H_2S . Se ha encontrado que el sulfuro producido por estas bacterias en el sedimento impactan las funciones fisiológicas de otros organismos acuáticos (Bagarinao 1992).

eukaryotic cells, for example, are inhibitors of cytochrome-c oxidase (Fenchel and Finlay 1995). On the other hand, sulfide concentrations in the sediment below 5000 μM have been found to limit growth in wetland macrophytes (Koch and Mendelssohn 1989, Koch *et al.* 1990, Erskine and Koch 2000) and can bind to metallo-enzymes in rice roots reducing their aerobic respiratory capacity (Allam and Hollis 1972).

It has been suggested that short-term increases in sulfide levels in the sediment or water can negatively impact eelgrass photosynthesis (Holmer and Bondgaard 2001). Sulfide concentrations in the water of approximately 50–100 μM , for example, have been shown to reduce three-fold the photosynthetic rates in *Zostera marina* (Holmer and Bondgaard 2001). Furthermore, this study demonstrated that sulfide concentrations above 100 μM stopped all photosynthetic activity in this seagrass. Reduced growth rates were also observed when eelgrass was exposed to hypoxia and sulfide in the water column (Holmer and Bondgaard 2001). Numerous studies relate high sulfide concentrations in the sediment to die-back events and seagrass decline (Carlson *et al.* 1994). These studies suggest that sulfide does not initiate the die-back event, but acts synergistically with other stressors such as light reduction, anoxia, hypersalinity, or high temperatures (Carlson *et al.* 1994).

Coastal lagoons are prone to periods of increased temperature, anoxia, salinity, and/or light reduction caused by sediment resuspension or high phytoplankton growth in eutrophicated systems. These conditions can produce a decline in the internal oxygen status of *Z. marina*, allowing for sulfide intrusion (Pedersen *et al.* 2004). Thus, eelgrass meadows in shallow coastal lagoons are more vulnerable to sulfide intrusion and possible die-back events. *Zostera marina* is the dominant submerged aquatic vegetation in the coastal lagoons of Baja California (Mexico) where anoxia and high levels of sulfide have been determined. While a reduction of eelgrass meadows in coastal lagoons of Baja California has been associated with decreasing light levels (Cabello-Pasini *et al.* 2002, 2003), it is also possible that high sulfide levels in the sediment and seawater could down-regulate photosynthetic and respiratory metabolism of seagrasses in these lagoons; however, this is still unknown. Consequently, the objective of this study was to evaluate the effect of sulfide on photosynthesis and respiration of the seagrass *Z. marina*. This study outlines the mechanistic basis of photosynthetic tolerance of *Z. marina* to sulfide in a coastal lagoon strongly impacted by oyster aquaculture.

MATERIAL AND METHODS

Zostera marina shoots were collected at San Quintín Bay (30°30' N, 116°01' W) and transported in ice coolers with seawater to the laboratory facilities at Ensenada, Baja California, Mexico. Shoots were transplanted into 2 L containers and placed in 1.2 m³ tanks with running seawater (approximately 1 vol d⁻¹). Seawater temperature fluctuated

Por ejemplo, concentraciones de sulfuro entre 1 y 10 μM en células eucariotas inhiben el citocromo c oxidasa (Fenchel y Finlay 1995). Por otra parte, se ha encontrado que concentraciones en el sedimento menores que 5000 μM limitan el crecimiento de las macrófitas en los humedales (Koch y Mendelssohn 1989, Koch *et al.* 1990, Erskine y Koch 2000) y también, al unirse a las metalo-enzimas en las raíces del arroz, reducen su capacidad respiratoria aeróbica (Allam y Hollis 1972).

Se ha sugerido que el aumento repentino de los niveles de sulfuro en el sedimento o el agua pueden afectar negativamente la fotosíntesis de los pastos marinos (Holmer y Bondgaard 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que concentraciones entre 50 y 100 μM de sulfuro en el agua, reduce tres veces las tasas fotosintéticas en *Zostera marina* (Holmer y Bondgaard 2001). Por otra parte, este estudio demostró que las concentraciones de sulfuro por arriba de 100 μM detienen toda la actividad fotosintética en este pasto marino. También se observó que en condiciones de hipoxia y presencia de sulfuro en la columna de agua existe una reducción de las tasas de crecimiento en los pastos marinos (Holmer y Bondgaard 2001). Por otra parte, numerosos estudios relacionan las altas concentraciones de sulfuro en el sedimento con eventos de muerte y, por consecuencia, la disminución en la distribución de pastos marinos (Carlson *et al.* 1994). Estos estudios sugieren que el sulfuro no inicia el evento de muerte en los pastos, sino que actúa sinérgicamente con otros factores de estrés tales como la reducción de la luz, la anoxia, hipersalinidad o las altas temperaturas (Carlson *et al.* 1994).

Las lagunas costeras están expuestas a periodos de aumento de la temperatura, la anoxia, la salinidad y/o reducción de la luz causada por la resuspensión de sedimentos o el crecimiento del fitoplancton en los sistemas eutróficos. Estas condiciones pueden producir una disminución del oxígeno interno de *Z. marina*, permitiendo la intrusión de sulfuro (Pedersen *et al.* 2004). De este modo, las praderas de *Z. marina* en las lagunas costeras de poca profundidad son más vulnerables a la intrusión de sulfuro y a los posibles eventos de muerte. *Zostera marina* es la vegetación acuática sumergida dominante en las lagunas costeras de Baja California (México) donde se ha encontrado la presencia de anoxia y altos niveles de sulfuro. Si bien una reducción de las praderas de *Z. marina* en las lagunas costeras de Baja California se ha asociado a la disminución de los niveles de luz (Cabello-Pasini *et al.* 2002, 2003), también es posible que los altos niveles de sulfuro en el sedimento y agua de mar podrían regular la disminución en el metabolismo fotosintético y respiratorio de los pastos marinos en estas lagunas; sin embargo, esto aún se desconoce. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de sulfuro en la fotosíntesis y la respiración de la fanerógama marina *Z. marina*. Este estudio describe el mecanismo básico de la tolerancia fotosintética de *Z. marina* al sulfuro en una laguna costera fuertemente impactada por la acuicultura de ostión.

between 19 and 21 °C and salinity was maintained constant at 35 throughout the experimental period. Natural irradiance levels and photoperiod were also provided throughout the study.

Photosynthesis and respiration

Maximum photosynthetic rates in the leaves of *Z. marina* were evaluated using polarographically-measured rates of steady-state oxygen evolution. Approximately 0.1 g of tissue ($n = 6$) from leaf #2 (youngest leaf = #1) was incubated in filtered seawater (0.45 μM , 2.1 mM DIC) at 20 °C in 5-mL jacketed chambers connected to a water-circulating bath. Maximum photosynthetic rates (P_{max}) were determined after providing the samples with photosynthetically saturating irradiance (300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $E_k = 96 \pm 12 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Quartzline halogen lamps (300 W) were used as a light source.

Optimum quantum yield (F_v/F_m) of the photosynthetic apparatus was determined by evaluating *in vivo* chlorophyll fluorescence with a pulse amplitude modulated fluorometer (PAM-210, Walz, Effeltrich, Germany). Intrinsic fluorescence (F_o) was determined in leaf #2 after maintaining the tissue (approximately 3 cm) in darkness for 1–2 h at the experimental pH. A saturating actinic light pulse (3000 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 800 ms) was applied to obtain maximum fluorescence (F_m) in the dark-acclimated samples. Variable fluorescence (F_v) was determined as the difference between F_m and F_o , and optimum quantum yield was calculated as the ratio of F_v/F_m (Schreiber *et al.* 1994).

Experimental design

The effect of pH and sulfide concentration on photosynthetic F_v/F_m was evaluated by incubating *Z. marina* leaf tissue in filtered seawater with sulfide (ranging from 0 [control] to 1000 μM) at pH 6 and pH 8 in darkness. Optimum quantum yield was evaluated as described above every 20 min for 135 min ($n = 3$). After the incubation period, leaf tissue was rinsed several times in sulfide-free seawater in darkness. Recovery of F_v/F_m after the sulfide treatment was evaluated by incubating the tissue at the same treatment pH in sulfide-free seawater in darkness for 24 h.

The effect of anoxia and sulfide concentration (25 μM sulfide) of leaf photosynthesis was evaluated by incubating tissue from the middle part of leaf #2 in oxygen-free seawater at pH 6 and pH 8 in darkness. Oxygen-free water was obtained by bubbling nitrogen into the seawater for 10 min as demonstrated polarographically in previous experiments. Optimum quantum yield in leaf tissue ($n = 7$) was evaluated every hour for 3 h as described above. Recovery of F_v/F_m after the sulfide treatment was evaluated by incubating the tissue at the same treatment pH in sulfide-free anoxic seawater in darkness. The recovery of F_v/F_m was evaluated for 24 h.

MATERIALES Y MÉTODOS

Haces de *Z. marina* fueron recolectados en Bahía San Quintín (30°30' N, 116°01' O) y transportados en hieleras con agua de mar a las instalaciones del laboratorio en Ensenada, Baja California, México. Los haces se trasplantaron en contenedores de 2 L y se colocaron en tanques de 1.2 m³ con un flujo de agua de mar (aproximadamente 1 vol d⁻¹). La temperatura del agua fluctuó entre 19 y 2 °C y la salinidad se mantuvo constante a 35 durante todo el periodo experimental. Los niveles de irradiancia y el fotoperiodo también se determinaron durante el estudio.

Fotosíntesis y respiración

Las tasas máximas de fotosíntesis en las hojas de *Z. marina* fueron evaluadas mediante la evolución de oxígeno determinada polarográficamente. Aproximadamente 0.1 g de tejido ($n = 6$) de la hoja #2 (hoja más joven = # 1) se incubó en agua de mar filtrada (0.45 μM , 2.1 μM DIC) a 20 °C en cámaras de 5 mL con doble pared conectadas a un termocirculador. Las tasas máximas de fotosíntesis (P_{max}) se determinaron después de irradiar las muestra con luz para llegar a la saturación fotosintética (300 mol quanta m⁻² s⁻¹, $E_k = 96 \pm 12 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Lámparas halógenas de cuarzo (300 W) fueron utilizadas como fuente de luz.

El rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) del aparato fotosintético se determinó mediante la medición de la fluorescencia de la clorofila *in vivo* con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM-210, Walz, Effeltrich, Alemania). La fluorescencia intrínseca (F_o) se determinó en la hoja #2 después de mantener el tejido (aproximadamente 3 cm) en la oscuridad durante 1–2 h al pH experimental. Un pulso de saturación de luz actínica (3000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 800 ms) se aplicó para obtener la fluorescencia máxima (F_m) en las muestras aclimatadas a la oscuridad. La fluorescencia variable (F_v) se determinó como la diferencia entre F_m y F_o , y el desempeño óptimo cuántico fue calculado como la razón de F_v/F_m (Schreiber *et al.* 1994).

Diseño experimental

El efecto del pH y la concentración de sulfuro en la razón fotosintética F_v/F_m se evaluó incubando tejido de la hoja de *Z. marina* en agua de mar filtrada con sulfuro (en un intervalo de 0 (control) a 1000 μM) a pH 6 y pH 8 en oscuridad. El rendimiento cuántico óptimo fue evaluado como se describió anteriormente cada 20 min por 135 min ($n = 3$). Después del periodo de incubación, el tejido foliar se lavó varias veces en agua de mar libre de sulfuro y en la oscuridad. Después del tratamiento de sulfuro, se evaluó la recuperación de F_v/F_m incubando el tejido en agua de mar libre de sulfuro, en la oscuridad y al mismo pH del tratamiento durante 24 h.

El efecto de la anoxia y de la concentración de sulfuro (25 μM de sulfuro) en la fotosíntesis se evaluó mediante la

The effect of sulfide concentration on maximum oxygen evolution (P_{\max}) and respiration was evaluated by incubating eelgrass shoots ($n = 5$) in filtered seawater with sulfide (0 [control] to 1000 μM) for 24 h in seawater at pH 6 and pH 8. Shoots were incubated at 20 °C, with an irradiance of 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and with light bubbling to maintain water circulation. After the incubation period, maximum photosynthesis and respiration was determined from approximately 0.1 g of tissue from the middle of the second leaf as described above.

Statistical analysis

Differences in F_v/F_m , P_{\max} , and respiration of the leaves as a function of sulfide concentration were evaluated using a one-way analysis of variance after testing for normality and homoscedasticity of the data (Sokal and Rohlf 1995). All pair-wise multiple comparisons were conducted using Tukey's test. Minimum significance levels were established at $P < 0.05$.

RESULTS

Significant differences in F_v/F_m were observed when shoots were incubated at different sulfate concentrations and between pH treatments (fig. 1). In shoots incubated at pH 6, optimum quantum yield decreased linearly ($P < 0.05$) to values below 0.3 in 90 min and values decreased ($P < 0.05$) to 0.196 in 15 min when shoots were incubated at sulfide concentrations of 1000 μM . Shoots incubated with sulfide at pH 6 did not show any recovery after they were incubated for 24 h in sulfide-free seawater. In contrast, shoots incubated at pH 8 and 50 μM sulfide did not show a significant decrease in F_v/F_m values ($P > 0.05$). At pH 8, there was a 25% decrease ($P < 0.05$) in F_v/F_m values when shoots were incubated at sulfide concentrations above 50 μM . There was no recovery of F_v/F_m values when shoots were incubated at pH 8 and with sulfide concentrations of 250 μM or above.

Shoots incubated at pH 6 and 10 μM sulfide did not show a decrease in F_v/F_m values ($P > 0.05$) relative to the control; however, there was a 22% reduction ($P < 0.05$) in F_v/F_m values, relative to the controls, when shoots were incubated at 25 μM (fig. 2). There was no recovery in F_v/F_m values after shoots were incubated for 24 h in sulfide-free seawater. In contrast to shoots incubated at pH 6, shoots incubated at pH 8 did not show a significant decrease ($P > 0.05$) in F_v/F_m values relative to those observed in the controls when incubated at 10 or 25 μM sulfide.

Optimum quantum yield values in the shoots of *Z. marina* incubated with 25 μM sulfide varied relative to the oxygen concentration in the medium (fig. 3). At pH 6 and 8, there was a significant decrease ($P < 0.05$) in F_v/F_m values in the leaves of *Z. marina* after shoots were incubated in anoxic conditions with 25 μM sulfide. In contrast, shoots incubated in oxygenic conditions (control) did not show any decrease in

incubación de tejido de la parte media de la hoja #2 en agua de mar libre de oxígeno a pH 6 y pH 8 en la oscuridad. Como se demostró polarográficamente en experimentos anteriores, el agua de mar libre de oxígeno se obtuvo por burbujeo con nitrógeno durante 10 min. El rendimiento óptico cuántico en el tejido de la hoja ($n = 7$) se evaluó cada hora durante 3 h como se ha descrito anteriormente. La recuperación de F_v/F_m después del tratamiento de sulfuro se evaluó incubando el tejido en agua de mar libre de sulfuro al mismo pH del tratamiento en condiciones anóxicas y en la oscuridad. La recuperación de F_v/F_m se evaluó durante 24 h.

El efecto de la concentración de sulfuro sobre la evolución máxima de oxígeno (P_{\max}) y la respiración se evaluó mediante la incubación de los haces de pasto marino ($n = 5$) en agua de mar filtrada con sulfuro (0 [control] a 1000 μM) durante 24 h en agua de mar a pH 6 y pH 8. Los haces se incubaron a 20 °C, con una irradiancia de 100 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con burbujeo ligero para mantener la circulación del agua. Después del periodo de incubación, la fotosíntesis máxima y la respiración se determinaron a partir de aproximadamente 0.1 g de tejido tomado de la mitad de la segunda hoja como se describió anteriormente.

Análisis estadístico

La diferencia en F_v/F_m , P_{\max} y la respiración de las hojas en función de la concentración de sulfuro fueron evaluados mediante un análisis de la varianza después de la prueba de normalidad y homocedasticidad de los datos (Sokal y Rohlf 1995). Todas las comparaciones múltiples por pares se llevaron a cabo con la prueba de Tukey. Los niveles mínimos de significancia se establecieron en $P < 0.05$.

RESULTADOS

Se observaron diferencias significativas en F_v/F_m cuando los haces se incubaron a diferentes concentraciones de sulfato y entre los tratamientos de pH (fig. 1). En haces incubados a pH 6, el rendimiento cuántico óptimo se redujo linealmente ($P < 0.05$) a valores inferiores a 0.3 en 90 min, y cuando los haces se incubaron a concentraciones de 1000 μM de sulfuro, los valores disminuyeron ($P < 0.05$) a 0.196 en 15 min. Los haces incubados con sulfuro a pH 6 no mostraron ninguna recuperación después de incubarse durante 24 h en agua de mar libre de sulfuro. Por el contrario, los haces incubados a pH 8 y 50 μM de sulfuro no mostraron una disminución significativa en los valores de F_v/F_m ($P > 0.05$). A pH 8, se produjo una disminución del 25% ($P < 0.05$) en los valores de F_v/F_m cuando los haces se incubaron a concentraciones mayores que 50 μM de sulfuro. No se presentó recuperación de los valores de F_v/F_m cuando los haces se incubaron a pH 8 y a concentraciones de sulfuro de 250 μM o más.

Los haces que se incubaron a pH 6 y 10 μM de sulfuro no mostraron una disminución en los valores de F_v/F_m ($P > 0.05$) con respecto al control; sin embargo, se presentó

F_v/F_m values. Optimum quantum yield values did not recover in shoots incubated for 20 h at pH 6. In contrast, there was a 60% recovery in F_v/F_m values when shoots were incubated at pH 8.

Maximum light-saturated oxygen evolution (P_{max}) and respiration in the leaves of *Z. marina* showed a differential response as a result of seawater pH and sulfide concentration (fig. 4). At pH 6, values of P_{max} in the leaves declined three-fold ($P < 0.05$) as the sulfide concentration increased from 0 to 250 μM . In contrast, at pH 8, P_{max} values remained constant ($P > 0.05$) at all sulfide concentrations. Respiration in the leaves of *Z. marina* did not fluctuate ($P > 0.05$) as a function of increasing sulfide concentrations or as a function of seawater pH.

DISCUSSION

The effect of high pore water sulfide concentration on the growth and survival of seagrasses has been documented in a

una reducción del 22% ($P < 0.05$) en los valores de F_v/F_m , en relación con los controles, cuando los haces se incubaron a 25 μM (fig. 2). No hubo recuperación en los valores de F_v/F_m después de que los haces fueron incubados durante 24 h en agua de mar libre de sulfuro. En contraste con los haces incubados a pH 6, los haces incubados a pH 8 no mostraron una disminución significativa ($P > 0.05$) en los valores de F_v/F_m relativo a los observados en los controles cuando se incubaron a 10 ó 25 μM de sulfuro.

Los valores del rendimiento cuántico óptimo en los haces de *Z. marina* incubados a 25 μM de sulfuro varió con respecto a la concentración de oxígeno en el medio (fig. 3). A pH 6 y 8, hubo una disminución significativa ($P < 0.05$) en los valores de F_v/F_m en las hojas de *Z. marina* después de que los haces se incubaron en condiciones de anoxia a una concentración de 25 μM de sulfuro. En contraste, los haces incubados en condiciones óxicas (control) no mostraron ninguna disminución en los valores de F_v/F_m . Algunos valores del rendimiento cuántico óptimo no se recuperaron en los haces

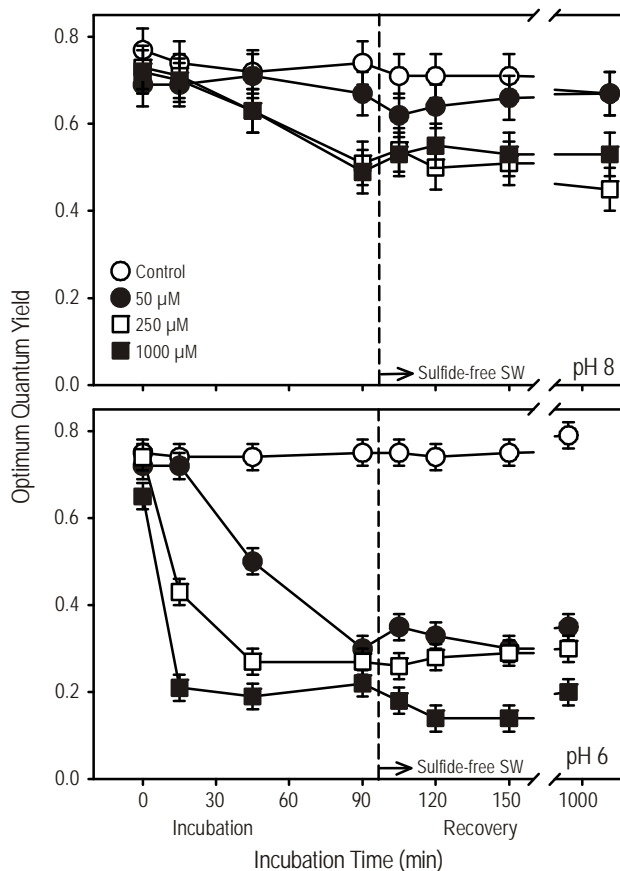


Figure 1. Optimum quantum yield values (mean \pm SD, $n = 9$) of *Zostera marina* leaves incubated in sulfide concentrations between 50 and 1000 μM , and recovery in sulfide-free seawater, at pH 6 and pH 8.

Figura 1. Valores del rendimiento cuántico óptimo (media \pm DE, $n = 9$) de las hojas a concentraciones de sulfuro entre 50 y 1000 μM , y la recuperación en agua libre de sulfuro, a pH 6 y pH 8.

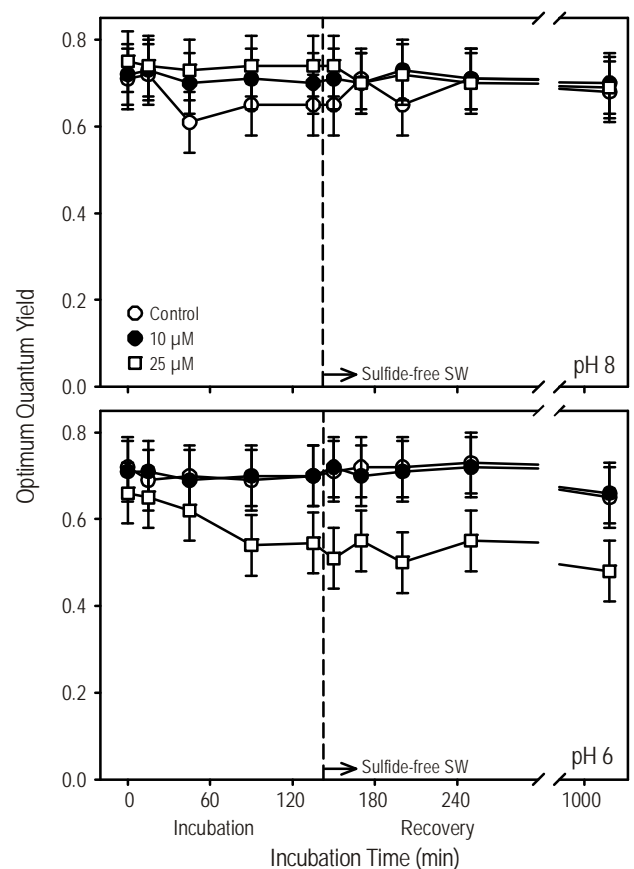


Figure 2. Optimum quantum yield values (mean \pm SD, $n = 9$) of *Zostera marina* leaves incubated in sulfide concentrations between 10 and 25 μM , and recovery in sulfide-free seawater, at pH 6 and pH 8.

Figura 2. Valores del rendimiento óptimo cuántico (media \pm DE, $n = 9$) de las hojas a concentraciones de sulfuro entre (10–25 μM), y la recuperación en agua libre de sulfuro, a un pH 6 y pH 8.

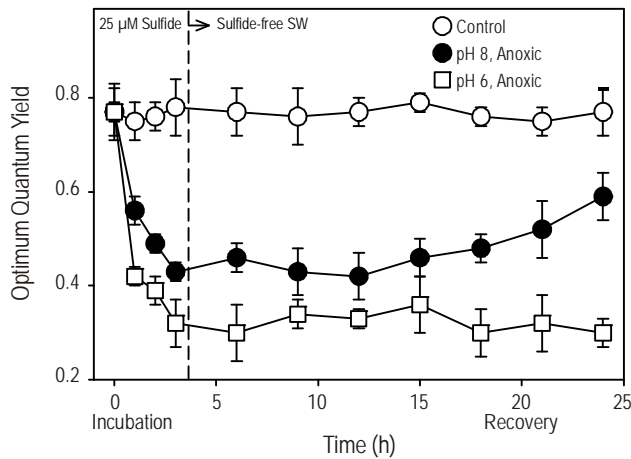


Figure 3. Optimum quantum yield values (mean \pm SD, $n = 6$) of *Zostera marina* leaves incubated in 25 μ M sulfide and under oxygenic (control) and anoxic conditions, at pH 6 and pH 8.

Figura 3. Valores del rendimiento óptimo cuántico (media \pm DE, $n = 6$) en hojas de *Zostera marina* incubadas en 25 μ M sulfuro y condiciones óxicas (control) y anóxicas, a un pH 6 y pH 8.

number of studies (Carlson *et al.* 1994, Borum *et al.* 2005, Calleja *et al.* 2007). Seagrasses generally grow in environments with highly reducing sediments. Under anoxic conditions, hydrogen sulfide can accumulate as an end-product of anaerobic respiration at levels that may be toxic to halophytes. In this study we demonstrate that F_v/F_m in *Z. marina* was negatively affected by high sulfide concentrations and low oxygen levels. We also show that the pH of seawater plays a critical role controlling the speciation of sulfides and ultimately impacting the photosynthetic and respiratory metabolism in the leaves of *Z. marina*.

Sulfide has been shown to be phytotoxic and consequently it can impact metabolic processes that can reduce growth and the survival of marine autotrophs. Sulfide pools are determined by seawater pH, where most is found as H_2S ($pK_1 = 6.9$) and HS ($pK_2 = 11.9$). This indicates that the ratio of $H_2S:HS$ is approximately 50% at pH 7, but at pH 6 sulfide levels increase to approximately 90%, while at pH 8 they are reduced to approximately 10%. In coastal lagoons of Baja California, seawater pH fluctuates between 7 and 8 (Álvarez-Borrego *et al.* 1975); however, pH levels could drop below 7 at the sediment-seawater interface as acidified pore water leaches out of the sediment. Under these circumstances, the concentration of sulfide can fluctuate widely and impact the physiology of plants.

Seagrasses generally display F_v/F_m values of around 0.7 (Durako and Kunzelman 2002), and a reduction of these values often indicates some kind of photochemical stress. In this study, *Z. marina* shoots incubated at sulfide levels above 25 μ M and pH 6 showed a reduction in F_v/F_m values. At this pH the dominant species is sulfide and it is likely responsible for reducing the photosynthetic potential. Oxygenic photosynthesis is based on the light-mediated electron flow

que se incubaron durante 20 h a un pH de 6. En contraste, hubo una recuperación del 60% en los valores de F_v/F_m cuando los haces se incubaron a pH 8.

La máxima evolución de oxígeno a luz de saturación (P_{max}) y la respiración en las hojas de *Z. marina* mostraron una respuesta diferencial como resultado del pH y la concentración de sulfuro del agua de mar (fig. 4). A un pH de 6, los valores de P_{max} en las hojas disminuyeron de tres veces ($P < 0.05$) durante el aumento en la concentración de sulfuro de 0 a 250 μ M. Por el contrario, a un pH de 8, los valores de P_{max} se mantuvieron constantes ($P > 0.05$) en todas las concentraciones de sulfuro. La respiración en las hojas de *Z. marina* no fluctuó ($P > 0.05$) como función del aumento en las concentraciones de sulfuro o en función del pH del agua de mar.

DISCUSIÓN

El efecto de la alta concentración de sulfuro del agua de poro en el crecimiento y supervivencia de algas marinas ha

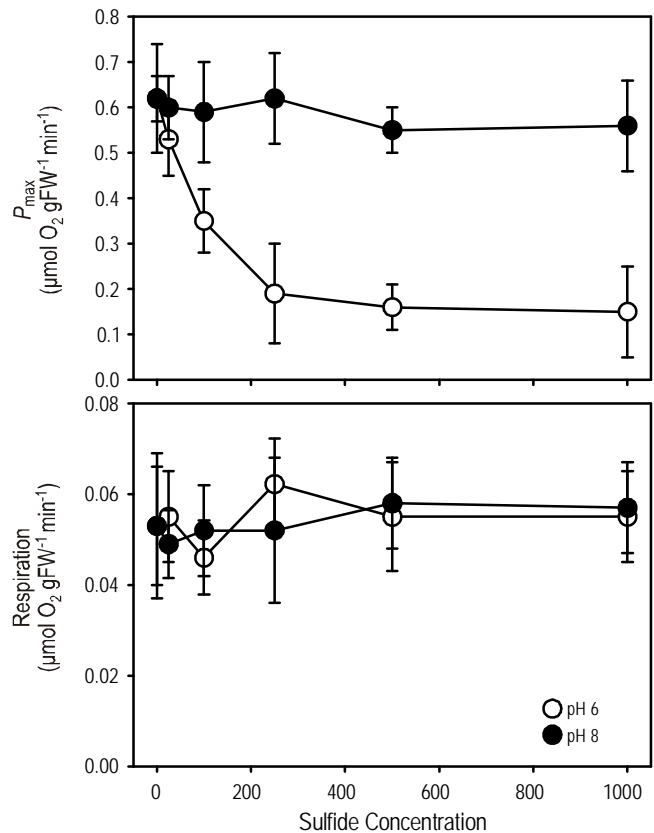


Figure 4. Maximum rates of oxygen evolution (P_{max}) and respiration (mean \pm SD) of *Zostera marina* leaves incubated at different sulfide concentrations (0 [control], 50, 100, 250, 500, and 1000 μ M) at pH 6 and pH 8.

Figura 4. Tasas máximas de la evolución de oxígeno (P_{max}) y respiración (media \pm DE) en hojas de *Zostera marina* incubadas a diferentes concentraciones de sulfuro (0 [control], 50, 100, 250, 500 y 1000 μ M) a un pH6 y pH8.

through photosystem II (PSII) and PSI. The repopulation of electrons in the PSII reaction centers is reduced in the presence of sulfide, which finally inhibits oxygenic photosynthesis at the donor site of PSII (Miller and Bebout 2004). Previous studies have also found a reduction in F_v/F_m in *Thalassia testudinum* when incubated in the presence of sulfide (Goodman *et al.* 1995, Koch *et al.* 2007). Increasing temperatures and low oxygen levels in the water column appear to aggravate the effect of sulfide on the photosynthetic metabolism. Values of P_{max} were reduced 40%, for example, after eelgrass shoots were incubated at sulfide concentrations between 50 and 100 μM (Holmer and Bondgaard 2001). The same tissue showed an 80% reduction when sulfide concentration was between 100 and 1000 μM under hypoxic conditions.

The half-life of the spontaneous reaction between sulfide and oxygen is of the order of 1 h (Almgren and Hagström 1974). So, even though the tissue was rinsed several times after incubation in sulfide, the higher uptake of oxygen observed in the experiment at pH 8 could be related to sulfide oxidation processes taking place inside the leaves. At pH 6, oxygen consumption was reduced in all treatments including the control, indicating that a factor other than sulfide was affecting the oxygen consumption rates. The reason why the same increase in oxygen consumption that occurred at pH 8 was not observed at pH 6 could be the specific initial rate of sulfide oxidation, which is dependent on pH. In acid solutions (pH < 6) the rate is very slow, increasing to a maximum of around pH 8 (Chen and Morris 1972).

Our experiments show a detrimental effect of sulfide on the photosynthetic capacity of eelgrass leaves. Ninety minutes of exposure to sulfide concentrations of 250 and 1000 μM (at pH 8) reduced F_v/F_m by 32% and 35%, respectively. When incubations at the same sulfide concentrations were tested at pH 6, which means that H_2S proportion of total sulfide is nine times higher, the reduction in F_v/F_m was larger and faster. The reduction in P_{max} values as a result of high sulfide levels is eventually reflected in a reduction of shoot growth rates.

Zostera marina is the most important autotroph in San Quintín Bay and covers approximately 40% of its area (Ward *et al.* 2004). On the other hand, shellfish farming is one of the most important activities in San Quintín Bay where oysters are grown using rack systems (Aguirre-Muñoz *et al.* 2001). Eelgrass mats below these racks have declined significantly (pers. obs.) and this has been attributed to a reduction in light due to shading by the racks or an increase in organic matter produced by oyster feces. Moreover, the increase in organic matter directly below the oyster racks is responsible for the increase in sulfide concentration due to the reduction in organic matter (Ito and Imai 1955). Thus, it is possible that the decline of *Z. marina* under the racks may be the result of increasing sulfide levels that in turn decrease photosynthesis of the seagrasses, eventually resulting in their decline.

has been documented in numerous studies (Carlson *et al.* 1994, Borum *et al.* 2005, Calleja *et al.* 2007). Las praderas marinas por lo general crecen en ambientes con alta reducción en los sedimentos. Bajo condiciones de anoxia, sulfuro de hidrógeno (ácido sulfhídrico) puede acumularse como un producto final de la respiración anaerobia a niveles que pueden ser tóxicos para halófitas. En este estudio demostramos que F_v/F_m en *Z. marina* se vió afectado negativamente por las altas concentraciones sulfúricas y los bajos niveles de oxígeno. Además, se demuestra que el pH del agua de mar desempeña un papel crítico que controla la especiación de los sulfuros y que finalmente impacta el metabolismo fotosintético y respiratorio en las hojas de *Z. marina*.

Se ha demostrado que el sulfuro es fitotóxico y en consecuencia puede afectar los procesos metabólicos que pueden reducir el crecimiento y la supervivencia de autótrofos marinos. Las fuentes de sulfuro están determinadas por el pH del agua de mar, donde la mayoría se encuentra como H_2S (pK1 = 6.9) y HS (pK2 = 11.9). Esto indica que la relación de H_2S : HS es de aproximadamente 50% a pH 7; sin embargo, a pH 6 los niveles de sulfuro se incrementan a aproximadamente 90%, mientras que a pH 8 se reduce a aproximadamente 10%. El pH del agua de mar en las lagunas costeras de Baja California oscila entre 7 y 8 (Álvarez-Borrego *et al.* 1975); sin embargo, los niveles de pH podrían caer por debajo de 7 en la interfaz sedimento-agua por la liberación del agua de poro fuera del sedimento. Bajo estas circunstancias, la concentración de sulfuro puede fluctuar ampliamente y afectar la fisiología de las plantas.

Las praderas marinas suelen mostrar valores de F_v/F_m de alrededor de 0.7 (Durako y Kunzelman 2002), y una reducción de estos valores suele indicar algún tipo de estrés fotoquímico. En este estudio, los haces de *Z. marina* que se incubaron a niveles de sulfuro por encima de 25 μM y pH 6 mostraron una reducción en los valores de F_v/F_m . A este pH la especie dominante es el sulfuro y probablemente es responsable de reducir el potencial fotosintético. La fotosíntesis oxigénica se basa en el flujo de electrones a través de la luz mediado por el fotosistema II (PSII) y PSI. La repoblación de los electrones en los centros de reacción PSII se reduce en presencia de sulfuro, que finalmente inhibe la fotosíntesis oxigénica en el sitio donante de PSII (Miller y Bebout 2004). Estudios anteriores también han encontrado una reducción de F_v/F_m en *Thalassia testudinum* cuando se incubaron en presencia de sulfuro (Goodman *et al.* 1995, Koch *et al.* 2007). El aumento en las temperaturas y los niveles bajos de oxígeno en la columna de agua parecen agravar los efectos de sulfuro sobre el metabolismo fotosintético. Por ejemplo, los valores de P_{max} se redujeron 40% después de que los haces de pasto marino se incubaron en concentraciones de sulfuro de entre 50 y 100 μM (Holmer y Bondgaard 2001). El mismo tejido mostró una reducción del 80% cuando la concentración de sulfuro se presentó en un intervalo de 100 a 1000 μM en condiciones de hipoxia.

The results of this study show for the first time that the photosynthetic capacity of *Z. marina* does not revert back to the initial values of F_v/F_m once sulfide-free conditions have been re-established. Ninety minutes of exposure to a sulfide concentration of 250 μM reduced by 32% the photosynthetic capacity of eelgrass at pH8, when H_2S is about 10% of the sulfide concentration. Concentrations of up to 325 μM have been measured in eelgrass meristematic tissue (Pedersen *et al.* 2004). This finding highlights the potential long-term effects of sulfide intrusion events on *Z. marina*, events during which, by different combinations of stressors, hydrogen sulfide reaches the photosynthetic tissue and can cause permanent damage to the plant photosynthetic performance. Low levels of photosynthesis could reduce the oxidation capacity of the plant, making it prone to new sulfide intrusion events. This hypothesis is in agreement with observations that suggest that sulfide plays a role in die-off events of *T. testudinum* (Borum *et al.* 2005, Koch *et al.* 2007).

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author was supported by an Erasmus Mundus scholarship.

REFERENCES

- Aguirre-Muñoz A, Buddemeir R, Camacho-Ibar VF, Carriquiry JD, Ibarra Obando SE, Massey B, Smith S, Wulff F. 2001. Sustainability of coastal resource use in San Quintín, Mexico. *Amibio* 30: 142–149.
- Allam AI, Hollis JP. 1972. Sulfide inhibition of oxidases in rice roots. *Phytopathology* 62: 634–639.
- Almgren T, Hagström I. 1974. The oxidation rate of sulphide in sea water. *Water Res.* 8: 395–400.
- Álvarez-Borrego S, Ballesteros-Grijalva G, Chee-Barragán A. 1975. Estudio de algunas variables fisicoquímicas superficiales en Bahía San Quintín, en verano, otoño e invierno. *Cienc. Mar.* 2: 1–9.
- Bagarinao T. 1992. Sulfide as an environmental factor and toxicant: Tolerance and adaptation in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 24: 21–62.
- Borum J, Pedersen O, Greve TM, Frankovich TA, Zieman JC, Fourqurean JW, Madden CJ. 2005. The potential role of plant oxygen and sulphide dynamics in die-off events of the tropical seagrass, *Thalassia testudinum*. *J. Ecol.* 93:148–158.
- Cabello-Pasini A, Lara-Turrent C, Zimmerman RC. 2002. Effect of storms on photosynthesis, carbohydrate content and survival of eelgrass populations in a coastal lagoon and the adjacent open ocean. *Aquat. Bot.* 74: 149–164.
- Cabello-Pasini A, Muñoz-Salazar R, Ward DH. 2003. Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Aquat. Bot.* 76: 31–47.
- Calleja ML, Marbá N, Duarte CM. 2007. The relationship between seagrass (*Posidonia oceanica*) decline and sulfide porewater concentration in carbonate sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 73: 583–588.
- Canfield DE, Thamdrup B, Hansen JW. 1993. The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: Iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57: 3867–3883.

La vida media de la reacción espontánea entre el sulfuro y el oxígeno es del orden de 1 h (Almgren y Hagström 1974). Así, aunque el tejido se enjuagó varias veces después de la incubación en sulfuro, la mayor captación de oxígeno observado en el experimento a pH 8 podría estar relacionada con los procesos de oxidación de sulfuro que tienen lugar dentro de las hojas. A pH 6, el consumo de oxígeno se redujo en todos los tratamientos, incluyendo el control, lo que indica un factor distinto al sulfuro que afectó las tasas de consumo de oxígeno. La razón por la cual el incremento en el consumo de oxígeno que se presentó en el tratamiento a pH 8 no se observó en el de pH 6 podría ser la tasa inicial específica de la oxidación de los sulfuros, la cual es dependiente del pH. En soluciones ácidas (pH < 6) la tasa es muy lenta, lo que aumenta a un máximo en torno a un pH 8 (Chen y Morris 1972).

Nuestros experimentos muestran un efecto perjudicial del sulfuro en la capacidad fotosintética de las hojas de *Z. marina*. Noventa minutos de exposición a concentraciones de sulfuro de 250 y 1000 μM (a pH 8) redujo la razón F_v/F_m en un 32% y 35%, respectivamente. Cuando las incubaciones a las mismas concentraciones de sulfuro se ensayaron a un pH 6, la reducción de F_v/F_m fue mayor y más rápida, ya que la proporción de sulfuro como H_2S total es nueve veces mayor. La reducción en los valores de P_{max} como resultado de altos niveles de sulfuro, finalmente se refleja en una reducción de las tasas de crecimiento de los haces.

Zostera marina es el autótrofo más importante en la bahía de San Quintín, donde cubre aproximadamente el 40% de la superficie de la bahía (Ward *et al.* 2004). Por otro lado, el cultivo de moluscos es una de las actividades más importantes en la bahía de San Quintín, donde se cultivan los ostiones con los sistemas de bastidores (Aguirre-Muñoz *et al.* 2001). Praderas de pastos marinos por debajo de estos bastidores se han reducido significativamente (obs. pers.) y se ha atribuido a una disminución de la luz debido a la sombra de los bastidores o un aumento de materia orgánica producida por las heces de ostras. Por otro lado, el aumento de materia orgánica directamente debajo de bastidores de ostras es responsable del aumento en la concentración de sulfuro debido a la reducción de la materia orgánica (Ito e Imai 1955). Así, es posible que la disminución de *Z. marina* bajo los bastidores podría ser el resultado de niveles crecientes de sulfuro que a su vez disminuyen la fotosíntesis de los pastos marinos, y esto eventualmente resulta en su descenso.

Los resultados de este estudio muestran por primera vez cómo la capacidad fotosintética no se recupera a los valores iniciales de F_v/F_m una vez que las condiciones libres de sulfuro han sido restablecidas. Noventa minutos de exposición a una concentración de sulfuro de 250 μM redujo en un 32% la capacidad fotosintética de pastos marinos a un pH 8, cuando el H_2S es un 10% de la concentración del sulfuro. Concentraciones de hasta 325 μM se han medido en el interior del tejido meristemático de pastos marinos (Pedersen *et al.*

- Carlson PR, Yarbro L, Barber T. 1994. Relationship of sediment sulfide to mortality of *Thalassia testudinum* in Florida Bay. *Bull. Mar. Sci.* 54: 733–746.
- Chen KY, Morris J. 1972. Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environ. Sci. Technol.* 6: 529–537.
- Durako M, Kunzelman J. 2002. Photosynthetic characteristics of *Thalassia testudinum* measured *in situ* by pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry: Methodological and scale-based considerations. *Aquat. Bot.* 73: 173–185.
- Erskine JM, Koch M. 2000. Sulfide effects on *Thalassia testudinum* carbon balance and adenylate energy charge. *Aquat. Bot.* 67: 275–285.
- Fenchel T, Finlay B. 1995. *Ecology and Evolution in Anoxic Worlds*. Oxford University Press, Oxford, UK, 288pp.
- Goodman JL, Moore K, Dennison W. 1995. Photosynthetic responses of eelgrass (*Zostera marina* L.) to light and sediment sulphide in a shallow barrier island lagoon. *Aquat. Bot.* 50: 37–47.
- Holmer M, Bondgaard E. 2001. Photosynthetic and growth response of eelgrass to low oxygen and high sulfide concentrations during hypoxic events. *Aquat. Bot.* 70: 29–38.
- Ito S, Imai T. 1955. Ecology of oyster bed. I. On the decline of productivity due to repeated culture. *Tohoku J. Agric. Res.* 5: 251–268.
- Jorgensen BB, Revsbech NP. 1983. Colorless sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp. and *Thiovulum* spp., in O₂ and H₂S microgradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1261–1270.
- Koch MS, Mendelssohn IA. 1989. Sulfide as a soil phytotoxin: Differential responses in two marsh species. *J. Ecol.* 77: 565–578.
- Koch MS, Mendelssohn I, McKee K. 1990. Mechanism for the hydrogen sulfide-induced growth limitation in wetland macrophytes. *Limnol. Oceanogr.* 35: 399–408.
- Koch MS, Schopmeyer SA, Kyhn-Hansen C, Madden CJ. 2007. Synergistic effects of high temperature and sulfide on tropical seagrass. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341: 91–101.
- 2004). Este hallazgo pone de relieve los posibles efectos a largo plazo de eventos de intrusión de sulfuro en *Z. marina*, eventos en que, por diferentes combinaciones de factores de estrés, el sulfuro de hidrógeno llega al tejido fotosintético y puede causar daño permanente a la actividad fotosintética de la planta. Los bajos niveles de fotosíntesis podrían reducir la capacidad de oxidación de la planta, por lo que es propensa a nuevos eventos de intrusión de sulfuro. Esta hipótesis está de acuerdo con las observaciones que sugieren que el sulfuro juega un papel en los eventos de mortandad de *T. testudinum* (Borum *et al.* 2005, Koch *et al.* 2007).

AGRADECIMIENTOS

La primera autora fue apoyada en México por una beca Erasmus Mundus.

-
- Miller SR, Bebout BM. 2004. Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 736–744.
- Pedersen O, Binzer T, Borum J. 2004. Sulphide intrusion in eelgrass (*Zostera marina* L.). *Plant Cell Environ.* 27: 595–602.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E, Caldwell M (eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, pp. 49–70.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry*. WH Freeman, New York, 887 pp.
- Ward DH, Tibbitts T, Morton A, Carrera-González E, Kempka R. 2004. Use of airborne remote sensing techniques to assess seagrass distribution in San Quintín Bay, Baja California, Mexico. *Cienc. Mar.* 30: 47–60.

*Received July 2011,
received in revised form July 2012,
accepted August 2012.*