

## Benthic nitrogen fixation in *Zostera marina* meadows in an upwelling-influenced coastal lagoon

### Fijación bentónica de nitrógeno en praderas de *Zostera marina* de una laguna costera influenciada por surgencias

Julieta Hernández-López<sup>1</sup>, Víctor F Camacho-Ibar<sup>1\*</sup>, Alfonso Macías-Tapia<sup>1</sup>, Karen J McGlathery<sup>2</sup>, Luis W Daesslé<sup>1</sup>, Jose M Sandoval-Gil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Ensenada-Tijuana, no. 3917, Fraccionamiento Playitas, Ensenada, CP 22860, Baja California, México.

<sup>2</sup> Department of Environmental Sciences, University of Virginia, McCormick Road, PO Box 400123, Charlottesville, Virginia 22903, USA.

\* Corresponding author: vcamacho@uabc.edu.mx

**ABSTRACT.** Dinitrogen (N<sub>2</sub>) fixation rates were determined in the phyllosphere and in sediments with and without the presence of eelgrass (*Zostera marina*) in San Quintín Bay, an upwelling-influenced coastal lagoon in the NE Pacific. Samples were collected during winter 2015 at 4 sites with a gradient of oceanic influence and contrasting impact from oyster aquaculture. N<sub>2</sub> fixation rates were determined with the acetylene reduction assay. Treatments under light and in the dark, and with and without sodium molybdate resulted in similar fixation rates, suggesting that heterotrophic nonsulfate-reducing bacteria made the largest contribution to N<sub>2</sub> fixation, while sulfate-reducing bacteria had low fixation activity at most stations. N<sub>2</sub>-fixation rates in sediments ranged from 7 to 12 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> and were similar to those in other temperate seagrass-dominated estuaries. Winter conditions were likely responsible for small spatial differences in N<sub>2</sub> fixation rates throughout the lagoon, even between vegetated and unvegetated sites and among depth sections of sediment cores. During winter, *Z. marina* growth rates and biomass are low, resulting in low and less variable release of labile organic carbon, which acts as substrate for diazotrophs. The lowest N<sub>2</sub> fixation rates were measured at a site where high denitrification rates have been observed, probably reflecting a competition between diazotrophs and denitrifiers. The highest fixation rates were measured at the innermost station where oceanic nitrate is scarce. Epiphytic bacteria contributed ~7% of the total N<sub>2</sub> fixation, with rates of <0.5 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. N<sub>2</sub> fixation potentially supplied 5–10% of *Z. marina* N requirements and could supply ~30% of the N loss via denitrification in winter.

**Key words:** N<sub>2</sub> fixation, *Zostera marina*, sediments, phyllosphere, diazotrophs.

**RESUMEN.** Se determinaron las tasas de fijación de nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) en la filosfera y en sedimentos con y sin presencia de pasto marino (*Zostera marina*) en bahía San Quintín, una laguna costera del Pacífico nororiental influenciada por surgencias. Se recolectaron muestras durante el invierno de 2015 en 4 sitios a lo largo de un gradiente de influencia oceánica y con diferente grado de impacto por la ostricultura. Las tasas de fijación de N<sub>2</sub> se determinaron con el método de reducción de acetileno. Las tasas de fijación en los tratamientos con luz y en oscuridad, y en los tratamientos con y sin molibdato de sodio fueron similares, lo que sugiere que las bacterias heterótrofas no sulfatoreductoras fueron las principales contribuyentes a la fijación de N<sub>2</sub>, mientras que las sulfatoreductoras presentaron baja actividad de fijación en la mayoría de los sitios. Las tasas de fijación de N<sub>2</sub> presentaron un intervalo de 7 a 12 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> y fueron similares a las reportadas para otros estuarios dominados por praderas de pastos marinos en zonas templadas. Las condiciones ambientales de invierno probablemente determinaron las pequeñas diferencias en las tasas de fijación de N<sub>2</sub> a lo largo de la laguna, incluso entre sitios con y sin vegetación o entre las diferentes secciones de los núcleos de sedimento. Durante el invierno, las tasas de crecimiento y las biomásas de *Z. marina* son bajas, lo que resulta en una liberación baja y poco variable de carbono orgánico lábil, sustrato importante para los diazótrofos. Las tasas de fijación de N<sub>2</sub> más bajas se midieron en el sitio donde aparentemente se presentan altas tasas de desnitrificación, lo que probablemente refleja una competencia entre diazótrofos y desnitrificadores. Las tasas de fijación más altas se midieron en la estación más interna, donde es escaso el aporte de nitrato oceánico. Las bacterias epifitas contribuyeron alrededor del 7% de la fijación total de N<sub>2</sub>, con tasas <0.5 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. La fijación de N<sub>2</sub> potencialmente abasteció entre el 5% y 10% del N requerido por *Z. marina* y podría abastecer ~30% del N que se pierde vía la desnitrificación en invierno.

**Palabras clave:** fijación de N<sub>2</sub>, *Zostera marina*, sedimentos, filosfera, diazótrofos.

## INTRODUCTION

Seagrass meadows play an important ecological role because they serve as refuge, breeding, and feeding areas for numerous organisms, they are highly productive systems that act as carbon sinks, and they give sediments stability (Fourqurean et al. 2012, Mazarrasa et al. 2015). Together with light and temperature, nitrogen (N) availability is one of the main factors limiting the growth of these phanerogams (Udy et al. 1999).  $N_2$  fixation (the process by which  $N_2$  is converted into reactive N) can contribute more than 50% of the N required for seagrass growth in tropical zones (Capone 1988, O'Donohue et al. 1991), and in some temperate areas it has been found to contribute between 5% and 30% (McGlathery et al. 1998; Welsh et al. 1996a, 1996b; Cole and McGlathery 2012).

In marine habitats,  $N_2$  fixation is a process carried out exclusively by a group of specialized prokaryotes and archaea called diazotrophs, such as some photoautotrophic cyanobacteria (Severin and Stal 2010) and heterotrophic bacteria including sulfate-reducing bacteria (Fulweiler et al. 2013). Heterotrophs are the dominant functional group of  $N_2$  fixation in sediments and the phyllosphere of some temperate seagrass meadows (McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012). Fixation rates tend to be coupled to the photosynthetic activity of plants (Capone and Taylor 1977, O'Donohue et al. 1991, McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012), since the exudation of labile organic carbon through the leaves, roots, and rhizomes increases at higher photosynthetic rates and serves as substrate for heterotrophic bacteria (McRoy et al. 1973, Moriarty et al. 1986). The presence of seagrasses also benefits the growth of heterotrophic diazotrophs because the canopy acts as a trap of particulate organic matter that then settles on the meadow sediments (Kennedy et al. 2010).

The bioavailable N in aquatic systems proceeds from the internal regeneration of pre-existing N, from the biological fixation of  $N_2$ , and from external inputs, and it is removed primarily by denitrification (Sarmiento and Gruber 2006). Despite the large number of studies that have reported high  $N_2$  fixation rates, in benthic systems denitrification tends to be more intense than fixation; however, in a recent study that simultaneously measured denitrification and N fixation rates in *Zostera muelleri* beds and adjacent sediments, fixation was the dominant process (Russell et al. 2016). Moreover, in Narragansett Bay (USA), the predominant process switched from denitrification to fixation (Fulweiler et al. 2007). Fulweiler et al. (2013) suggested that the quality and quantity of organic matter can affect the co-occurrence of these two processes and even temporarily uncouple them. In areas where oyster farming occurs the particulate organic matter inputs to sediment tend to increase and denitrification intensifies (Kellogg et al. 2014, Humphries et al. 2016), though  $N_2$  fixation may also be stimulated (Newell et al. 2002).

## INTRODUCCIÓN

Las praderas de pastos marinos tienen funciones ecológicas importantes porque sirven como zonas de refugio, reproducción y alimentación para múltiples organismos, son sistemas altamente productivos que actúan como sumideros de carbono y dan estabilidad a los sedimentos (Fourqurean et al. 2012, Mazarrasa et al. 2015). Así como la luz y la temperatura, la disponibilidad de nitrógeno (N) es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de estas fanerógamas (Udy et al. 1999). La fijación de  $N_2$ , proceso mediante el cual el  $N_2$  es transformado a N reactivo, puede aportar más del 50% del N requerido para el crecimiento de los pastos marinos en zonas tropicales (Capone 1988, O'Donohue et al. 1991), y en algunos sitios de zonas templadas se ha reportado que aporta entre el 5% y el 30% de dicho requerimiento (McGlathery et al. 1998; Welsh et al. 1996a, 1996b; Cole y McGlathery 2012).

La reacción de fijación de  $N_2$  en ambientes marinos es realizada únicamente por un grupo de procariontes y arqueas especializados denominados diazotrofos. Entre los diazotrofos se encuentran algunas cianobacterias fotoautótrofas (Severin y Stal 2010) y algunas bacterias heterótrofas, incluidas las sulfatoreductoras (Fulweiler et al. 2013). Se ha encontrado que los heterótrofos son el grupo funcional dominante en la fijación de  $N_2$  en los sedimentos y en la filosfera en algunas praderas de pastos marinos de regiones templadas (McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012). Las tasas de fijación suelen estar acopladas a la actividad fotosintética de las plantas (Capone y Taylor 1977, O'Donohue et al. 1991, McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012), ya que la exudación de carbono orgánico lábil a través de las hojas, raíces y rizomas incrementa a mayores tasas fotosintéticas y sirve como sustrato para las bacterias heterótrofas (McRoy et al. 1973, Moriarty et al. 1986). La presencia de los pastos marinos también beneficia el crecimiento de los diazotrofos heterótrofos, ya que el dosel foliar funciona como trampa de materia orgánica particulada que permite su acumulación en los sedimentos de las praderas (Kennedy et al. 2010).

El N biodisponible en los sistemas acuáticos proviene de la regeneración interna del N preexistente, de la fijación biológica de  $N_2$  y de los aportes externos, y es removido principalmente por el proceso de desnitrificación (Sarmiento y Gruber 2006). A pesar de la gran cantidad de estudios en los que se han reportado altas tasas de fijación de  $N_2$ , existe el paradigma de que la desnitrificación suele ser más intensa que la fijación en sistemas bentónicos. Sin embargo, en un estudio reciente en el cual se midieron ambos procesos simultáneamente en praderas de *Zostera muelleri* y sedimentos adyacentes, la fijación fue el proceso dominante (Russell et al. 2016). Además, en la bahía Narragansett (EUA) se encontró que los procesos en el sistema cambiaron de la dominancia de la desnitrificación a la dominancia de la fijación (Fulweiler et al. 2007). Fulweiler et al. (2013) sugirieron que

In the case of San Quintín Bay (northwestern Mexico), Camacho-Ibar et al. (2003) suggested that reactive N losses via denitrification exceed inputs from fixation and that N<sub>2</sub> fixation may even be negligible; however, they also reported that in the innermost areas of this coastal lagoon N<sub>2</sub> fixation and denitrification were almost equal. To date, no direct measurements of these 2 processes have been made in the lagoon, but the isotopic composition reported for *Zostera marina* and *Ulva* spp. also suggests that N<sub>2</sub> fixation is more intense in the innermost parts of the system (Sandoval-Gil et al. 2015, Carriquiry et al. 2016). As the new N contributed by the adjacent ocean decreases from the mouth to the interior of the lagoon (Camacho-Ibar et al. 2003, Hernández-Ayón et al. 2004) and the continental inputs are null (Aguirre-Muñoz et al. 2001), the macrophytes growing in the innermost areas are likely more dependent on N provided by internal processes such as ammonification and fixation.

In this study we measured N<sub>2</sub> fixation rates in the phyllosphere and in sediments collected from within and outside *Z. marina* meadows in San Quintín Bay, at sites with different oceanic influence and oyster culture activity. We also estimated the possible contribution of fixation to the N demand of *Z. marina* and the contribution of this process to N balance in the system.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

San Quintín Bay (Fig. 1), a hypersaline coastal lagoon on the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico (30°27'N, 116°00'W), has an average depth of ~2 m. Fresh-water inflow is practically null as it is restricted to the San Simón stream that only delivers water during winters with higher than average rainfall (150 mm, Aguirre-Muñoz et al. 2001). The dynamics and distribution of the water properties (salinity, temperature, dissolved nutrients, etc.) are controlled by semidiurnal tides (maximum amplitude of ~2.5 m and minimum of ~1 m). The lagoon has 2 arms, the east arm known as Bahía San Quintín and the west arm known as Bahía Falsa, which have a water residence time of 15 and 5 d, respectively (Camacho-Ibar et al. 2003, Melaku Canu et al. 2016). Coastal upwelling intensifies in spring and summer, and nutrient input to the lagoon increases at this time. The concentration of ocean-derived nitrate, which exceeds 10 µM during upwelling events, decreases from the mouth to the innermost parts of the lagoon, where concentrations tend to be <1 µM (Camacho-Ibar et al. 2003, Hernández-Ayón et al. 2004), potentially limiting the N available for uptake by submerged plants. Salinity and temperature increase from the mouth to the inner parts of the system. Salinity ranges from ~33.6 to 39 and temperature from 11 to 27 °C, though in winter the ranges are smaller, from ~33.6 to 34.1 and from 13.7 to 15.5 °C, respectively (Camacho-Ibar et al. 2003). Dense *Z. marina* meadows cover ~46% of the lagoon surface

la calidad y la cantidad de materia orgánica son factores que afectan la concurrencia de estos 2 procesos y que inclusive pueden desacoplarlos temporalmente. En los sitios cerca de ostricultivos, los aportes de materia orgánica particulada hacia los sedimentos suelen aumentar y la desnitrificación se suele intensificar (Kellogg et al. 2014, Humphries et al. 2016), aunque también la fijación de N<sub>2</sub> puede verse estimulada (Newell et al. 2002).

Camacho-Ibar et al. (2003) sugirieron que en bahía San Quintín las pérdidas de N reactivo por desnitrificación son mayores que las entradas por fijación, e incluso que la fijación de N<sub>2</sub> podría ser despreciable; sin embargo, también reportaron que en las zonas más internas de la laguna, la desnitrificación y la fijación de N<sub>2</sub> estuvieron casi en balance. Hasta la fecha, no se han realizado mediciones directas de ninguno de los 2 procesos en esta laguna costera, pero la composición isotópica de *Zostera marina* y de *Ulva* spp. en la laguna también sugiere que la fijación de N<sub>2</sub> es más intensa en los extremos internos del sistema (Sandoval-Gil et al. 2015, Carriquiry et al. 2016). Por otra parte, en bahía San Quintín, el N nuevo proveniente del océano adyacente disminuye desde la boca hacia el interior de la laguna (Camacho-Ibar et al. 2003, Hernández-Ayón et al. 2004) y los aportes continentales son considerados nulos (Aguirre-Muñoz et al. 2001), por lo que las macrófitas de las zonas más internas probablemente presentan una mayor dependencia al N proveniente de los procesos internos como la amonificación y la fijación.

En este trabajo se midieron las tasas de fijación de N<sub>2</sub> en la filosfera y en sedimentos dentro y fuera de las praderas de *Z. marina* en bahía San Quintín, en sitios con diferente influencia oceánica y actividad ostrícola. También se estimó la posible contribución de la fijación a la demanda de N de *Z. marina*, así como la contribución de este proceso al balance de N en el sistema.

## MATERIALES Y MÉTODOS

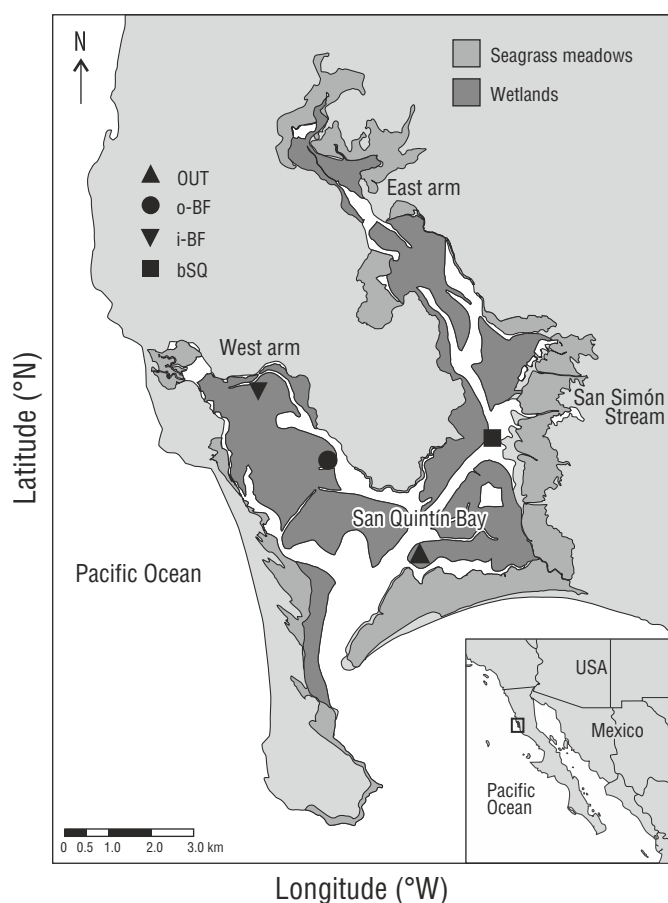
### Área de estudio

Bahía San Quintín (Fig. 1) es una laguna costera hypersalina de ~2 m de profundidad promedio localizada en la península de Baja California, México (30°27'N, 116°00'W). Los aportes de agua terrestre son considerados nulos y se restringen al arroyo San Simón, que únicamente aporta agua durante inviernos con precipitación por arriba del promedio (150 mm, Aguirre-Muñoz et al. 2001). La dinámica del sistema y la distribución de las propiedades del agua (salinidad, temperatura, nutrientes disueltos, etc.) están controladas por las mareas semidiurnas (amplitud máxima de ~2.5 m y mínima de ~1 m). La laguna tiene 2 brazos, el brazo oeste conocido como bahía Falsa y el brazo este conocido como brazo San Quintín (para evitar confusiones, a lo largo del texto nos referiremos a este último como brazo este y a la laguna en su conjunto como bahía San Quintín), los cuales

(Ward et al. 2003). Oyster aquaculture is carried out in the west arm, where concessions cover approximately 30% of the area (Aguirre-Muñoz et al. 2001).

### Measurement of $N_2$ fixation rates

In December 2015 sediment cores were collected from areas covered and not covered by *Z. marina* to measure  $N_2$  fixation rates in vegetated and bare sediments. Shoots of the seagrass *Z. marina* were also collected to measure  $N_2$  fixation in the phyllosphere by epiphytic bacteria.  $N_2$  fixation rates were measured using the acetylene reduction assay (developed by Hardy et al. 1968 and adapted for the phyllosphere by Capone and Taylor 1977), which measures nitrogenase enzyme activity. This method is based on the low specificity of this enzyme for its natural substrate ( $N_2$ ) and its ability to reduce other molecules of low molecular weight that have triple bonds, such as acetylene (Capone 1988).



**Figure 1.** Map of San Quintín Bay showing the east arm and the west arm, and the 4 sampling stations: OUT, o-BF, i-BF, and bSQ.  
**Figura 1.** Mapa de bahía San Quintín que muestra el brazo este y el brazo oeste, y las 4 estaciones de muestreo: OUT, o-BF, i-BF y bSQ.

tienen un tiempo de residencia del agua de aproximadamente 5 y 15 d, respectivamente (Camacho-Ibar et al. 2003, Melaku Canu et al. 2016). Las surgencias costeras se intensifican en primavera y verano, y aportan una mayor cantidad de nutrientes desde el océano durante estas temporadas. La concentración de nitrato proveniente del océano, que supera los  $10 \mu\text{M}$  durante eventos de surgencias, disminuye de la boca hacia las regiones más internas de la laguna, donde las concentraciones suelen ser menores que  $1 \mu\text{M}$  (Camacho-Ibar et al. 2003, Hernández-Ayón et al. 2004), lo cual potencialmente limita el N disponible en la columna de agua para la vegetación sumergida. La salinidad y la temperatura incrementan desde la boca hacia el interior de la bahía; la salinidad varía de  $\sim 33.6$  a  $39.0$  y la temperatura de  $11$  a  $27^\circ\text{C}$ , aunque en invierno los intervalos son menores, de  $\sim 33.6$  a  $34.1$  y de  $13.7$  a  $15.5^\circ\text{C}$ , respectivamente (Camacho-Ibar et al. 2003). Aproximadamente el 46% de la superficie de la laguna está cubierta por praderas densas de *Z. marina* (Ward et al. 2003). La actividad ostrícola se concentra en el brazo oeste, donde aproximadamente el 30% del área superficial está concesionada para esta actividad (Aguirre-Muñoz et al. 2001).

### Medición de tasas de fijación de $N_2$

En diciembre de 2015 se recolectaron núcleos de sedimento en presencia y en ausencia de praderas de *Z. marina* para medir las tasas de fijación de  $N_2$  en sedimentos con vegetación y en sedimentos sin vegetación. También se recolectaron haces de *Z. marina* para medir las tasas de fijación de  $N_2$  en la filósfera por bacterias epífitas. Para la medición de las tasas de fijación de  $N_2$ , se utilizó el método de reducción de acetileno (desarrollado por Hardy et al. 1968 e implementado para la filósfera por Capone y Taylor 1977), el cual mide la actividad de la enzima nitrogenasa. Este método se basa en la baja especificidad de esta enzima por su sustrato natural ( $N_2$ ) y su capacidad de reducir otras moléculas de bajo peso molecular y con triple enlace como el acetileno (Capone 1988).

Se seleccionaron las praderas de *Z. marina* a lo largo de un gradiente de influencia oceánica, algunas en zonas donde hay ostricultivos y otras donde no los hay (Fig. 1). La estación con mayor influencia oceánica, OUT, fue la más cercana a la boca de la laguna ( $\sim 4$  km), donde no hay actividad ostrícola. Dos estaciones, o-BF e i-BF, se ubicaron en el brazo oeste, ambas en zonas de ostricultivo pero o-BF recibe mayor influencia oceánica que i-BF. La cuarta estación, bSQ, se ubicó en el brazo este a una distancia de la boca similar a la de la estación o-BF, pero en una zona sin ostricultivos.

En cada estación se recolectaron 3 núcleos de sedimento dentro de la pradera (denominados núcleos con vegetación, en adelante núcleos CV) y 3 núcleos de sedimento en la zona sin vegetación adyacente a la pradera (núcleos SV). Los núcleos fueron transportados dentro de hieleras al laboratorio y se dejaron reposar por  $\sim 12$  h. Luego, se obtuvo un subnúcleo utilizando una jeringa de  $10$  mL, del cual se

*Zostera marina* meadows, some at oyster farming sites and some not, were chosen along a gradient of oceanic influence (Fig. 1). At the sampling station named OUT, located closest to the lagoon mouth (~4 km) where the oceanic influence is strongest, oyster aquaculture is not carried out. Oyster aquaculture is carried out at the two stations in the west arm, o-BF and i-BF, but the oceanic influence is stronger at the former than at the latter. The fourth station, bSQ, in the east arm, is located at a similar distance from the mouth as station o-BF, but is not affected by oyster farming activities.

At each station, 3 sediment cores were collected from within the seagrass meadow (i.e., vegetated sediments; henceforth referred to as CV cores) and 3 sediment cores were collected in the vegetation-free area adjacent to the meadow (i.e., bare sediments; henceforth referred to as SV cores). The cores were transported to the laboratory in ice chests and were left to rest for ~12 h. A subcore was taken with a 10-mL syringe and 1-cm sections were obtained from the top 5 cm. Each section was halved and sodium molybdate was added to one of the parts to inhibit the activity of sulfate-reducing bacteria and be able to determine the  $N_2$  fixation rate by this group of bacteria. The fixation rates obtained from the analysis of the samples without sodium molybdate were considered total fixation rates. Even though sulfate-reducing bacteria are heterotrophs, throughout the text heterotrophic bacteria will refer to nonsulfate-reducing bacteria. The incubations were carried out in 40-mL glass vials. Sediment was added to these vials and they were closed with a septum cap. After purging with argon, 10 mL of acetylene was injected into the vials to initiate incubation, which was carried out at constant temperature in the dark. Sediments from the first centimeter were also exposed to light. The same procedure was followed but the incubation was performed under an irradiance of  $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , the maximum irradiance at the site in winter (Sandoval-Gil et al. 2015). The incubation was ended by transferring the gas to Vacutainer vials previously purged with argon. Two blanks were prepared for each core following the same procedure but without adding sediment; acetylene was not added to one of them and sodium molybdate was not added to either, and the incubations were carried out in the dark.

*Zostera marina* shoots for the analysis of  $N_2$  fixation in the phyllosphere were collected manually and kept in ice chests with water from the site until processing approximately 6 h after collection. For the incubation, 6 shoots were selected from each site; 3 were used for the treatments carried out under light conditions and 3 for the treatments carried out in darkness. From each shoot we retrieved the first 15 cm (from the apex to the meristem) of leaves 2 and 4. Each leaf was placed in a 140-mL borosilicate flask and 90 mL of water from the collection site was added to the flask. To initiate incubation, 10 mL of acetylene-saturated water was added and the flask was immediately sealed with a septum and aluminium cap. The flasks were shaken for

obtuvieron secciones de 1 cm de los primeros 5 cm. Cada sección se partió a la mitad y a una de las partes se le adicionó molibdato de sodio para inhibir la actividad de las bacterias sulfatoreductoras y, así, poder determinar las tasas de fijación de  $N_2$  por este grupo de bacterias. Las tasas de fijación obtenidas a partir del análisis de las muestras sin molibdato de sodio fueron consideradas como tasas de fijación total. Si bien las bacterias sulfatoreductoras son heterótrofas, a lo largo del texto nos referimos como bacterias heterótrofas a todas aquellas que no son sulfatoreductoras. Las incubaciones fueron realizadas en viales de vidrio de 40 mL. Se añadió el sedimento a los viales y éstos fueron cerrados con tapas con septum. Los viales fueron purgados con argón y, posteriormente, se les inyectaron 10 mL de acetileno para iniciar la incubación, la cual se realizó en oscuridad y a temperatura constante. También se realizaron incubaciones con luz de los sedimentos del primer centímetro, para los cuales se siguió el mismo procedimiento pero la incubación se realizó con una irradiancia de  $350 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , correspondiente a la máxima irradiancia del sitio en invierno (Sandoval-Gil et al. 2015). La incubación se terminó al transferir el gas a viales Vacutainer previamente purgados con argón. Para cada núcleo, se realizaron 2 blancos siguiendo el mismo procedimiento, pero sin adición de sedimento y uno de éstos sin adición de acetileno; a ninguno se les adicionó molibdato de sodio y las incubaciones se realizaron en oscuridad.

Los haces de *Z. marina* utilizados para la determinación de fijación de  $N_2$  en la filósfera se recolectaron manualmente y se mantuvieron en hieleras con agua del sitio hasta su tratamiento, aproximadamente 6 h después de la recolecta. Para las incubaciones, se seleccionaron 6 haces de cada sitio; 3 fueron utilizados para los tratamientos con luz y 3 para los tratamientos en oscuridad. Se obtuvieron los primeros 15 cm (del ápice hacia el meristemo) de las hojas 2 y 4 de cada haz. Cada hoja fue colocada en un frasco de borosilicato de 140 mL y se adicionaron 90 mL de agua filtrada del sitio de recolección. Para iniciar la incubación, se adicionaron 10 mL de agua saturada con acetileno e inmediatamente se selló el frasco con un septum y un sello de aluminio. Los frascos se agitaron por 30 s y se mantuvieron por 5 h a temperatura constante. Las incubaciones con luz se hicieron con una irradiancia de  $\sim 350 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para finalizar la incubación, los frascos se sumergieron en hielo y se mantuvieron así, por no más de 24 h, hasta su posterior análisis en el cromatógrafo.

Para las mediciones de la concentración de etileno, se utilizó un cromatógrafo de gases SRI-8610C equipado con un inyector en columna seguido de una trampa para la concentración del etileno empacada con gel de sílice, una columna empacada Porapak N y un detector de ionización de flama. Las tasas de reducción de acetileno fueron convertidas a tasas de fijación de  $N_2$  utilizando la razón 3:1 (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000).

30 s and kept for 5 h at constant temperature. An irradiance of  $\sim 350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  was used for the incubations. To end the incubation the flasks were submerged in ice and kept there, for not more than 24 h, until the chromatographic analysis.

Ethylene concentration was measured using a SRI 8610C gas chromatograph equipped with an on-column injector followed by an ethylene trap packed with silica gel, a chromatographic column packed with Porapak N, and a flame ionization detector. Acetylene reduction rates were converted to  $\text{N}_2$  fixation rates using the 3:1 ratio (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000).

### Ancillary measurements

Samples were taken from the first 5 cm of the sediment cores to analyze organic carbon ( $\text{C}_{\text{org}}$ ) content, total N, chlorophyll *a*, and grain size. A LECO CHNS-932 elemental analyzer was used to determine  $\text{C}_{\text{org}}$  and N. Grain size was determined using a Horiba LA-910 particle size analyzer. Chlorophyll *a* concentrations were determined by extraction with 100% acetone over 24 h in darkness (Edmunds et al. 2004). At the end of the extraction, 10 mL of distilled water was added and the aliquots were analyzed using a Varian Cary 50 UV-Vis spectrophotometer. Readings were taken at 664 and 750 nm before and after acidification ( $0.08 \pm 0.01 \text{ mL}$  of  $0.01 \text{ N HCl}$ ) to correct for phaeophytin (Lorenzen 1967). To determine the N isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ), 3 *Z. marina* leaves from each sampling site were analyzed at the University of California, Davis, Stable Isotope Facility, CA. The isotope ratio was calculated with the equation  $\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = ((R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1) \times 10^3$ , where  $R_{\text{sample}}$  and  $R_{\text{standard}}$  are the ratio of the heavy to light isotope ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) of the sample and standard, respectively.

### Data analysis

$\text{N}_2$  fixation rates in sediments are expressed in micromoles per square meter per hour ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ). Student's *t*-tests were used to identify differences in  $\text{N}_2$  fixation rates in sediments between the treatments under light and dark conditions and between the SV and CV cores. To determine differences between sampling stations, one-way ANOVA was carried out, followed by a Tukey *a posteriori* test since the data complied with the assumptions of normality and homoscedasticity. For the  $\text{N}_2$  fixation rates in the phyllosphere, Student's *t*-tests were performed to identify differences between leaves 2 and 4 and between the treatments under light and dark conditions. As the data for  $\text{N}_2$  fixation in the phyllosphere, grain size,  $\text{C}_{\text{org}}$ , N, chlorophyll *a* concentration, and  $\delta^{15}\text{N}$  did not comply with the assumptions of normality and homoscedasticity, the Kruskal–Wallis test was used to determine differences between sampling stations. The results were considered significant when  $P < 0.05$ . All statistical analyses were carried out using STATISTICA 8.0.

### Variables accesorias del sedimento

De los núcleos de sedimento, también se obtuvieron muestras de los primeros 5 cm para el análisis del contenido de carbono orgánico ( $\text{C}_{\text{org}}$ ) y N total, de la clorofila *a* y del tamaño de grano. La determinación de  $\text{C}_{\text{org}}$  y N se realizó con un analizador elemental LECO CHNS-932. Para el tamaño de grano, se utilizó un analizador laser de partículas Horiba LA-910. Para la determinación de clorofila *a*, se realizó una extracción en oscuridad durante 24 h con acetona al 100% (Edmunds et al. 2004). Al finalizar la extracción, se adicionaron 10 mL de agua destilada y las alícuotas fueron analizadas con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis. Las lecturas se realizaron a 664 y 750 nm antes y después de la acidificación ( $0.08 \pm 0.01 \text{ mL}$  de  $\text{HCl}$   $0.01 \text{ N}$ ) para la corrección por feofitina (Lorenzen 1967). Para determinar la composición isotópica de N ( $\delta^{15}\text{N}$ ), se analizaron 3 hojas de *Z. marina* de cada estación en el Stable Isotope Facility de la Universidad de California en Davis, CA. La razón isotópica se calculó con la ecuación  $\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = ((R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1) \times 10^3$ , donde  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{estándar}}$  son la razón entre el isótopo pesado y el ligero ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) de la muestra y del estándar, respectivamente.

### Análisis de datos

Las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  en sedimentos se expresaron en micromoles por metro cuadrado por hora ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ). Se realizaron pruebas *t* de Student para identificar las diferencias de las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  en sedimentos entre los tratamientos con luz y en oscuridad y entre los núcleos SV y CV. Para determinar las diferencias entre estaciones de muestreo, se utilizó un análisis de varianza de una vía y una prueba *a posteriori* de Tukey, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homoscedasticidad. Para los datos de tasas de fijación de  $\text{N}_2$  en la filosfera, se utilizaron pruebas *t* de Student para identificar diferencias entre las hojas 2 y 4, y entre los tratamientos con luz y en oscuridad. Los datos de las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  en la filosfera, el tamaño de grano,  $\text{C}_{\text{org}}$ , N, la concentración de clorofila *a* y los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no cumplieron con los supuestos de normalidad y de homoscedasticidad, por lo que se utilizó el estadístico no paramétrico de Kruskal–Wallis para determinar diferencias entre estaciones de muestreo. Los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 8.0.

## RESULTADOS

### Tasas de fijación de $\text{N}_2$ en sedimentos

Las tasas de fijación de  $\text{N}_2$  en sedimentos superficiales, en general, fueron mayores en los tratamientos en oscuridad que en los tratamientos con luz (Fig. 2), aunque no se

## RESULTS

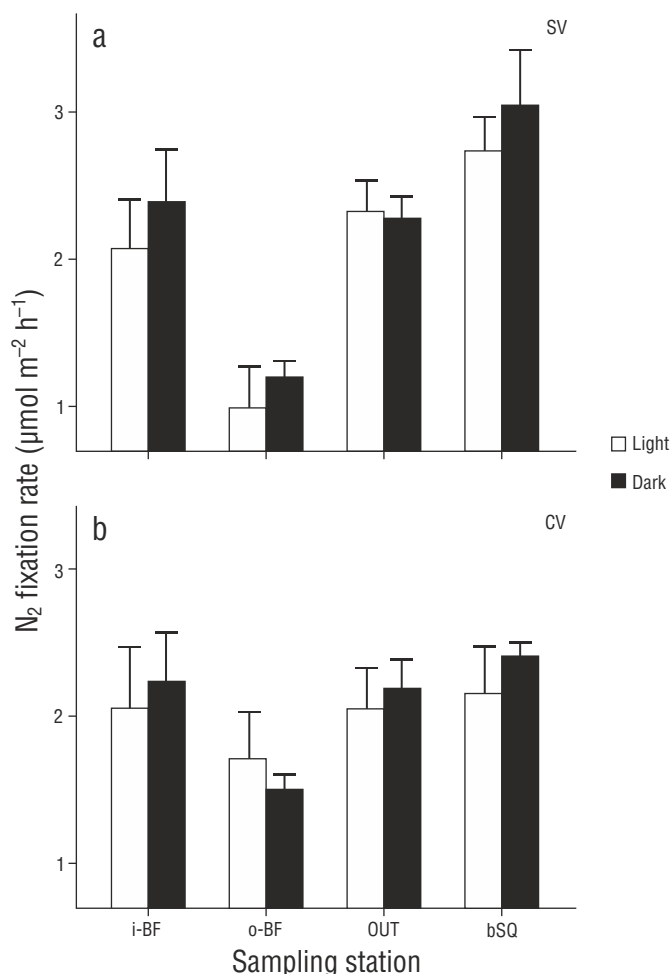
### N<sub>2</sub> fixation rates in sediments

N<sub>2</sub> fixation rates in surface sediments were in general higher in the treatments carried out in darkness than under light conditions (Fig. 2), though there were no significant differences between treatments ( $P > 0.05$ ), except for the SV cores from station i-BF ( $P = 0.006$ ). The fixation rate profiles showed little variation with regard to depth (coefficient of variation  $< 10\%$ ) and no clear or consistent pattern. The results for the different depths were therefore integrated for the analysis and discussion, without taking into account the extreme values obtained for one CV core from i-BF. The lowest depth-integrated N<sub>2</sub> fixation rates were found at o-BF:  $7.0 \pm 0.5$  and  $8.9 \pm 3.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  for the SV and CV cores, respectively. The values for the rest of the stations ranged from 10.3 to  $12.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , but significant differences ( $P < 0.05$ ) were only observed between the o-BF and OUT SV cores (Fig. 3). At OUT and bSQ, higher fixation rates were obtained for the SV cores than for the CV cores, and at o-BF and i-BF the rates were higher for the CV cores, but the differences were not significant. N<sub>2</sub> fixation rates with and without sodium molybdate were not significantly different (Fig. 3), except at bSQ where  $\sim 40\%$  of the fixation was attributed to sulfate-reducing bacteria. The extreme N<sub>2</sub> fixation rates found for one of the i-BF CV cores (between centimeters 2 and 5) ranged from 9.6 to  $35.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ; these values were not detected in the treatment with sodium molybdate and can therefore be attributed to sulfate-reducing bacteria.

### N<sub>2</sub> fixation rates in the phyllosphere

N<sub>2</sub> fixation rates in the phyllosphere did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) between leaf 2 and leaf 4, so the rates for both leaves were considered as replicates for the subsequent analyses. At most stations (except i-BF), N<sub>2</sub> fixation rates were higher in the experiments carried out in darkness than in those carried out under light conditions (Fig. 4a), but the differences were not significant ( $P > 0.05$ ). Despite there being no significant differences among stations or between the treatments with and without irradiance ( $H_{(3,24)} = 6.46$ ,  $P = 1.00$ , and  $H_{(3,24)} = 3.07$ ,  $P = 0.385$ , respectively), the rates tended to increase at the innermost stations.

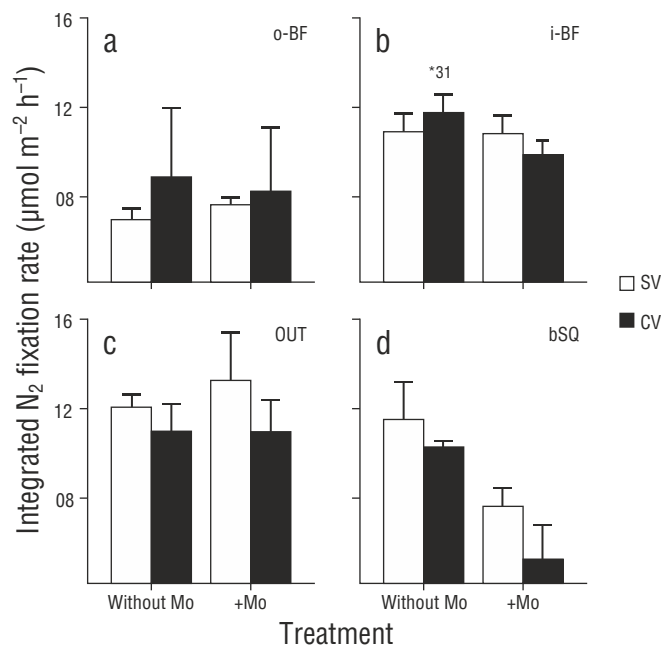
N<sub>2</sub> fixation rates in the phyllosphere were prorated by the shoot density obtained in winter 2014 (Sandoval-Gil, unpublished data). The spatial trend of the prorated data was similar to the distribution of the shoot density values (Fig. 4b), increasing from station OUT to the west arm. The values for bSQ were lower than those for OUT. The contribution of epiphytic bacteria within the *Z. marina* meadows, considering the fixation rates in both the phyllosphere and sediments, was  $\sim 7\%$  ( $0.6 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) (Fig. 5).



**Figure 2.** Spatial variation in N<sub>2</sub> fixation in (a) bare (SV) and (b) vegetated (CV) surface sediments. N<sub>2</sub> fixation rates under light and dark conditions are shown for each sampling station. Values represent the mean  $\pm 1$  standard error ( $n = 3$ ).

**Figura 2.** Variación espacial de la fijación de N<sub>2</sub> en los sedimentos superficiales (a) sin vegetación (SV) y (b) con vegetación (CV). Se muestran las tasas de fijación de N<sub>2</sub> bajo condiciones de luz y de oscuridad para cada estación de muestreo. Los valores representan el promedio  $\pm 1$  error estándar ( $n = 3$ ).

encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ), excepto para los núcleos SV de la estación i-BF ( $P = 0.006$ ). Los perfiles de las tasas de fijación de N<sub>2</sub> presentaron poca variación con respecto a la profundidad (coeficiente de variación  $< 10\%$ ), sin un patrón claro o consistente. Por tanto, se integraron los resultados de las diferentes profundidades para su análisis y discusión, sin considerar en la integración los valores extremos encontrados para un núcleo CV de i-BF. Las tasas de fijación de N<sub>2</sub> integradas más bajas se encontraron en la estación o-BF ( $7.0 \pm 0.5$  y  $8.9 \pm 3.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  para los núcleos SV y CV, respectivamente). En el resto de las estaciones, las tasas variaron entre



**Figure 3.** Spatial variation in integrated N<sub>2</sub> fixation rates in vegetated (CV) and bare (SV) sediments at the 4 sampling stations: (a) o-BF, (b) i-BF, (c) OUT, and (d) bSQ. The treatments with sodium molybdate (+Mo) and without sodium molybdate are shown. Values represent the mean of the replicates  $\pm$  1 standard error ( $n = 3$ ), except for the i-BF CV cores where  $n = 2$ . The asterisk represents the extreme value in one i-BF CV core.

**Figura 3.** Variación espacial de las tasas de fijación de N<sub>2</sub> integradas en los sedimentos con vegetación (CV) y sin vegetación (SV) en las 4 estaciones de muestreo: (a) o-BF, (b) i-BF, (c) OUT y (d) bSQ. Se muestran los tratamientos con molibdato de sodio (+Mo) y sin molibdato de sodio. Los valores representan el promedio de las réplicas  $\pm$  1 error estándar ( $n = 3$ ), excepto para el núcleo CV de i-BF en donde  $n = 2$ . El asterisco representa el valor extremo en un núcleo CV de i-BF.

### Sediment characteristics

The sediments were mainly composed of sand and silt; clay represented less than 3%. Silt, C<sub>org</sub>, and N contents were similar between depths and between the CV and SV cores within each station; however, there were significant differences among stations. C<sub>org</sub> and N contents (Fig. 6a, b) showed a spatial gradient, the highest values occurring at station i-BF, but there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the CV and SV cores. The C<sub>org</sub>/N ratio was  $6.9 \pm 0.2$  at i-BF,  $7.1 \pm 0.2$  at bSQ,  $6.0 \pm 1.8$  at OUT, and  $4.4 \pm 0.2$  at o-BF. C<sub>org</sub> and N showed a significant correlation ( $P < 0.05$ ) with silt content ( $r = 0.7$ ). Silt content (Fig. 6c) increased towards the innermost stations and there were significant differences ( $P < 0.05$ ) between the stations closest to the mouth (OUT and o-BF) and farthest from the mouth (i-BF and bSQ), ranging from 1% to 34% at OUT and from 42% to 72% at the

10.3 y 12.0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , y sólo se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la estación o-BF y la estación OUT para los núcleos SV (Fig. 3). En las estaciones OUT y bSQ, los núcleos SV presentaron tasas de fijación más altas que los núcleos CV, y en las estaciones o-BF e i-BF las tasas fueron más altas para los núcleos CV, aunque las diferencias no fueron significativas. Las tasas de fijación de N<sub>2</sub> en los tratamientos con y sin molibdato de sodio no presentaron diferencias significativas (Fig. 3) excepto en la estación bSQ, en donde  $\sim 40\%$  de la fijación puede ser atribuido a las bacterias sulfatoreductoras. Los valores extremos de las tasas de fijación de N<sub>2</sub> que se encontraron para uno de los núcleos CV de i-BF, entre los centímetros 2 y 5, variaron entre 9.6 y 35.0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ; estos valores no se detectaron en el tratamiento con molibdato de sodio, por lo que dichas tasas pueden ser atribuidas a bacterias sulfatoreductoras.

### Tasas de fijación de N<sub>2</sub> en la filofera

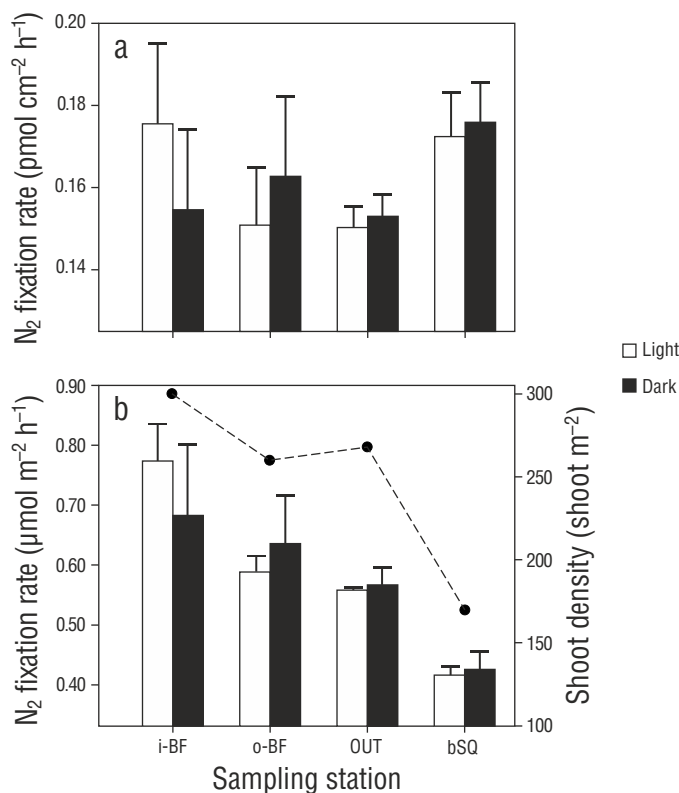
Las tasas de fijación en la filofera no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre la hoja 2 y la hoja 4, por lo que las tasas de ambas hojas se consideraron como réplicas para los análisis posteriores. En la mayoría de las estaciones (excepto en i-BF), las tasas de fijación de N<sub>2</sub> fueron más altas en los tratamientos en oscuridad que en los tratamientos con luz (Fig. 4a), aunque estas diferencias no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). A pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre estaciones ni entre los tratamientos con luz y en oscuridad ( $H_{(3,24)} = 6.46$ ,  $P = 1.00$  y  $H_{(3,24)} = 3.07$ ,  $P = 0.385$ , respectivamente), las tasas de fijación mostraron una tendencia a incrementar en las estaciones más internas.

Los datos de las tasas de fijación de N<sub>2</sub> en la filofera fueron prorrateados por la densidad de haces obtenida en el invierno de 2014 (Sandoval-Gil, datos no publicados). La tendencia espacial de los datos prorrateados fue similar a la distribución de los valores de densidad de haces (Fig. 4b); se observó un incremento de la estación OUT hacia i-BF, y los valores para bSQ fueron menores que los valores para OUT. La contribución de las bacterias epífitas dentro de las praderas de *Z. marina*, considerando las tasas de fijación de N<sub>2</sub> en la filofera y en los sedimentos, fue de  $\sim 7\%$  ( $0.6 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) (Fig. 5).

### Características de los sedimentos

Los sedimentos estuvieron compuestos principalmente por arenas y limos; las arcillas representaron menos del 3%. Dentro de cada estación, los contenidos de limos, C<sub>org</sub> y N fueron similares entre profundidades y entre los núcleos CV y SV; sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre estaciones. El contenido de C<sub>org</sub> y de N (Fig. 6a, b) en los sedimentos presentó un gradiente espacial, donde los valores más altos se encontraron en la estación i-BF, pero no





**Figure 4.** Spatial variation in  $N_2$  fixation in the phyllosphere per square centimeter of leaf (a) and per square meter (b).  $N_2$  fixation rates under light and dark conditions are shown for each sampling station. Values represent the mean  $\pm$  1 standard error ( $n = 6$ ). The dotted line represents *Zostera marina* shoot density.

**Figura 4.** Variación espacial de la fijación de  $N_2$  en la filofera por centímetro cuadrado de la hoja (a) y por metro cuadrado (b). Se muestran las tasas de fijación de  $N_2$  bajo condiciones de luz y de oscuridad para cada estación de muestreo. Los valores representan el promedio  $\pm$  1 error estándar ( $n = 6$ ). La línea punteada representa la densidad de haces de *Zostera marina*.

innermost stations.  $N_2$  fixation was also significantly correlated with  $C_{org}$  and silt content ( $P < 0.05$ ,  $r = 0.19$  and  $0.20$ , respectively). The chlorophyll  $a$  content of surface sediments did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) among stations or between the CV and SV cores; however, at i-BF, o-BF, and OUT the concentration of chlorophyll  $a$  was higher at the vegetated sites (Fig. 6d). Regarding the correlation between chlorophyll  $a$  and the  $N_2$  fixation rates and other sediment variables, it was only significantly correlated with silt content ( $r = 0.44$ ).

#### N isotopic composition of *Zostera marina* leaves

The N isotopic composition ( $\delta^{15}N$ ) of *Z. marina* tissues was lowest at i-BF, though the variability between the replicates was high (values between  $6.9\text{‰}$  and  $12.4\text{‰}$ ) so there

se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los núcleos CV y SV. La razón  $C_{org}/N$  fue de  $6.9 \pm 0.2$  para i-BF,  $7.1 \pm 0.2$  para bSQ,  $6.0 \pm 1.8$  para OUT y  $4.4 \pm 0.2$  para o-BF. El  $C_{org}$  y el N presentaron una correlación significativa ( $P < 0.05$ ) con el contenido de limos ( $r = 0.7$ ). El contenido de limos (Fig. 6c) incrementó hacia las estaciones más internas, y se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las estaciones más cercanas a la boca (OUT y o-BF) y las estaciones más internas (i-BF y bSQ). En OUT, el intervalo del contenido de limos en los sedimentos fue de 1% a 34%, mientras que en las estaciones más internas varió de 42% a 72%. También fue significativa la correlación de la fijación de  $N_2$  con el  $C_{org}$  y con el contenido de limos ( $P < 0.05$ ,  $r = 0.19$  y  $0.20$ , respectivamente). Por otra parte, la concentración de clorofila  $a$  en la superficie de los sedimentos no presentó diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre estaciones, ni entre los núcleos CV y SV; sin embargo, en las estaciones i-BF, o-BF y OUT la concentración de clorofila  $a$  fue mayor en los sitios con vegetación (Fig. 6d). En cuanto a la correlación de la clorofila  $a$  con el resto de las variables accesorias y con las tasas de fijación de  $N_2$ , solamente fue significativa con el contenido de limos ( $r = 0.44$ ).

#### Composición isotópica de N de las hojas de *Zostera marina*

Los valores más bajos de la composición isotópica de N ( $\delta^{15}N$ ) en los tejidos de *Z. marina* se presentaron en i-BF, aunque la variabilidad entre las réplicas fue alta (valores entre  $6.9\text{‰}$  y  $12.4\text{‰}$ ) y, por tanto, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.55$ ) entre estaciones (Fig. 6e). En las otras 3 estaciones los valores variaron entre  $10.8\text{‰}$  y  $11.9\text{‰}$ .

#### DISCUSIÓN

La fijación de  $N_2$  puede ser una fuente de N importante para los pastos marinos, alternativa a la incorporación directa de compuestos nitrogenados presentes en la columna de agua y en los sedimentos. Pese a su potencial importancia, existen pocos estudios en los que se han reportado tasas de fijación en los sedimentos y en la filofera de praderas en zonas templadas. Los resultados del presente estudio, realizado en bahía San Quintín, sugieren que la fijación de  $N_2$  para el periodo invernal puede ser atribuida principalmente a las bacterias heterótrofas, tanto en las partes del sedimento donde no penetra la luz como en la parte superficial e incluso en la filofera. Si bien las tasas de fijación de  $N_2$  presentaron poca variabilidad entre las estaciones de muestreo, los sedimentos en las estaciones más internas, donde el N proveniente desde el océano adyacente es escaso, presentaron las tasas más elevadas. Las tasas de fijación más bajas se midieron en la estación donde la actividad ostrícola es mayor y donde se han observado altas tasas de desnitrificación. La contribución de las bacterias epífitas a la fijación de  $N_2$

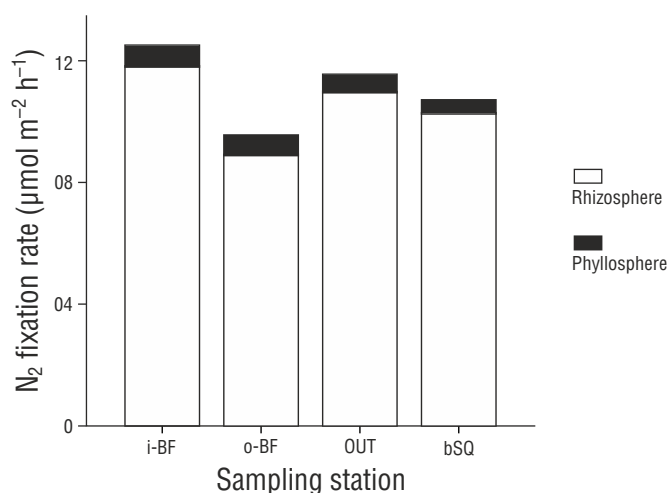
were no significant differences ( $P = 0.55$ ) between stations (Fig. 6e). At the other 3 stations the values ranged from 10.8‰ to 11.9‰.

## DISCUSSION

Benthic  $N_2$  fixation can be an important source of N for seagrasses, an alternative to the direct assimilation of nitrogenous compounds found in the water column and in sediments. Despite its potential importance, few studies have reported fixation rates in sediments and in the phyllosphere of temperate seagrass meadows. The results of the present study conducted in San Quintín Bay suggest that  $N_2$  fixation in winter can be mainly attributed to heterotrophic bacteria, both in the parts of the sediment that light does not reach and at the surface and even in the phyllosphere. Even though the fixation rates showed little variability between sampling stations, the sediments at the innermost stations where ocean-derived N is scarce had the highest rates. The lowest fixation rates were measured at the station where oyster aquaculture activity is greater and where high denitrification rates have been found. The contribution of epiphytic bacteria to benthic  $N_2$  fixation (sediments + phyllosphere) in the lagoon was only ~7%.

### Contribution of different diazotrophs to $N_2$ fixation

In studies addressing  $N_2$  fixation activity, experiments carried out in the light and in the dark are used to discriminate between the activity of cyanobacteria (assuming that they only carry out  $N_2$  fixation in the presence of light) and the activity of heterotrophic bacteria (assuming that they



**Figure 5.** Spatial variation in  $N_2$  fixation rates measured in the phyllosphere and in the rhizosphere at vegetated sites.

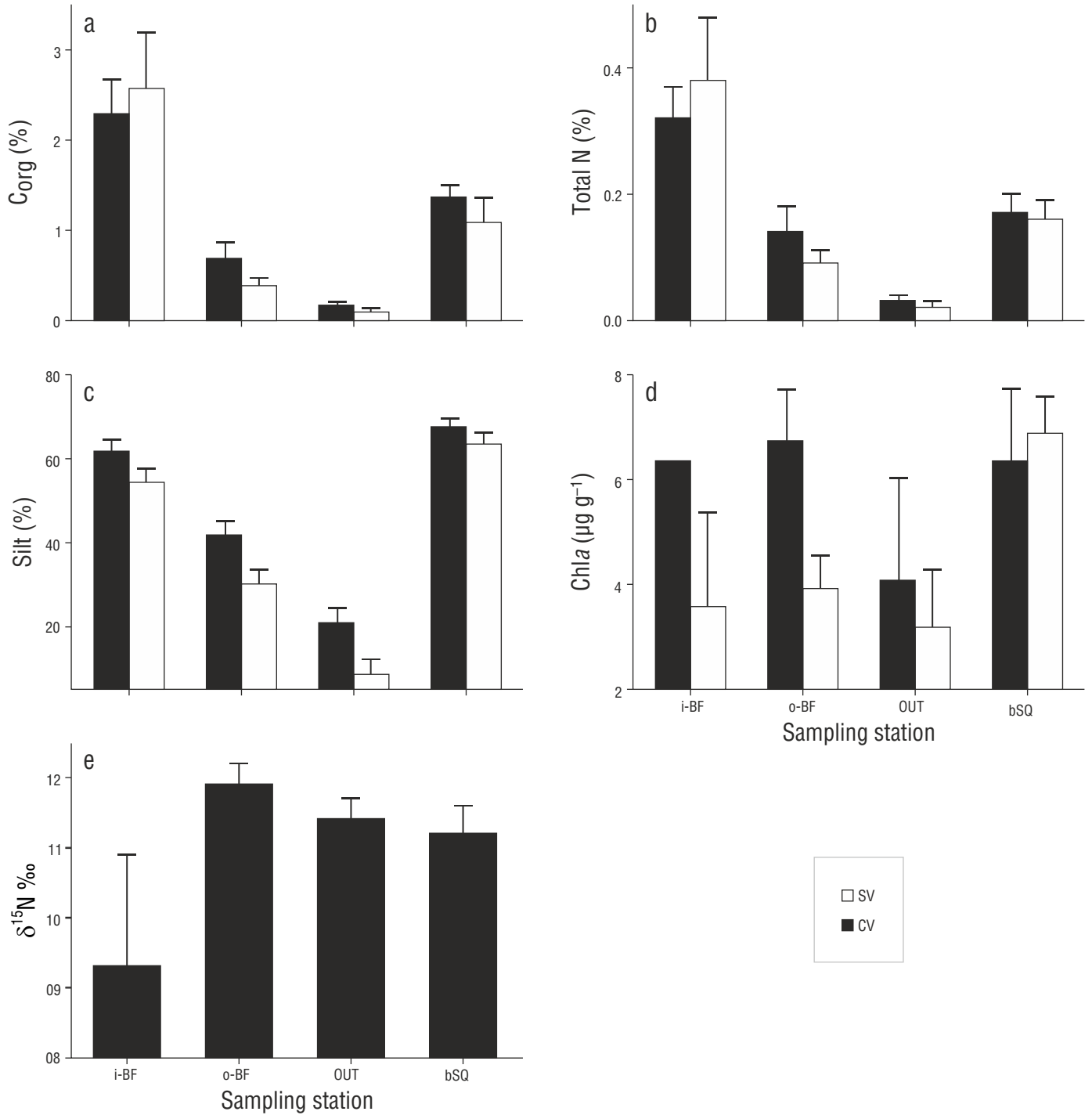
**Figura 5.** Variación espacial de las tasas de fijación de  $N_2$  medidas en la filósfera y en la rizósfera en los sitios con vegetación.

bentónica (sedimentos + filósfera) en bahía San Quintín fue únicamente de ~7%.

### Contribución de los diferentes grupos de diazotrofos

En la determinación de las tasas de fijación de  $N_2$ , los experimentos con y sin luz se utilizan para discriminar la actividad de las cianobacterias (suponiendo que únicamente realizan la fijación en presencia de luz) de la actividad de las bacterias heterótrofas (suponiendo que fijan tanto bajo la luz como en la oscuridad) en los sedimentos superficiales expuestos a la luz y en la filósfera (ver McGlathery et al. 1998). A su vez, los experimentos con y sin molibdato de sodio permiten discriminar la actividad de las bacterias sulfatoredutoras (inhibidas con el molibdato) de la actividad del resto de las heterótrofas (ver McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012). Con base en estos supuestos, la similitud en las tasas de fijación de  $N_2$  entre los tratamientos con y sin luz y entre los tratamientos con y sin molibdato de sodio sugieren que los heterótrofos fueron el grupo funcional con mayor contribución a las tasas de fijación de  $N_2$  en bahía San Quintín. Esto implica que, al menos para nuestro periodo de muestreo (invierno), las cianobacterias fotosintéticas fijadoras de  $N_2$  en las zonas iluminadas (sedimentos superficiales y filósfera) y las bacterias sulfatoredutoras presentaron, en general, baja o nula actividad de fijación. Si bien son pocos los estudios que han caracterizado los grupos funcionales que contribuyen a la fijación de  $N_2$  en las praderas de pastos marinos de clima templado, algunos de estos estudios también sugieren que las bacterias heterótrofas pueden ser las principales fijadoras de  $N_2$  (McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012). Sin embargo, en algunos sitios se ha comprobado (Welsh et al. 1996a) o se ha inferido (Russell et al. 2016) que las sulfatoredutoras pueden contribuir con un alto porcentaje de la fijación de  $N_2$  en los sedimentos. A pesar de su aparente importancia en la fijación de  $N_2$  en hábitats bentónicos marinos, incluidas las praderas de pastos marinos, el grupo funcional de los fijadores heterótrofos no ha sido caracterizado detalladamente, a diferencia de las cianobacterias y las bacterias sulfatoredutoras.

No tenemos una explicación clara del por qué, al igual que en otros sitios templados, la contribución de las cianobacterias a la fijación total de  $N_2$  en los sedimentos superficiales y en la filósfera fue aparentemente baja. Una posible explicación es que, en invierno, la luz disponible para la actividad fotosintética de las cianobacterias haya sido limitante. Por otro lado, Knapp (2012) sugirió que, a diferencia de las bacterias heterótrofas fijadoras, incluidas las sulfatoredutoras, la actividad de la fijación de las cianobacterias bentónicas puede inhibirse por la exposición prolongada a N inorgánico disuelto en concentraciones comúnmente observadas en bahía San Quintín ( $>1 \mu\text{M}$ ). Es importante mencionar que, en nuestro estudio, así como en el de Cole y McGlathery (2012), la conclusión de que son los heterótrofos



**Figure 6.** Spatial variation in (a) organic C ( $C_{org}$ ), (b) total N, (c) silt, and (d) chlorophyll *a* (Chl $a$ ) contents in vegetated sediments (CV) and bare sediments (SV) from San Quintín Bay. (e) N isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in *Zostera marina* leaves.

**Figura 6.** Variación espacial de (a) contenido de C orgánico ( $C_{org}$ ), (b) N total, (c) contenido de limos y (d) clorofila *a* (Chl $a$ ) en sedimentos con vegetación (CV) y sin vegetación (SV) de bahía San Quintín. (e) Composición isotópica de N ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en las hojas de *Zostera marina*.

carry out  $N_2$  fixation in the presence of light and in the dark) in surface sediments exposed to light and in the phyllosphere (see McGlathery et al. 1998). On the other hand, experiments with and without sodium molybdate are used to discriminate between the activity of sulfate-reducing bacteria (inhibited by molybdate) and the activity of the rest of the heterotrophs (see McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012). Based on these assumptions, the similarity between the  $N_2$  fixation rates obtained in the experiments with and without light and in the experiments with and without sodium molybdate suggest that heterotrophs are the functional group that contributes the most to  $N_2$  fixation rates in San Quintín Bay. This means that, at least during our study period (winter), photosynthetic  $N_2$ -fixing cyanobacteria in the sections exposed to light (surface sediments and phyllosphere) and sulfate-reducing bacteria showed, in general, little or no  $N_2$  fixation activity. Although only a few studies have characterized the functional groups that contribute to  $N_2$  fixation in temperate seagrass meadows, some of these studies have also suggested that heterotrophs may be the main  $N_2$ -fixing bacteria (McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012). Other studies, however, have found (Welsh et al. 1996a) or inferred (Russell et al. 2016) that sulfate-reducing bacteria contribute a high percentage of  $N_2$  fixation in sediments. Despite the importance of  $N_2$ -fixing heterotrophic bacteria in benthic marine habitats, including seagrass meadows, this functional group, unlike cyanobacteria and sulfate-reducing bacteria, has not been characterized in detail.

There is no clear explanation as to why, as at other temperate sites, the contribution of cyanobacteria to total  $N_2$  fixation in surface sediments and the phyllosphere was apparently low. One possibility is that in winter, the light available for the photosynthetic activity of cyanobacteria may have been insufficient. Knapp (2012) suggested that, unlike  $N_2$ -fixing heterotrophic bacteria, including sulfate-reducing bacteria, the  $N_2$ -fixing activity of benthic cyanobacteria may be inhibited by exposure for prolonged periods to dissolved inorganic N concentrations commonly observed in San Quintín Bay ( $>1 \mu\text{M}$ ). Like Cole and McGlathery (2012), our conclusion that heterotrophs are the dominant functional group responsible for  $N_2$  fixation in the illuminated substrates (surface sediments and seagrass leaves) is based on the assumption that photoautotrophic  $N_2$ -fixing cyanobacteria would only contribute to fixation in the treatments with light. However, the contribution of cyanobacteria to  $N_2$ -fixation in the treatments carried out in the dark cannot be discarded because some unicellular and filamentous cyanobacteria (with and without heterocysts) are capable of fixing N during the night (Bergman et al. 1997, Severin and Stal 2008). Gracia-Escobar et al. (2014) characterized the phytoplankton community at one station in the west arm of the bay and reported that filamentous cyanophytes predominate during ebb tides, which suggests that they are

el grupo funcional dominante en la fijación de  $N_2$  en los sustratos iluminados (sedimentos superficiales y hojas de los pastos) se basa en el supuesto de que las cianobacterias fijadoras fotoautótrofas contribuyen a la fijación únicamente en los tratamientos con luz. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de las cianobacterias a la fijación de  $N_2$  en los tratamientos en oscuridad, ya que se sabe que algunas cianobacterias unicelulares y algunas filamentosas (con y sin heterocistos) tienen la capacidad de fijar N durante la noche (Bergman et al. 1997, Severin y Stal 2008). Gracia-Escobar et al. (2014) caracterizaron la comunidad fitoplanctónica en una estación en el brazo oeste y reportaron que las cianofitas filamentosas fueron dominantes durante el reflujó de la marea, lo que sugiere que éstas son resuspendidas desde los sedimentos del interior de la laguna. Es necesario determinar si estas cianobacterias son diazótrofas bentónicas y si fijan  $N_2$  durante el día o la noche.

La contribución de las bacterias sulfatoreductoras a la fijación de  $N_2$  fue baja en la mayoría de las estaciones (entre el 0% y 15%). En otros sitios con presencia de *Z. marina* también se ha observado que las bacterias sulfatoreductoras contribuyen poco ( $<25\%$ ) a las tasas de fijación total (McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012), lo cual ha sido asociado a sedimentos arenosos con baja concentración de materia orgánica ( $<2\%$ ). En general, los sedimentos de bahía San Quintín presentan bajo contenido de arcillas ( $<3\%$ ); en las zonas más dinámicas (estaciones OUT y o-BF), los sedimentos son arenosos y presentan bajo contenido de C ( $<1\%$ ), mientras que en las estaciones internas predominan los lodos limosos (Daesslé et al. 2009) con contenido de  $C_{\text{org}}$  sedimentario ligeramente mayor (Fig. 6a). El tamaño de grano y la hidrodinámica parecen limitar la acumulación de  $C_{\text{org}}$  en los sedimentos de las estaciones más cercanas a la boca de la laguna, lo que a su vez evita la generación de condiciones anóxicas y, por tanto, limita la sulfatoreducción. Sin embargo, en la estación bSQ, donde los sedimentos estuvieron compuestos principalmente por limos y donde el contenido de  $C_{\text{org}}$  fue mayor que 1%, las bacterias sulfatoreductoras contribuyeron con  $\sim 40\%$  a las tasas de fijación de  $N_2$ . Se han reportado altas contribuciones ( $>50\%$ ) a la fijación de  $N_2$  en sedimentos por parte de las bacterias sulfatoreductoras, tanto en sitios con contenido de materia orgánica sedimentaria relativamente bajo ( $<0.4\%$ , Capone 1982) como en sitios en donde los aportes de materia orgánica al sedimento son altos (Welsh et al. 1996b, Fulweiler et al. 2013). En una de las 3 réplicas de los núcleos CV de la estación i-BF, cuyo contenido promedio de  $C_{\text{org}}$  fue de 2.1%, se midieron las tasas de fijación de  $N_2$  más altas de nuestro estudio ( $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) y estuvieron asociadas a bacterias sulfatoreductoras. Ya que las otras réplicas tuvieron un contenido similar de  $C_{\text{org}}$  pero presentaron menores tasas de fijación de  $N_2$ , estos resultados indican que las comunidades bacterianas pueden estar distribuidas de manera heterogénea

resuspended from inner lagoon sediments. It is important to determine whether these cyanobacteria are benthic diazotrophs and if they fix N during the day or night.

The contribution of sulfate-reducing bacteria to  $N_2$  fixation was low at most stations (between 0% and 15%). Sulfate-reducing bacteria have also been found to contribute little (<25%) to total fixation rates at other sites occupied by *Z. marina* (McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012), and this has been associated with sandy sediments with low concentration of organic matter (<2%). In general, the San Quintín Bay sediments are characterized by low clay content (<3%). In the more dynamic areas (stations OUT and o-BF) the sediments are sandy and have low C content (<1%), whereas at the inner stations there is a predominance of silty muds (Daesslé et al. 2009) with slightly higher  $C_{org}$  content (Fig. 6a). The hydrodynamics and grain size seem to limit the accumulation of  $C_{org}$  in the sediments of the stations closest to the mouth, which in turn prevents the generation of anoxic conditions, thereby limiting sulfate reduction. At station bSQ, however, where the sediments are mainly composed of silt and  $C_{org}$  content was >1%, sulfate-reducing bacteria contributed ~40% to the  $N_2$  fixation rates. Sulfate-reducing bacteria have been reported to contribute >50% to N fixation in sediments both at sites with relatively low organic matter content (<0.4%, Capone 1982) and at sites where organic matter inputs to sediment are high (Welsh et al. 1996b, Fulweiler et al. 2013). In the present study, the highest  $N_2$  fixation rates ( $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), which were associated with sulfate-reducing bacteria, were measured in one of the 3 replicates of the CV cores from station i-BF that had an average  $C_{org}$  content of 2.1%. Since the other replicates had a similar  $C_{org}$  content but lower  $N_2$  fixation rates, these results indicate that the bacterial communities can be distributed heterogeneously in the sediments, forming microzones of high biomass near the roots and rhizomes with high availability of labile  $C_{org}$  (O'Donohue et al. 1991).

### $N_2$ fixation rates in sediments

The  $N_2$  fixation rates measured in the lagoon sediments in this study ( $167$  to  $288 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) are within the ranges reported for other temperate seagrass meadows (Capone 1982, Welsh et al. 1996a, McGlathery et al. 1998, Cole and McGlathery 2012, Cook et al. 2015); however, when compared to measurements carried out only during the winter, our results are relatively high. For example, McGlathery et al. (1998) reported rates ranging from  $86$  to  $193 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  for sediments from a *Z. marina* meadow in Limfjord, Denmark, and Welsh et al. (1996a) reported rates ranging from  $7.1$  to  $14.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  for *Zostera noltii* meadows in Bassin d'Archachon, France.

In general,  $N_2$  fixation rates exhibited reduced spatial variability in the different spatial levels examined here

en los sedimentos, formando microzonas de alta biomasa cerca de las raíces y rizomas con alta disponibilidad de  $C_{org}$  lábil (O'Donohue et al. 1991).

### Tasas de fijación de $N_2$ en los sedimentos

Las tasas de fijación de  $N_2$  en los sedimentos de bahía San Quintín medidas en este estudio (de  $167$  a  $288 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) se encuentran dentro de los intervalos reportados para otros sitios templados con praderas de pastos marinos (Capone 1982, Welsh et al. 1996a, McGlathery et al. 1998, Cole y McGlathery 2012, Cook et al. 2015). Sin embargo, al compararlos con mediciones realizadas únicamente durante el invierno, nuestros resultados son relativamente altos. Por ejemplo, McGlathery et al. (1998) reportaron tasas de entre  $86$  y  $193 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  para sedimentos con presencia de praderas de *Z. marina* en Limfjord, Dinamarca, mientras que Welsh et al. (1996a) reportaron tasas de entre  $7.1$  y  $14.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$  para praderas de *Zostera noltii* en Bassin d'Archachon, Francia.

En general, las tasas de fijación de  $N_2$  exhibieron poca variabilidad en los distintos niveles espaciales aquí estudiados: a distintas profundidades de la columna sedimentaria, dentro y fuera de las praderas de cada estación de muestreo, y entre las estaciones en la laguna. Es posible que la poca variabilidad espacial de las tasas de fijación de  $N_2$  esté relacionada con las bajas biomásas y el escaso crecimiento de *Z. marina* durante los meses de invierno. En bahía San Quintín, los pastos marinos presentan la máxima biomasa en primavera y verano (~ $200 \text{ g peso seco m}^{-2}$ ) y la mínima en invierno (< $100 \text{ g peso seco m}^{-2}$ ) en función del ciclo estacional de la intensidad de la luz y de la temperatura (Cabello-Pasini et al. 2003, Sandoval-Gil et al. 2015). Se ha observado que las tasas de fijación de  $N_2$  en praderas de pastos marinos están estrechamente relacionadas con la variabilidad en el metabolismo de los pastos, es decir, mayores tasas en la temporada de mayor crecimiento y menores tasas en invierno (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000). Dicha relación se puede explicar por el hecho de que en los periodos más productivos los pastos exudan mayores cantidades de  $C_{org}$  lábil a través de las raíces y rizomas, lo que favorece la actividad de las bacterias heterótrofas, incluidas las sulfatoreductoras (Moriarty et al. 1986, Welsh 2000).

La baja productividad vegetativa de los pastos marinos en invierno también podría explicar por qué no se observaron diferencias significativas entre las tasas de fijación en los sedimentos dentro y fuera de las praderas, como se ha observado en otros estudios (Russell et al. 2016). Por otro lado, Cole y McGlathery (2012) observaron tasas de fijación similares dentro y fuera de praderas jóvenes (entre 2 y 3 años de haberse establecido y con densidad < $100 \text{ haces m}^{-2}$ ) de *Z. marina*, en tanto que en praderas maduras (7 a 8 años y densidad > $400 \text{ haces m}^{-2}$ ) la fijación fue mayor dentro de las

(different depths in the sediment column, within and outside the seagrass meadows at each sampling station, and between sampling stations). The little spatial variation in  $N_2$  fixation rates could be related to low biomass and scanty growth of *Z. marina* during the winter months. At San Quintín Bay, seagrass biomass is maximum in spring and summer ( $\sim 200$  g dry weight  $m^{-2}$ ) and minimum in winter ( $< 100$  g dry weight  $m^{-2}$ ) in accordance with the seasonal cycle of temperature and light intensity (Cabello-Pasini et al. 2003, Sandoval-Gil et al. 2015).  $N_2$  fixation rates in seagrass meadows are closely related to the variability in seagrass metabolism, with higher rates during the growing season and lower rates in winter (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000). An explanation for this relationship is that during the most productive periods, seagrasses exude greater amount of labile  $C_{org}$  through the roots and rhizomes, favoring the activity of heterotrophic bacteria, including sulfate-reducing bacteria (Moriarty et al. 1986, Welsh 2000).

Low seagrass productivity in winter may also explain why there were no significant differences in  $N_2$  fixation rates between vegetated and bare sediments, as has been observed in other studies (Russell et al. 2016). Cole and McGlathery (2012) found similar fixation rates within and outside young *Z. marina* meadows (2 to 3 yr old, density  $< 100$  shoots  $m^{-2}$ ), whereas in the case of older meadows (7 to 8 yr old, density  $> 400$  shoots  $m^{-2}$ ), fixation rates were higher within the meadows. These authors suggest that shoot density could play an important role in controlling the differences in fixation rates at vegetated and bare sites. At San Quintín Bay, shoot density at the sampling stations in winter ranged from 170 to 300 shoots  $m^{-2}$  (Fig. 4), which is probably a low density to induce differences in the fixation rates within and outside the meadows. Slightly higher fixation rates were measured in the bare sediments from stations OUT and bSQ (Fig. 3). The bSQ sediments also had a slightly higher chlorophyll *a* content (Fig. 6d). Since chlorophyll *a* content is considered an indicator of microalgal biomass (Nagel 2004), the fact that  $N_2$  fixation is higher in bare sediments than in vegetated sediments suggests that  $N_2$ -fixing cyanobacteria are contributing to fixation in bare sediments (Nagel 2004, Russell et al. 2016).

Fixation rates were significantly lower at station o-BF than at the other 3 stations; the highest  $\delta^{15}N$  values ( $\sim 12\%$ ) determined for seagrass leaves were also recorded at this station (Fig. 6e). In other studies (Sandoval-Gil et al. 2015 and unpublished data), maximum  $\delta^{15}N$  values have also been found for *Z. marina* at this same site, suggesting that denitrification is an intense process that dominates over  $N_2$  fixation. The sediments at this oyster farming site were the most affected by the feces and pseudofeces produced by oysters (Sandoval-Gil et al. 2016), as reflected by the low  $C_{org}/N$  ratios ( $4.4 \pm 0.2$ ). Several studies have shown that oyster cultures input a large amount of labile organic matter (as feces or pseudofeces) to sediments (Newell et al. 2005) and

praderas. Estos autores sugieren que la densidad de haces puede jugar un papel importante en el control de las diferencias de las tasas de fijación dentro y fuera de las praderas. En bahía San Quintín, la densidad de haces en las estaciones muestreadas en invierno varía entre 170 y 300 haces  $m^{-2}$  (Fig. 4), una densidad probablemente baja para inducir diferencias en las tasas de fijación dentro y fuera de las praderas. Cabe mencionar que en las estaciones OUT y bSQ se presentaron tasas de fijación de  $N_2$  ligeramente mayores en los sedimentos sin vegetación (Fig. 3); en el caso de bSQ, dichos sedimentos también tuvieron un ligero mayor contenido de clorofila *a* (Fig. 6d). Ya que el contenido de clorofila *a* es considerado un indicador de la biomasa de microalgas bentónicas (Nagel 2004), el que la fijación en los sedimentos sin vegetación sea mayor en comparación con los sedimentos adyacentes con vegetación probablemente sugiere que las cianobacterias fijadoras de  $N_2$  están contribuyendo a la fijación en sedimentos sin vegetación (Nagel 2004, Russell et al. 2016).

La única estación en donde las tasas de fijación fueron significativamente más bajas que en el resto de las estaciones fue en o-BF; en esta estación también se observaron los valores más altos de  $\delta^{15}N$  ( $\sim 12\%$ ) de las hojas de los pastos (Fig. 6e). En otros estudios (Sandoval-Gil et al. 2015 y datos no publicados) también se han observado los valores máximos de  $\delta^{15}N$  en *Z. marina* en esta estación, lo cual sugiere que la desnitrificación es un proceso intenso que domina sobre la fijación de  $N_2$ . En esta estación ocurre el impacto más directo de la ostricultura en los sedimentos a través de los aportes de heces y pseudoheces (Sandoval-Gil et al. 2016), como lo reflejan las bajas razones  $C_{org}/N$  sedimentario ( $4.4 \pm 0.2$ ). En diversos estudios se ha demostrado que los ostricultivos aportan una gran cantidad de materia orgánica lábil proveniente de las heces y las pseudoheces a los sedimentos (Newell et al. 2005) y que dichos aportes intensifican el proceso de desnitrificación (Kellogg et al. 2014). Otros estudios han demostrado que los aportes de materia orgánica lábil hacia los sedimentos pueden inducir a que la desnitrificación predomine sobre la fijación de  $N_2$  (Fulweiler et al. 2013). Se puede suponer, entonces, que la desnitrificación puede ser dominante en los sedimentos de la zona o-BF, y posiblemente limita la actividad de los diazotófos. Sin embargo, es necesario realizar estudios para entender la interacción entre las bacterias desnitrificadoras y los diazotófos y cuáles son las posibles causas que limitan o intensifican la actividad de ambos grupos.

### Tasas de fijación de $N_2$ en la filosfera

Sólo una pequeña fracción ( $\sim 7\%$ ) de las tasas de fijación bentónica de  $N_2$  (sedimentos + filosfera) en bahía San Quintín puede ser atribuida a la fijación en la filosfera (por bacterias epífitas), como se ha reportado para otros sitios con *Zostera* spp. de zonas templadas en invierno (McRoy et al.

that these inputs intensify the denitrification process (Kellogg et al. 2014). Other studies have shown that inputs of labile organic matter to sediments can induce a predominance of denitrification over  $N_2$  fixation (Fulweiler et al. 2013). It can thus be assumed that denitrification dominates in sediments at station o-BF, possibly limiting the activity of diazotrophs. Further studies are necessary to understand the interaction between denitrifying bacteria and diazotrophs and to identify the possible causes limiting or intensifying the activity of both groups.

### **$N_2$ fixation rates in the phyllosphere**

Only a small fraction (~7%) of the benthic  $N_2$  fixation rates (sediments + phyllosphere) in San Quintín Bay can be attributed to fixation in the phyllosphere (by epiphytic bacteria), as has been reported for other temperate sites occupied by *Zostera* spp. in winter (McRoy et al. 1973, Welsh 2000); however,  $N_2$  fixation rates in the phyllosphere were low ( $<13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) compared with rates measured in *Z. marina* meadows in summer ( $>100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , Cole and McGlathery 2012). As in the case of sediments, one of the factors stimulating fixation rates in the phyllosphere is labile C exuded by seagrasses, in this case through the leaves, since this C serves as substrate for diazotrophs (Capone et al. 1979). The amount of  $N_2$ -fixing epiphytes in the leaves can also determine the variation in fixation rates in the phyllosphere (Reynolds et al. 2015). In this study we did not measure epiphyte biomass, but visually there were no differences in coverage between leaves 2 and 4 of the same shoot, nor between the leaves from different meadows. This apparent homogeneity in epiphyte biomass between leaves and stations probably contributed to the low variation in  $N_2$  fixation rates in the phyllosphere. It would be recommendable for future studies to measure epiphyte biomass and characterize the community of  $N_2$ -fixing bacteria.

### **Contribution of $N_2$ fixation to seagrass N demand**

Based on the specific N demand values ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  dry weight  $\text{h}^{-1}$ ) for the growth and foliar biomass of *Z. marina* in winter reported by Sandoval-Gil et al. (2015), N demand values of 114 to 238  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  were estimated for *Z. marina* (Table 1). The benthic  $N_2$  fixation rates obtained in this study (phyllosphere + sediment) were 9.5 to 13.0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , so this process would potentially supply between 5% and 10% of the N required by *Z. marina* in San Quintín Bay, similar to that reported for other systems (5–12%) (Welsh et al. 1996a, McGlathery et al. 1998); however, the values are low compared with the direct uptake of dissolved inorganic N by foliar and subterranean tissues ( $>300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , Sandoval-Gil et al. 2015). Given that shoot density is higher at i-BF,  $N_2$  fixation rates per square meter are higher at this station (Fig. 4b), which is coherent with the higher percent

1973, Welsh 2000). Las tasas de fijación en la filosfera fueron bajas ( $<13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) comparadas con las tasas medidas en praderas de *Z. marina* durante el verano ( $>100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , Cole y McGlathery 2012). Al igual que en los sedimentos, uno de los factores que estimulan las tasas de fijación en la filosfera es el C lábil exudado por los pastos marinos, en este caso a través de las hojas, ya que este C sirve como sustrato para los diazotófos (Capone et al. 1979). También la cantidad de epífitas fijadoras de  $N_2$  en las hojas puede determinar la variación de las tasas de fijación en la filosfera (Reynolds et al. 2015). Aunque en este trabajo no se midió la cantidad de epífitas, visualmente no se apreciaron diferencias en su cobertura entre las hojas 2 y 4 de un mismo haz, ni entre las hojas de diferentes praderas. Esta aparente homogeneidad en el contenido de epífitas entre hojas y estaciones probablemente contribuyó a la baja variabilidad en las tasas de fijación de  $N_2$  en la filosfera. Sin embargo, es recomendable que en futuros estudios se mida la cantidad de epífitas y se caracterice la comunidad de bacterias fijadoras.

### **Contribución de la fijación de $N_2$ a la demanda de N de *Zostera marina***

A partir de los valores de la demanda específica de N ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco  $\text{h}^{-1}$ ) para el crecimiento y de las biomásas foliares de *Z. marina* durante invierno reportados por Sandoval-Gil et al. (2015), se calculó una demanda de N de 114 a 238  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$  (Tabla 1). Las tasas de fijación bentónica de  $N_2$  obtenidas en el presente estudio (filosfera + sedimento) fueron de 9.5 a 13.0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , por lo que este proceso potencialmente aportaría entre el 5% y 10% del N requerido por *Z. marina* en bahía San Quintín, similar a lo reportado para otros sistemas (5–12%) (Welsh et al. 1996a, McGlathery et al. 1998) y baja comparada con la incorporación directa de N inorgánico disuelto por tejidos foliares y subterráneos ( $>300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , Sandoval-Gil et al. 2015). Dado que la densidad de haces es mayor en i-BF, las tasas de fijación de  $N_2$  por metro cuadrado fueron más elevadas en esta estación (Fig. 4b), lo que es coherente con el mayor porcentaje de contribución de la fijación para la demanda de N de las plantas que crecen en esta estación. Lo anterior también puede estar relacionado con los valores más bajos de  $\delta^{15}\text{N}$  ( $<11\text{‰}$ ) de hojas de *Z. marina* observados en la estación i-BF en el presente estudio y en estudios previos (Sandoval-Gil et al. 2015; Hernández-López et al., datos no publicados), ya que la composición de la fuente, el  $N_2$  atmosférico, es cercana a 0‰ (Sharp 2007); por lo tanto, este proceso puede ocasionar un decremento de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ .

### **Contribución de la fijación de $N_2$ como fuente de N en bahía San Quintín**

Finalmente, realizamos un cálculo para estimar el papel de la fijación de  $N_2$  en el balance de N en bahía San Quintín

**Table 1.** Values of N<sub>2</sub> fixation (phyllosphere + rhizosphere), N demand of *Zostera marina*, and percent contribution of N<sub>2</sub> fixation to *Z. marina* N demand. DW = dry weight.**Tabla 1.** Valores de fijación de N<sub>2</sub> (filosfera + rizosfera), demanda de N de *Zostera marina* y porcentaje de contribución de la fijación de N<sub>2</sub> a la demanda de *Z. marina*. DW = peso seco.

Sampling station	Biomass* (gDW m <sup>-2</sup> )	N demand* (μmol gDW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	N demand (μmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	N fixation (μmol m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Percent contribution
i-BF	178	0.7	125	12.5	10.8
o-BF	229	0.5	114	9.5	8.4
OUT	199	1.2	238	11.5	4.8
bSQ	242	0.8	194	10.7	5.5

\* Sandoval-Gil et al. (2015)

contribution of N<sub>2</sub> fixation to the N demand of plants growing at that station. The latter could also be related to lower δ<sup>15</sup>N values (<11‰) obtained for *Z. marina* leaves at station i-BF in the present and previous studies (Sandoval-Gil et al. 2015; Hernández-López et al., unpublished data), since the composition of the source, atmospheric N<sub>2</sub>, is close to 0‰ (Sharp, 2007); hence, this process can cause a decrease in δ<sup>15</sup>N values.

### Contribution of N<sub>2</sub> fixation to the N budget of San Quintín Bay

Finally, we estimated the contribution of N<sub>2</sub> fixation to the N budget of San Quintín Bay to test the assumption that this process is not very important in the lagoon (Camacho-Ibar et al. 2003). According to Ward et al. (2003), seagrass meadows, mudflats, and channels cover an area of 20.7, 8.9, and 8.5 km<sup>2</sup>, respectively, in San Quintín Bay. The mean N<sub>2</sub> fixation rate (sediments + phyllosphere) for the vegetated sediments from all 4 sites was 266 ± 34 μmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, and for the bare sediments, 266 ± 98 μmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Prorating these rates by the area of each habitat produces N inputs to the system by N<sub>2</sub> fixation of 5.5 ± 0.7 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> in the area occupied by *Z. marina*, 2.4 ± 0.8 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> in the mudflats, and 2.3 ± 0.8 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> in the channels, resulting in a total input of 10.1 ± 2.4 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> (0.26 ± 0.06 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>).

Using a mass balance model (the LOICZ model), Camacho-Ibar et al. (2003) calculated an oceanic input of dissolved inorganic N (nitrate + ammonium) by advection during winter of 2.2 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup> and an input by tidal mixing of 86 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>, for a total oceanic input of 88 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>. Our results show that N<sub>2</sub> fixation is equivalent to ~12% of the oceanic dissolved inorganic N inputs (Fig. 7). With the same model, Camacho-Ibar et al. (2003) calculated that the difference between fixation and denitrification in winter was -0.7 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Therefore, with our fixation estimate we can calculate a denitrification rate of 1.0 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, which corresponds to 38 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>.

para probar el supuesto de que este proceso es poco importante en la laguna (Camacho-Ibar et al. 2003). De acuerdo con Ward et al. (2003), el área que cubren los pastos marinos, las planicies lodosas y los canales en bahía San Quintín es de 20.7, 8.9 y 8.5 km<sup>2</sup>, respectivamente. La tasa de fijación de N<sub>2</sub> promedio para los 4 sitios dentro de las praderas (sedimentos + filosfera) fue de 266 ± 34 μmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y para los sedimentos sin vegetación fue de 266 ± 98 μmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Prorrateando estas tasas por el área superficial de cada hábitat, los aportes al sistema por fijación de N<sub>2</sub> resultaron en 5.5 ± 0.7 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> para el área cubierta por *Z. marina*, en 2.4 ± 0.8 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> para las planicies lodosas y en 2.3 ± 0.8 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> para los canales, lo que resulta en un aporte total de 10.1 ± 2.4 × 10<sup>3</sup> mol d<sup>-1</sup> (0.26 ± 0.06 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>).

Utilizando un modelo de balance de masas (el modelo de LOICZ), Camacho-Ibar et al. (2003) calcularon un aporte oceánico de nitrógeno inorgánico disuelto (nitrato + amonio) por advección durante el invierno de 2.2 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup> y un aporte por mezcla ocasionado por la marea de 86 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>, para un aporte oceánico total de 88 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>. Nuestros resultados muestran que la fijación equivale a ~12% de los aportes de nitrógeno inorgánico disuelto provenientes desde el océano (Fig. 7). Con el mismo modelo, Camacho-Ibar et al. (2003) calcularon que la diferencia entre la fijación y la desnitrificación en invierno fue de -0.7 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Con nuestro cálculo de fijación, por tanto, podemos estimar una desnitrificación de 1.0 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, que corresponde a 38 × 10<sup>3</sup> mol N d<sup>-1</sup>.

En resumen, nuestros cálculos indican que durante el invierno, la fijación de N<sub>2</sub> puede equivaler a la tercera parte de las pérdidas de N por desnitrificación. Este resultado es relevante ya que indica que el aporte de N nuevo por fijación no puede considerarse como un flujo despreciable en el balance de N en bahía San Quintín. Adicionalmente, nuestro estudio contribuye a la creciente evidencia que indica que las mediciones de las tasas de fijación de N<sub>2</sub> no deben restringirse a sistemas oligotróficos, ya que las tasas de fijación por bacterias heterotróficas, incluidas las sulfatoreductoras, en



In summary, our estimates indicate that in winter,  $N_2$  fixation may be equivalent to a third of the N lost via denitrification. This result is relevant because it indicates that the input of new N by fixation cannot be considered a negligible flux in the N budget of San Quintín Bay. Moreover, our study contributes to the growing evidence indicating that  $N_2$  fixation rate measurements should not be restricted to oligotrophic systems, since  $N_2$  fixation by heterotrophic bacteria, including sulfate-reducing bacteria, in temperate environments can contribute to reduce the uncertainty in the global oceanic N budget (Knapp 2012). In San Quintín Bay,  $N_2$  fixation in the sediments and in the phyllosphere will likely be greater during the growing season of *Z. marina* (spring and summer) than in winter, as has been reported for other sites (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000). We therefore think it is important to measure  $N_2$  fixation rates throughout the year, as well as to characterize the  $N_2$ -fixing organisms using molecular methods (see, e.g., Bentzon-Tilia et al. 2015, Newell et al. 2016).

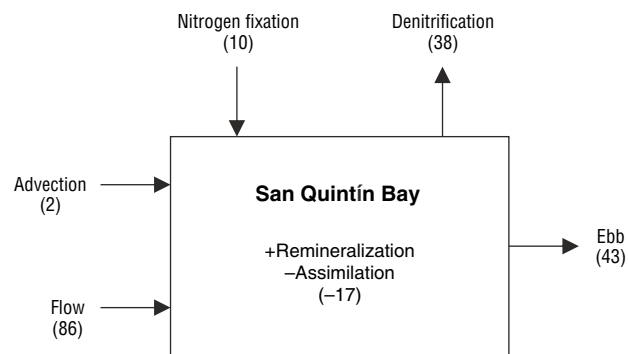
#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) through SEP-CONACYT project no. CB-2010-01-154376 headed by VFCL. JHL was supported by a PhD grant from CONACYT (no. 205987). We thank Mauricio Muñoz-Anderson, Eduardo Ortiz-Campos, Zarko Altamirano, J Edwin Morales-Torres, Alejandro Arias, and Nevía C Alfaro-Castillo for field and laboratory support, and José Zertuche-González and Francisco Delgadillo-Hinojosa for the use of laboratory facilities.

English translation by Christine Harris.

#### REFERENCES

- Aguirre-Muñoz A, Buddemeier RW, Camacho-Ibar VF, Carriquiry JD, Ibarra-Obando SE, Massey BW, Smith SV, Wulff F. 2001. Sustainability of coastal resource use in San Quintin, Mexico. *Ambio* 30(3): 142–149. <http://dx.doi.org/10.1579/0044-7447-30.3.142>
- Bentzon-Tilia M, Severin I, Hansen LH, Riemann L. 2015. Genomics and ecophysiology of heterotrophic nitrogen fixing bacteria isolated from estuarine surface water. *mBio* 6(4): e00929-15. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00929-15>
- Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ. 1997.  $N_2$  Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 139–185. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00296.x>
- Cabello-Pasini A, Muñoz-Salazar R, Ward DH. 2003. Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* at its southern end of distribution in the North Pacific. *Aquat. Bot.* 76(1): 31–47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770\(03\)00012-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770(03)00012-3)



**Figure 7.** Fluxes of dissolved inorganic N ( $\times 10^3$  mol N  $d^{-1}$ ) between San Quintín Bay, the adjacent ocean, and the atmosphere. The arrows indicate the direction of the flux. Inside the box, the plus sign represents input and the minus sign represents removal of dissolved inorganic N at the bay.

**Figura 7.** Flujos de N inorgánico disuelto ( $\times 10^3$  mol N  $d^{-1}$ ) entre bahía San Quintín, el océano adyacente y la atmósfera. Las flechas indican la dirección del flujo. Dentro de la caja, el símbolo de suma representa adición y el símbolo de resta representa remoción de N inorgánico disuelto en la bahía.

ambientes templados pueden contribuir a disminuir la incertidumbre en el balance global del N oceánico (Knapp 2012). Es probable que durante la temporada de máximo crecimiento de *Z. marina* (primavera y verano), en bahía San Quintín, la fijación de  $N_2$  en los sedimentos y en la filósfera sea mayor que durante el invierno, como ha sido reportado para otros sitios (McGlathery et al. 1998, Welsh 2000). Por lo tanto, consideramos importante realizar mediciones de las tasas de fijación de  $N_2$  a lo largo de todo el año, así como caracterizar a las comunidades de los organismos fijadores a través de métodos moleculares (ver, e.g., Bentzon-Tilia et al. 2015, Newell et al. 2016).

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) a través del proyecto SEP-CONACYT no. CB-2010-01-154376 otorgado a VFCL. JHL recibió apoyo del CONACYT a través de una beca de doctorado (no. 205987). Agradecemos a Mauricio Muñoz-Anderson, Eduardo Ortiz-Campos, Zarko Altamirano, José Edwin Morales-Torres, Alejandro Arias y Nevía Carolina Alfaro-Castillo su apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio, y a José Zertuche-González y Francisco Delgadillo-Hinojosa el acceso a sus equipos de laboratorio.

- Camacho-Ibar VF, Carriquiry JD, Smith SV. 2003. Non-conservative P and N fluxes and net ecosystem production in San Quintin Bay, Mexico. *Estuaries Coasts* 26(5): 1220–1237. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02803626>
- Capone D. 1988. Benthic nitrogen fixation. In: Blackburn T, Sorensen J. (eds.), *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments*. John Wiley & Sons, pp. 85–123.
- Capone DG. 1982. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by rhizosphere sediments of the eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 67–75. <http://dx.doi.org/10.3354/meps010067>
- Capone DG, Taylor BF. 1977. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere of *Thalassia testudinum*. *Mar. Biol.* 19–28. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00390623>
- Capone DG, Penhale PA, Oremland RS, Taylor BF. 1979. Relationship between productivity and N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation in a *Thalassia testudinum* community. *Limnol. Oceanogr.* 24(1): 117–125. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1979.24.1.0117>
- Carriquiry JD, Jorgensen P, Villaescusa JA, Ibarra-Obando SE. 2016. Isotopic and elemental composition of marine macrophytes as biotracers of nutrient recycling within a coastal lagoon in Baja California, Mexico. *Estuaries Coasts* 39(2): 451–461. <http://dx.doi.org/10.1007/s12237-015-9992-9>
- Cole LW, McGlathery KJ. 2012. Nitrogen fixation in restored eelgrass meadows. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 448: 235–246. <http://dx.doi.org/10.3354/meps09512>
- Cook PLM, Evrard V, Woodland RJ. 2015. Factors controlling nitrogen fixation in temperate seagrass beds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 525: 41–51. <http://dx.doi.org/10.3354/meps11247>
- Daesslé L, Rendón-Márquez G, Camacho-Ibar V, Gutiérrez-Galindo E, Shumilin E, Ortiz-Campos E. 2009. Geochemistry of modern sediments from San Quintin coastal lagoon, Baja California: Implication for provenance. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* 26: 117–132.
- Edmunds M, Beardall J, Hart S, Elias J, Stojkovic-Tadic. 2004. Port Phillip Channel Deepening Project: Environmental effects specialist studies. Report to Port Melbourne Corporation and Parsons Brinckerhoff 4, 46.
- Fourqurean JW, Duarte CM, Kennedy H, Marbà N, Holmer M, Mateo MA, Apostolaki ET, Kendrick GA, Krause-Jensen D, McGlathery KJ, Serrano O. 2012. Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nat. Geosci.* 5(7): 505–509. <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo1477>
- Fulweiler RW, Brown SM, Nixon SW, Jenkins BD. 2013. Evidence and a conceptual model for the co-occurrence of nitrogen fixation and denitrification in heterotrophic marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 482: 57–68. <http://dx.doi.org/10.3354/meps10240>
- Fulweiler RW, Nixon SW, Buckley BA, Granger SL. 2007. Reversal of the net dinitrogen gas flux in coastal marine sediments. *Nature* 448: 180–182. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05963>
- Gracia-Escobar MF, Millán-Núñez R, González-Silvera A, Santamaría-del-Ángel E, Camacho-Ibar VF, Trees CC. 2014. Changes in the abundance and composition of phytoplankton in a coastal lagoon during neap-spring tide conditions. *Open J. Mar. Sci.* 3: 80–100. <http://dx.doi.org/10.4236/ojms.2014.42010>
- Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968. The acetylene-ethylene assay for N(2) fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185–1207.
- Hernández-Ayón JM, Galindo-Bect MS, Camacho-Ibar V, García-Esquivel Z, González-Gómez MA, Ley-Lou F. 2004. Nutrient dynamics in the west arm of San Quintin Bay, Baja California, Mexico, during and after El Niño 1997/1998 = Dinámica de los nutrientes en el brazo oeste de Bahía San Quintín, Baja California, México, durante y después de El Niño 1997/1998. *Cienc. Mar.* 30(1A): 119–132.
- Humphries AT, Ayvazian SG, Carey JC, Hancock BT, Grabbert S, Cobb D, Strobel CJ, Fulweiler RW. 2016. Directly measured denitrification reveals oyster aquaculture and restored oyster reefs remove nitrogen at comparable high rates. *Front. Mar. Sci.* 3: 1–10. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2016.00074>
- Kellogg ML, Smyth AR, Luckenbach MW, Carmichael RH, Brown BL, Cornwell JC, Piehler MF, Owens MS, Dalrymple DJ, Higgins CB. 2014. Use of oysters to mitigate eutrophication in coastal waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 151: 156–168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2014.09.025>
- Kennedy H, Beggins J, Duarte CM, Fourqurean JW, Holmer M, Marbà N, Middelburg JJ. 2010. Seagrass sediments as a global carbon sink: Isotopic constraints. *Global Biogeochem. Cycles* 24(4): 1–8. <http://dx.doi.org/10.1029/2010GB003848>
- Knapp AN. 2012. The sensitivity of marine N<sub>2</sub> fixation to dissolved inorganic nitrogen. *Front. Microbiol.* 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00374>
- Lorenzen CJ. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12(2): 343–346. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>
- Mazarrasa I, Marbà N, Lovelock CE, Serrano O, Lavery PS, Fourqurean JW, Kennedy H, Mateo MA, Krause-Jensen D, Steven ADL, Duarte CM. 2015. Seagrass meadows as a globally significant carbonate reservoir. *Biogeosciences* 12(16): 4993–5003. <http://dx.doi.org/10.5194/bg-12-4993-2015>
- McGlathery KJ, Risgard-Petersen N, Bondo-Christensen PB. 1998. Temporal and spatial variation in nitrogen fixation activity in the eelgrass *Zostera marina* rhizosphere. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168: 245–258. <http://dx.doi.org/10.3354/meps168245>
- McRoy CP, Goering JJ, Chaney B. 1973. Nitrogen fixation associated with seagrasses. *Limnol. Oceanogr.* 18(6): 998–1002. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0998>
- Melaku Canu D, Aveytua-Alcázar L, Camacho-Ibar VF, Querin S, Solidoro C. 2016. Hydrodynamic properties of San Quintin Bay, Baja California: Merging models and observations. *Mar. Pollut. Bull.* 108(1–2): 203–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.030>
- Moriarty DJW, Iverson RL, Pollard PC. 1986. Exudation of organic carbon by the seagrass *Halodule wrightii* Aschers. And its effect on bacterial growth in the sediment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96(2): 115–126. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90237-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(86)90237-6)
- Nagel E. 2004. Nitrogen fixation in benthic microalgal mats: An important, internal source of “new” nitrogen to benthic communities in Florida Bay. MSc thesis, University of Maryland, USA, 103 pp.
- Newell RIE, Cornwell JC, Owens MS. 2002. Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on sediment nitrogen dynamics: A laboratory study. *Limnol. Oceanogr.* 47(5): 1367–1379. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1367>

- Newell RIE, Fisher TR, Holyoke RR, Cornwell JC. 2005. Influence of eastern oysters on nitrogen and phosphorus regeneration in Chesapeake Bay, USA. In: Dame R, Olenin S (eds.), *The Comparative Roles of Suspension Feeders in Ecosystems*. Springer, Netherlands, pp. 93–120.  
[http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3030-4\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3030-4_6)
- Newell SE, Pritchard KR, Foster SQ, Fulweiler RF. 2016. Molecular evidence for sediment nitrogen fixation in a temperate New England estuary. *PeerJ* 4: e1615.  
<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1615>
- O'Donohue MJ, Moriarty DJW, Mac Rae IC. 1991. Nitrogen fixation in sediments and the rhizosphere of the seagrass *Zostera capricorni*. *Microb. Ecol.* 22(1): 53–64.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02540212>
- Reynolds LK, Marino R, Muth MF, McLenaghan N, Hayn M, Tyler AC, McGlathery KJ, Howarth RW. 2015. Evidence of grazer control on nitrogen fixation by eelgrass epiphytes in a temperate coastal bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 526: 11–19.  
<http://dx.doi.org/10.3354/meps11234>
- Russell DG, Warry FY, Cook PLM. 2016. The balance between nitrogen fixation and denitrification on vegetated and non-vegetated intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 61(6): 2058–2075.  
<http://dx.doi.org/10.1002/lno.10353>
- Sandoval-Gil J, Alexandre A, Santos R, Camacho-Ibar VF. 2016. Nitrogen uptake and internal recycling in *Zostera marina* exposed to oyster farming: Eelgrass potential as a natural biofilter. *Estuaries Coasts* 39(6): 1694–1708.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12237-016-0102-4>
- Sandoval-Gil JM, Camacho-Ibar VF, Ávila-López M del C, Hernández-López J, Zertuche-González JA, Cabello-Pasini A. 2015. Dissolved inorganic nitrogen uptake kinetics and  $\delta^{15}\text{N}$  of *Zostera marina* L. (eelgrass) in a coastal lagoon with oyster aquaculture and upwelling influence. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 472: 1–13.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.06.018>
- Sarmiento J, Gruber N. 2006. *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 503 pp.
- Severin I, Stal LJ. 2008. Light dependency of nitrogen fixation in a coastal cyanobacterial mat. *ISME J.* 2(10): 1077–1088.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2008.63>
- Severin I, Stal LJ. 2010. Spatial and temporal variability in nitrogenase activity and diazotrophic community composition in coastal microbial mats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 417: 13–25.  
<http://dx.doi.org/10.3354/meps08759>
- Sharp Z. 2007. *Principles of Stable Isotope Geochemistry*. 1st ed. Pearson Prentice Hall, USA.
- Udy JW, Dennison WC, Lee Long WJ, McKenzie LJ. 1999. Responses of seagrass to nutrients in the Great Barrier Reef, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 185: 257–271.  
<http://dx.doi.org/10.3354/meps185257>
- Ward DH, Morton A, Tibbitts TL, Douglas DC, Carrera-González E. 2003. Long-term change in eelgrass distribution at Bahía San Quintín, Baja California, Mexico, using satellite imagery. *Estuaries* 26(6): 1529–1539.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02803661>
- Welsh DT. 2000. Nitrogen fixation in seagrass meadows: Regulation, plant–bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecol. Lett.* 3(1): 58–71.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00111.x>
- Welsh DT, Bourgues S, Wit R, Herbert RA. 1996a. Seasonal variations in nitrogen-fixation (acetylene reduction) and sulphate-reduction rates in the rhizosphere of *Zostera noltii*: Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Mar. Biol.* 619–628.
- Welsh DT, Wellsbury P, Bourgues S, Wit R, Herbert RA. 1996b. Relationship between porewater organic carbon content, sulphate reduction and nitrogen fixation (acetylene reduction) in the rhizosphere of *Zostera noltii*. *Hydrobiologia* 329: 175–183.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00034556>

*Received November 2016,  
 accepted December 2016.*