

MEMORIA DO PROXECTO DE INVESTIGACIÓN**Máximo 45 puntos**

TÍTULO DO PROXECTO DE INVESTIGACIÓN
Fijación de nitrógeno y flujo difusivo en el NO de la Península Ibérica (NICANOR)
PALABRAS CLAVES Fijación de nitrógeno, turbulencia, flujos difusivos, sistema de afloramiento del NO Peninsular
CALIDADE CIENTÍFICO-TÉCNICA DO PROXECTO (máximo 30 puntos)
<p>CONTIDO DO PROXECTO: RESUMO</p> <p>A pesar de que el nitrógeno molecular constituye la forma más abundante de nitrógeno, únicamente un número muy reducido de organismos es capaz de utilizar este reservorio mediante el proceso denominado fijación de nitrógeno. Constituye, por ello, el principal nutriente limitante de la productividad de los ecosistemas tanto marinos como terrestres. La fijación de nitrógeno se consideró inicialmente una fuente de entrada menor en el océano, atribuida principalmente a organismos del género <i>Trichodesmium</i>, que habitan regiones con temperaturas superficiales $>20^{\circ}\text{C}$ y condiciones de elevada estabilidad de la columna de agua. El descubrimiento de otros grupos de diazótrofos marinos ha evidenciado que el rango de ambientes en los cuales la fijación de nitrógeno puede ser relevante es mucho más amplio de lo que se pensó en un principio. Trabajos recientes evidencian la actividad de organismos fijadores de nitrógeno en regiones relativamente ricas en nitrógeno, como son el Ártico Canadiense, el canal de la Mancha, la pluma del río Mekong en el Mar de China, el Atlántico ecuatorial, o la costa NE de Estados Unidos. Además, un estudio realizado en Cabo Silleiro en verano de 2009 describió tasas de fijación de nitrógeno de magnitud similar a la región subtropical. En esta propuesta planteamos determinar la variabilidad estacional en las tasas de fijación de N_2, su relevancia biogeoquímica como fuente de entrada de nitrógeno nuevo en el sistema, así como la identificación de los grupos principales de organismos responsables de esta actividad en la plataforma del sistema de afloramiento gallego. Para ello proponemos una aproximación con un elevado grado de multidisciplinaridad que combina experimentos de tasas de fijación de nitrógeno, observaciones de turbulencia de microestructura, e identificación del gen <i>nifH</i>. A pesar de que, en la actualidad, la fijación biológica de nitrógeno probablemente representa una entrada menor de nitrógeno en este sistema, su cuantificación es crucial para entender el funcionamiento del ciclo del nitrógeno a escala global. A escala local, ante un océano amenazado por el cambio global, este estudio servirá como base para determinar cambios en la importancia relativa de los diferentes mecanismos que controlan la entrada de nitrógeno nuevo en ecosistema, proceso que en última instancia determina la productividad de recursos explotables en esta región.</p>
<p>CONTIDO DO PROXECTO: ESTADO DA ARTE DA INVESTIGACIÓN PROPOSTA</p> <p>La fijación de nitrógeno molecular: organismos implicados</p> <p>El nitrógeno molecular (N_2) constituye aproximadamente las tres cuartas partes de la atmósfera y es la forma de nitrógeno más abundante en el medio marino. Sin embargo, constituye un factor principal de control de la producción primaria, tanto en ecosistemas marinos como terrestres (Falkowski 1997). Esto es debido a que únicamente un número muy reducido de organismos es capaz de utilizar este reservorio, mediante el proceso denominado fijación de nitrógeno. Este proceso implica la conversión biológica de N_2</p>

en amonio y requiere un suministro elevado de energía y poder reductor (Paerl and Zehr 2000).

El balance entre las ganancias por fijación biológica de nitrógeno y las pérdidas por desnitrificación y reacción anammox controla la cantidad de nitrógeno reactivo existente en la biosfera (Ward 2013), y por lo tanto juega un papel principal en la regulación del ciclo del carbono y el clima (Gruber and Galloway 2008). Además, la fijación de nitrógeno juega un papel directo en la captación de dióxido de carbono atmosférico por parte del océano. Esto es debido a que el nitrógeno introducido mediante este proceso estimula la fijación fotosintética de carbono inorgánico disuelto en aguas superficiales, y posteriormente la retirada de carbono hacia el océano profundo mediante el proceso de la bomba biológica. Por el contrario, el aporte de nitrógeno desde aguas profundas, como sucede durante el proceso del afloramiento, va acompañado de carbono inorgánico disuelto, que aumenta la presión parcial de este gas en superficie, y por lo tanto reduce su captación desde la atmósfera (Michaels 2001).

El complejo enzimático responsable de la fijación de nitrógeno está constituido por dos metaloproteínas: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa posee una estructura muy conservada, existiendo poca variabilidad entre las especies que la sintetizan. Por ello, la identificación del gen que codifica esta proteína, el *nifH*, constituye una herramienta molecular que se utiliza frecuentemente en la identificación de especies fijadoras de nitrógeno en sistemas marinos (Paerl and Zehr 2000).

En el océano existe una amplia variedad de organismos, denominados diazótrofos, con capacidad para realizar el proceso de la fijación de nitrógeno (Karl et al. 2002). Se trata de organismos procariotas que pertenecen a los dominios *Arquea* y *Bacteria*. A pesar de esta diversidad, la mayor parte de los trabajos realizados en las últimas décadas se han centrado en el estudio de representantes del género *Trichodesmium* (Capone et al. 2005; Coles et al. 2004; Fernández et al. 2010; Fernández et al. 2012; Hood et al. 2004; Moore et al. 2009; Sanudo-Wilhelmy 2001). Este género está constituido por cianobacterias filamentosas, con capacidad para formar colonias, que aparecen con frecuencia en regiones tropicales y subtropicales donde la temperatura del agua supera los 20°C (Capone et al. 1997). Entre las razones que han motivado el interés por este grupo se incluye su capacidad para formar extensas proliferaciones, visibles incluso desde el espacio, y el hecho de que sean observables a simple vista, lo que facilita su identificación y manipulación. A partir de estos estudios se estableció la visión tradicional de que la fijación de nitrógeno es un proceso que ocurre principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde el nitrógeno en superficie es escaso y la temperatura superficial del agua elevada.

Sin embargo, recientemente se han descubierto cianobacterias unicelulares de vida libre (Zehr et al. 1998), que atendiendo a la diversidad del gen *nifH* se clasifican en tres grupos pertenecientes al nano- y picoplancton: el grupo A (UCYN-A), el grupo B (UCYN-B) y el grupo C (UCYN-C). Las cianobacterias del grupo A tienen un diámetro menor de 1 µm, son fotoheterótrofos y probablemente simbioses, dado que necesitan una fuente externa de carbono orgánico (Zehr 2011). Los representantes del grupo B, con un tamaño ligeramente superior al grupo A (3-8 µm), son fotoautótrofos y los únicos que se han logrado aislar y cultivar de forma satisfactoria. En la actualidad se dispone de 10 cepas del grupo UCYN-B, procedentes de los océanos Atlántico y Pacífico, incluidas en el género *Crocosphera* (Webb et al. 2009). Finalmente, el grupo C se relaciona con el género de cianobacterias bentónicas *Cyanothece*.

Además, en regiones costeras, principalmente en regiones de estuarios y el Mar Báltico, son abundantes las cianobacterias filamentosas que poseen células especializadas en la fijación de nitrógeno, denominadas heterocistes (Zehr 2011).

Evidencias de fijación de nitrógeno en regiones ricas en nitrógeno

El descubrimiento reciente de otros grupos de diazótrofos marinos ha evidenciado que el rango de ambientes en los cuales la fijación de nitrógeno puede ser relevante es mucho más amplio de lo que se pensó inicialmente (Moisander et al. 2010). Esto podría significar que las tasas globales de fijación de nitrógeno, basadas en modelos matemáticos y datos de campo en su mayoría restringidos a ambientes tropicales, podrían estar fuertemente subestimadas (Codispoti 2007; Deutsch et al. 2007; Gruber and

Sarmiento 1997).

Estudios recientes evidencian la presencia del gen *nifH* en regiones templadas de los océanos Pacífico (Church et al. 2005; Needoba et al. 2007) y Atlántico (Voss et al. 2004), e incluso en las regiones más frías del Ártico Canadiense (Blais et al. 2012). Por otro lado, se ha detectado actividad de la fijación de nitrógeno en aguas relativamente enriquecidas en nitrógeno en el Atlántico NE subtropical (Voss et al. 2004), en el Atlántico ecuatorial bajo la influencia de eventos de afloramiento (Subramaniam et al. 2013), en el canal de la Mancha (Rees et al. 2009), y en la pluma del río Mekong en el Mar de China (Grosse et al. 2010).

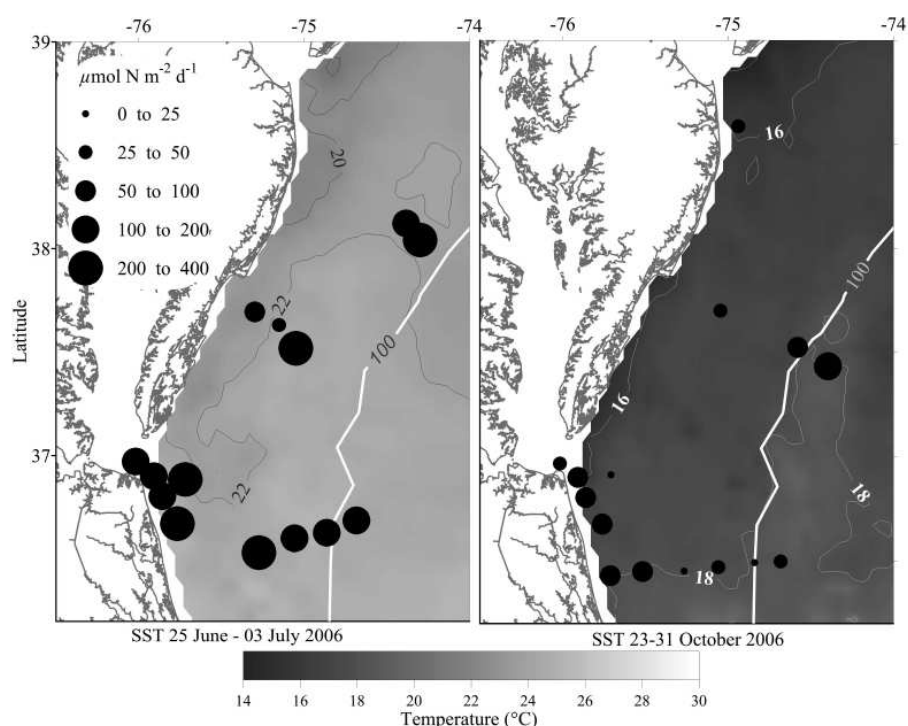


Figura 1. Tasas de fijación de nitrógeno medidas en la costa este de EEUU entre las bahías de Chesapeake y Delaware en julio (A) y octubre-noviembre de 2006 (B) superpuestas en un mapa de temperatura superficial (Mulholland et al. 2012).

Varios estudios realizados en regiones costeras describen que estas regiones se caracterizan por tasas de fijación de nitrógeno indetectables o insignificantes (Conley et al. 2009; Howarth et al. 1988; Zehr and Paerl 2008). Sin embargo, estudios de diversidad genética basados en el gen *nifH* argumentan que la actividad de la fijación de nitrógeno en regiones costeras, como por ejemplo la Bahía de Chesapeake en la costa este de Estados Unidos, podría ser más elevada que en regiones de océano abierto (Jenkins et al. 2004; Short et al. 2004; Zehr et al. 2003). Un estudio reciente realizado en la plataforma continental de la costa NE de Estados Unidos describe que cianobacterias unicelulares del grupo A son las principales responsables de las tasas elevadas de fijación de nitrógeno medidas en esta región (Mulholland et al. 2012) (Figura 1). Estos valores son comparables, e incluso más elevados, que los valores descritos en regiones oceánicas (véase Tabla 8 en Mulholland et al. (2012)). Por otro lado un estudio realizado en verano del 2009 en Cabo Silleiro, una región afectada por el afloramiento ibérico, describe tasas de fijación de N_2 detectables y de magnitud similar a las obtenidas en la región subtropical (Benavides et al. 2011). Más del 70% de la fijación de N_2 medida en este estudio en la plataforma gallega correspondió a organismos de tamaño inferior a $10 \mu m$, identificados como cianobacterias pertenecientes al grupo A.

Cuantificación de la relevancia biogeoquímica de la fijación de nitrógeno

El estudio de la relevancia biogeoquímica del proceso de la fijación de N_2 , como un mecanismo de fertilización de la capa superficial iluminada del océano, requiere la cuantificación de este proceso en términos relativos frente a otras posibles entradas de nitrógeno en el sistema. Además de la fijación de N_2 , el suministro de nutrientes hacia la capa eufótica se realiza a través de una variedad de mecanismos como son la difusión a través de la termoclina, la turbulencia de mesoescala y submesoescala (Mouriño-Carballido and McGillicuddy 2006; Mourino et al. 2005; Mouriño-Carballido 2009; Oschlies and Garçon 1998), los procesos de afloramiento (Pitcher et al. 2010), el transporte lateral de nutrientes orgánicos e inorgánicos desde las regiones circundantes productivas (Torres-Valdes et al. 2009; Williams and Follows 1998), y la deposición atmosférica (Duce et al. 2008; Mouriño-Carballido et al. 2012). La difusión vertical representa uno de los principales mecanismos en grandes extensiones de océano abierto (Mouriño-Carballido et al. 2011), y durante los períodos de estratificación estival en las regiones costeras.

La cuantificación del transporte de nutrientes mediante difusión turbulenta requiere una estimación de la magnitud de la difusividad vertical (K_z) (Fernández-Castro et al. 2013). Las dificultades metodológicas implícitas en la cuantificación de este proceso han motivado que, con frecuencia, a la hora de calcular el transporte difusivo de nutrientes se utilicen valores constantes de K_z (Capone et al. 2005), y determinaciones mediante parametrizaciones empíricas (Fernández-Castro et al. under review; Planas et al. 1999). Sin embargo, actualmente la obtención de estimas directas de K_z se ve facilitada gracias a la comercialización de diferentes instrumentos que permiten obtener medidas directas de turbulencia de pequeña escala. Entre estos equipos se encuentran los perfiladores MSS (Prandke and Stips 1998), TurboMap (Wolk et al. 2002) y PME (Stevens et al. 1999).

El sistema de afloramiento del NO de la Península Ibérica

El sistema de afloramiento del noroeste africano se extiende a lo largo de la costa oeste de la Península Ibérica, formando uno de los ecosistemas marinos de mayor extensión a nivel global (Longhurst 2007). Esta región se caracteriza por una elevada producción pesquera y marisquera con importantes repercusiones económicas para la región (Sherman and Hempel 2009). Los niveles elevados de producción primaria que caracterizan esta región se relacionan con las entradas de nutrientes asociadas con los eventos de afloramiento, y su amplificación debido a los procesos de remineralización dentro de las rías (Alvarez-Salgado et al. 2002; Bode et al. 1996). En esta región las condiciones favorables para el afloramiento ocurren entre abril y septiembre (Nogueira et al. 1997). Los meses de otoño se caracterizan generalmente por condiciones favorables para el hundimiento, que frecuentemente va acompañado de proliferaciones de fitoplancton tóxico (Figueiras et al. 2006; Pitcher et al. 2010).

Los efectos del afloramiento sobre la comunidad planctónica disminuyen a lo largo de la costa gallega hacia el norte, debido a que los procesos de remineralización tienen mayor intensidad en las rías de mayor tamaño, situadas en la parte sur (Bode et al. 2011; Bode et al. 2004). El efecto del afloramiento sobre la comunidad planctónica es más importante en el interior de las rías, donde normalmente los máximos de biomasa y producción fitoplanctónica se observan coincidiendo con las épocas de afloramiento (Cermeño et al. 2006; Moncoiffe et al. 2000; Tilstone et al. 1999). A excepción de las regiones afectadas por los filamentos de afloramiento (Alvarez-Salgado et al. 2007), el exterior de las rías se caracteriza por estratificación térmica y valores bajos de biomasa y producción fitoplanctónica durante la época estival (Bode et al. 2011). En general, la parte externa de las rías presenta un ciclo estacional característico de regiones templadas, con un primer máximo de producción primaria en abril y un segundo pico de menor intensidad en otoño (Bode et al. 2011).

El proyecto RADIALES-11 (seRIes temporAlEs De oceanografía en el norte de ESpaña, <http://www.seriestemporales-ieo.com/>) constituye la iniciativa multidisciplinar de investigación en series temporales oceanográficas en España más longeva. Iniciado en 1990, incluye muestreos mensuales en Vigo, A Coruña, Cudillero, Gijón y Santander. Los muestreos realizados de forma regular han permitido obtener información acerca de diferentes escalas de variabilidad existentes en las características hidrográficas, la

composición química del agua de mar, así como la composición y actividad de diferentes constituyentes del plancton marino (Bode et al. 2012; Bode et al. 2011; Somavilla et al. 2013; Valdés et al. 2007).

Sin embargo, por el momento la única información disponible acerca de la posible relevancia del proceso de la fijación de nitrógeno en esta región se limita al estudio realizado por Benavides et al. (2011), en el cual se describen tasas de fijación de N_2 obtenidas en ocho estaciones realizadas en la parte externa de la Ría de Vigo (Cabo Silleiro). Dado el actual desconocimiento acerca de la actividad de organismos diazótrofos en el sistema de afloramiento del NO de la Península Ibérica, en esta propuesta planteamos determinar la variabilidad estacional en las tasas de fijación de N_2 , su relevancia biogeoquímica como fuente de entrada de nitrógeno en el sistema, así como la identificación de los principales grupos de organismos responsables de esta actividad. Para ello proponemos una aproximación con un elevado grado de multidisciplinaridad, que combina medidas experimentales de tasas de fijación de nitrógeno, observaciones de turbulencia de microestructura, e identificación del gen *nifH*.

CONTIDO DO PROXECTO: OBXECTIVOS DO PROXECTO

Los argumentos expuestos en el apartado anterior nos llevan a formular las siguientes **hipótesis** de trabajo:

H1. En la plataforma del sistema de afloramiento del NO de la Península Ibérica existe una actividad detectable del proceso de la fijación biológica de nitrógeno.

H2. En este sistema los aportes de nitrógeno asociados a la fijación de nitrógeno representan una entrada menor en comparación con las entradas mediante procesos de difusión turbulenta.

H3. Las cianobacterias unicelulares pertenecientes al grupo A son las principales responsables de la actividad de la fijación biológica de nitrógeno existente en esta región.

Para la verificación de estas hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos** particulares:

O1. Cuantificar las tasas de fijación de nitrógeno en dos fracciones de tamaño del plancton ($< y > 10 \mu m$) en diferentes situaciones hidrográficas características del ciclo estacional en la plataforma del NO de la costa gallega (Ría de A Coruña).

O2. Caracterizar la variabilidad estacional en los procesos de difusividad vertical (Kz).

O3. Cuantificar la importancia relativa de la fijación de nitrógeno frente al transporte por difusión vertical como mecanismo de entrada de nitrógeno nuevo hacia la capa fótica.

O4. Identificar los principales organismos responsables de la actividad de la fijación de nitrógeno en esta región.

CONTIDO DO PROXECTO: INTERESE PARA O AVANCE DO COÑECEMENTO E DA SOCIEDADE

El NO de la Península Ibérica se caracteriza por una elevada producción pesquera y marisquera, debido a las condiciones favorables para el afloramiento que dominan esta región durante el periodo entre abril y septiembre (Nogueira et al. 1997). Galicia produce anualmente aproximadamente 250.000 toneladas de mejillón, lo que representa alrededor del 15% de la producción mundial (Gómez-Gesteira et al. 2011). Esta riqueza se sustenta en último término en la disponibilidad de nitrógeno, principalmente en forma de nitrato, que constituye el principal nutriente limitante para la producción primaria en esta región (Alvarez-Salgado et al. 2002).

En este sistema la fijación biológica de nitrógeno probablemente representa una entrada menor de nitrógeno, en comparación con los aportes asociados a los eventos de afloramiento. Sin embargo, la determinación de la importancia relativa de los diferentes mecanismos es crucial dado que se espera que el cambio global provoque alteraciones de sentidos opuestos en ambos procesos.

Se ha sugerido que el calentamiento global conducirá a una intensificación de los procesos de afloramiento costero (Bakun 1990). Sin embargo, el análisis de variables climatológicas indica que el afloramiento ibérico

se ha debilitado en las últimas tres décadas, debido a un incremento de la temperatura superficial (Pérez et al. 2010). Asociado a este debilitamiento se ha observado una disminución en la tasa de renovación de las rías, que conlleva un incremento de la estratificación, y una disminución de la productividad biológica. Por otro lado, estudios recientes indican que el incremento de temperatura y concentración de CO₂ previsto en los escenarios de cambio global podría incrementar las tasas de fijación de nitrógeno y el crecimiento de organismos diazótrofos, tanto coloniales como unicelulares (Hutchins et al. 2009). Esto implicaría que la importancia biogeoquímica del proceso de la fijación de nitrógeno, en términos relativos, podría incrementarse en un océano futuro más caliente y más ácido.

El balance entre los procesos de fijación de nitrógeno y desnitrificación determina la cantidad de nitrógeno reactivo que hay en la biosfera, y por lo tanto juega un papel principal en la regulación del ciclo del carbono y del clima (Gruber and Galloway 2008). En la actualidad existe un intenso debate acerca de la magnitud de ambos procesos, así como de los mecanismos de regulación (Codispoti 2007). La fijación de nitrógeno se consideró inicialmente una fuente de entrada menor en el océano, limitada a regiones con temperaturas superficiales >20°C y condiciones de elevada estabilidad en la columna de agua (Capone et al. 2005). Sin embargo, el número creciente de estudios realizados en la última década demuestran que este proceso es más importante, y tiene una cobertura espacial mayor, de lo que se pensaba inicialmente (Benavides et al. 2011; Blais et al. 2012; Church et al. 2005; Grosse et al. 2010; Moisander et al. 2010; Mulholland et al. 2012; Needoba et al. 2007; Rees et al. 2009; Subramaniam et al. 2013; Voss et al. 2004). Por lo tanto, a pesar de que en el océano actual la fijación de nitrógeno probablemente representa una fuente menor de entrada de nitrógeno en regiones costeras, la cuantificación de este proceso es de vital importancia a la hora de entender el funcionamiento global del ciclo del nitrógeno y su papel en la regulación del clima.

En gran parte debido a las dificultades metodológicas para obtener medidas de turbulencia, en la actualidad existe un gran desconocimiento acerca de la magnitud de los procesos de mezcla en el océano. Este proceso juega un papel clave en el transporte de propiedades en el océano, constituyendo uno de los parámetros que tienen más incertidumbre en los modelos de circulación del océano, y por lo tanto en las predicciones del funcionamiento del océano ante escenarios de cambio en el futuro (Ferrari 2011). Hace más de cuatro décadas, en su artículo *"Abissal Recipes"*, Walter Munk (1966) cuantificó por primera vez que la tasa de mezcla abisal necesaria para mantener la estratificación en el océano es del orden de 1 cm² s⁻¹. Este valor es un orden de magnitud más pequeño que las estimas sugeridas por observaciones directas (Wunsch and Ferrari 2004). En un trabajo posterior, *"Abissal Recipes II"*, Munk y Wunsch (1998) estimaron que más de la mitad de la energía necesaria para generar los niveles de mezcla oceánicos proceden de la disipación de la energía de las mareas al interactuar con la plataforma continental. Sin embargo, estas estimas están sujetas a un nivel de incertidumbre elevado, debido a la escasez de observaciones de tasas de disipación de energía cinética en estas regiones. Por lo que nosotros sabemos, los únicos datos de turbulencia de microestructura publicados en la plataforma del NO de la Península Ibérica corresponden al estudio realizado en junio y agosto de 1998 por Sherwin et al. (2002). Por lo tanto, este proyecto servirá además para incrementar nuestro conocimiento acerca de la magnitud y la variabilidad estacional de los procesos de mezcla en las regiones costeras, y en concreto en el sistema de afloramiento ibérico.

Dada la complejidad de integrar en un mismo estudio técnicas de disciplinas muy dispares, la mayor parte de los trabajos realizados hasta el momento se centran en estudiar el proceso de la fijación de nitrógeno desde una perspectiva molecular (Zehr et al. 2001), fisiológica (Levitan O. et al. 2007), o bien ecológica (Fernández et al. 2010). De forma reciente se han utilizado medidas de microestructura para cuantificar la relevancia biogeoquímica del proceso de la fijación de N₂ (Bonnet et al. 2011; Liu et al. 2013; Mourino-Carballido et al. 2011). Sin embargo, por el momento no se han publicados estudios que integren la cuantificación biogeoquímica del proceso, mediante la comparación con la entrada de nitrógeno por difusión vertical, y la identificación de los organismos responsables mediante técnicas de biología molecular. Este proyecto, permitirá por lo tanto avanzar en el conocimiento de la actividad de los organismos fijadores de N₂ desde una perspectiva altamente multidisciplinar.

CONTIDO DO PROXECTO: PLAN DE DIFUSIÓN E EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

Los últimos 6 meses del proyecto se dedicarán a la difusión de los resultados obtenidos (véase cronograma). Dado que la investigación planteada constituye un tema de gran relevancia y actualidad se prevé la publicación de los resultados en revistas internacionales de prestigio, con los factores de impacto más altos en los campos de la ecología, la oceanografía y la biogeoquímica (por ejemplo *Limnology and Oceanography*, *Journal of Geophysical Research*, *Geophysical Research Letters*, *Deep-Sea Research I*, *Marine Ecology Progress Series*), así como la presentación de los mismos en congresos nacionales e internacionales. La capacidad de los miembros del equipo para alcanzar este objetivo se pone de manifiesto por la calidad de los trabajos publicados.

Al margen de la publicación de los resultados de investigación a través de los canales científicos habituales (publicaciones en revistas científicas y contribuciones a congresos científicos), se realizará un esfuerzo por lograr que los resultados del proyecto sean accesibles a un sector más amplio de la sociedad, haciéndola de este modo partícipe de la importancia de la inversión en investigación e incrementando la cultura científica. Para ello se realizará una página web donde se pondrán a disposición de la sociedad los principales resultados del proyecto. Además, durante las diferentes fases de ejecución se difundirán los resultados del proyecto a través del ciclo de seminarios organizados por el grupo de Oceanografía Biológica, abiertos a toda la comunidad universitaria. Por otro lado, al final del proyecto se realizará una reunión, abierta a toda la comunidad, con el fin de abrir un foro de discusión acerca de las principales conclusiones de este estudio.

Además los miembros del equipo mantienen una intensa actividad formativa, tanto en lo que se refiere a la preparación de estudiantes para el acceso al mercado laboral, como en la formación de investigadores. Como parte de su actividad docente imparten diferentes asignaturas de grado y máster relacionadas con procesos ecológicos en el medio marino (Tabla 6). En el contexto del proyecto, se ofertará una línea de investigación para trabajos de fin de grado y proyectos de master.

Tabla 6. Actividad docente de los miembros del equipo de UVIGO durante el curso 2012/2013

RESPONSABLE	MATERIA	CURSO
Beatriz Mouriño	Ecología	2º Grado Ciencias Ambientales (UVIGO)
Beatriz Mouriño Emilio Marañón	Oceanografía de Ecosistemas	Master en Oceanografía (UVIGO)
Beatriz Mouriño	Análisis de datos y Modelado en Oceanografía Biológica	Master en Oceanografía (UVIGO)
Emilio Marañón	Oceanografía Biológica II	3º Grado Ciencias del Mar (UVIGO)
Emilio Marañón	Suelos, Medio Acuático y Clima	3º Grado Biología (UVIGO)

VIABILIDADE DO PROXECTO DE INVESTIGACIÓN (máximo 15 puntos)**VIABILIDADE DO PROXECTO: METODOLOXÍA****Muestreo**

Este proyecto plantea la realización de ocho muestreos en la parte externa de la Ría de A Coruña aprovechando los muestreos mensuales que se realizan de forma rutinaria en el marco del proyecto RADIALES-11 (<http://www.seriestemporales-ieo.com/>). Las ocho salidas cubrirán diferentes condiciones hidrográficas que caracterizan esta región a lo largo del ciclo estacional: mezcla invernal, proliferación de primavera, afloramiento estival, estratificación estival, transición verano-otoño y transición otoño-invierno. El proyecto RADIALES-11 incluye la realización de un transecto perpendicular a la costa (ver figura 2), situándose la estación más externa a una profundidad aproximada de 80 m (St. 2).

Se prevé la realización de este estudio en la estación 2, donde se espera una entrada menor de otras fuentes de nitrógeno al sistema, como podrían ser los aportes continentales. El estudio se plantea en la Ría

de A Coruña por varios motivos. En primer lugar debido a su localización más al norte, está sujeta a una menor influencia del proceso de regeneración de nutrientes asociado al afloramiento (Alvarez-Salgado et al. 2002; Bode et al. 2011; Bode et al. 2004), lo que podría implicar una mayor contribución, en términos relativos, de las entradas de nitrógeno asociadas al proceso de la fijación. Por otro lado, entre las variables que se miden de forma rutinaria se incluye información acerca de la estructura de tamaños, y la composición y actividad de diferentes componentes del plancton microbiano que serán de gran utilidad a la hora de interpretar nuestros resultados. En concreto el proyecto RADIALES-11 nos proporcionará datos de concentración de nutrientes inorgánicos, clorofila-a, y producción primaria. Por último, en el contexto del proyecto HERCULES ("*Variabilidade hidrodinámica e do plancto mariño a curta escala na plataforma galega: eventos de afloramento no Golfo Ártabro*", INCITE 09MMA027604PR, IP: Manuel Ruiz) hemos obtenido medidas de turbulencia de microestructura en los meses de verano en esta zona (Ruíz-Villarreal et al. 2011) que servirán para poner en contexto los resultados obtenidos en este proyecto.

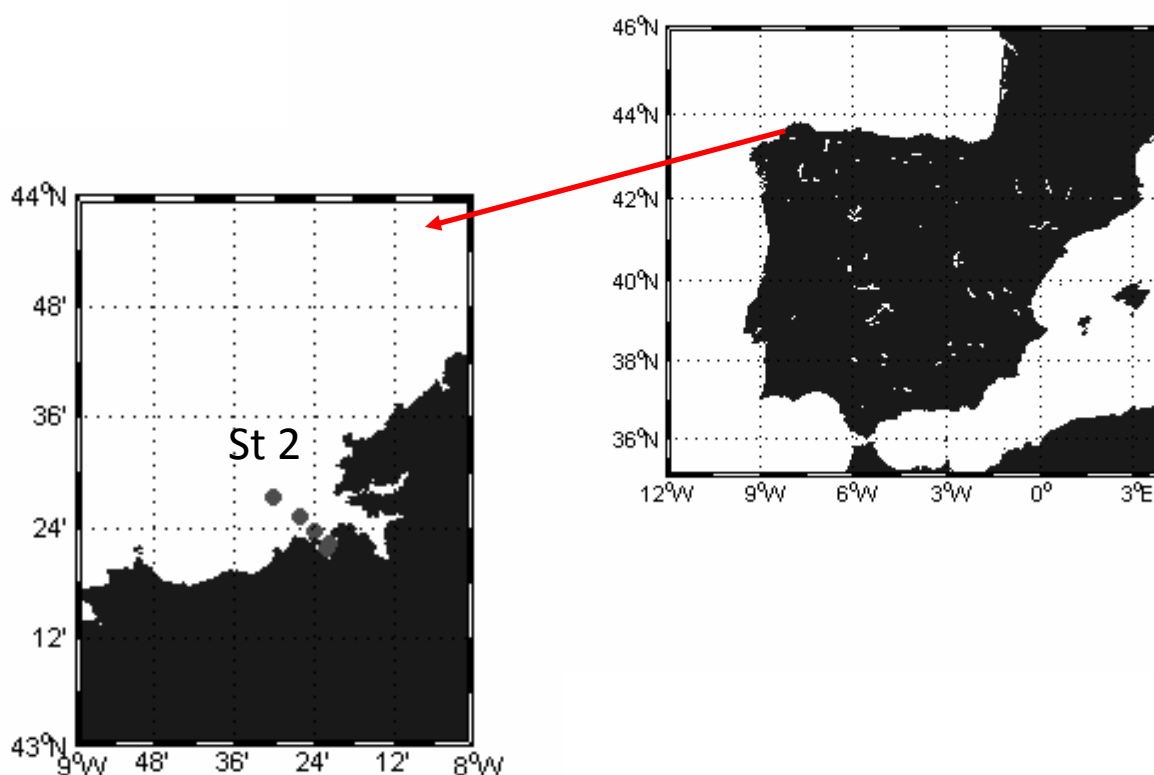


Figura 2. Mapa de la zona de muestreo y ubicación aproximada de las estaciones que se muestrean de forma rutinaria en el marco del proyecto RADIALES-11. La estación 2, situada a ~80 m de profundidad, corresponde a la localización donde se prevé realizar este estudio.

Determinación de las tasas de fijación de N_2

La estimación de las tasas de fijación de N_2 de la comunidad planctónica se realizará mediante la técnica de incorporación del $^{15}N_2$ descrita por Montoya et al. (1996) y modificada por Rees et al. (2009). En cada estación se tomarán muestras de tres profundidades (superficie, intermedia y máximo profundo de clorofila). Para determinar la abundancia natural de ^{15}N en la materia orgánica particulada, en cada profundidad se tomará una muestra inicial de 2 l. que se filtrará inmediatamente a través de un filtro GF/F de 25 mm. Además se llenarán completamente, sin presencia de aire, tres réplicas de 2 l. en botellas de policarbonato. A cada botella se le inyectarán 2 ml de $^{15}N_2$ (98 atom%, SerCon). Las réplicas se incubarán durante un periodo de 24 horas simulando las condiciones de luz y temperatura en las profundidades de origen. Las réplicas se filtrarán al final de la incubación a través de filtros GF/F de 25 mm, que se analizarán

mediante espectrometría de masas en el servicio de Apoyo a la investigación de la Universidad de A Coruña. Una explicación más detallada de los métodos, así como del cálculo de las tasas de fijación de N_2 , se incluye en Fernández et al. (2010).

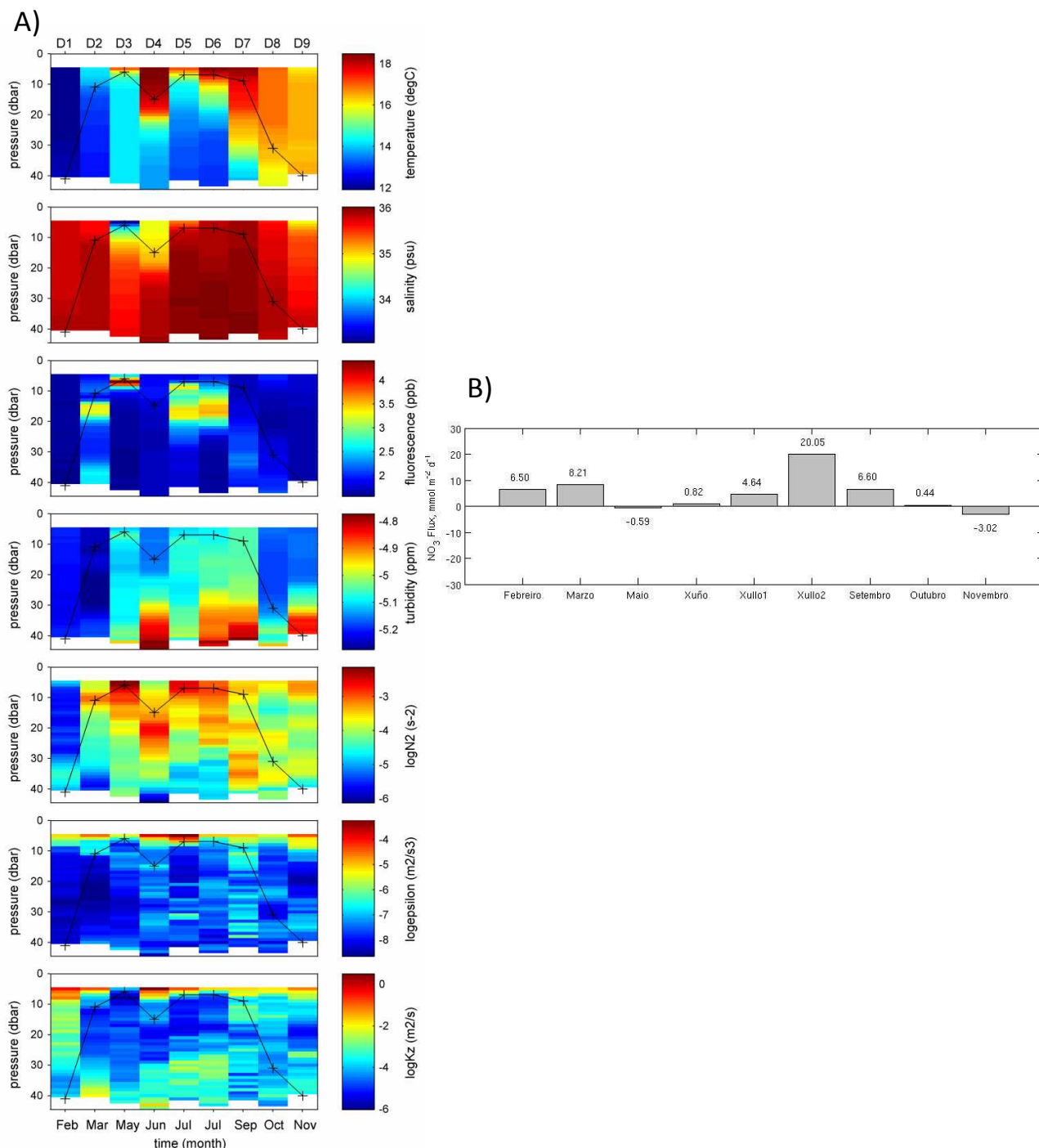


Figura 3A. Variables obtenidas por el perfilador de microestructura a lo largo de un estudio estacional realizado en la Ría de Vigo durante 2012. La línea negra indica la profundidad de la capa de mezcla. N es la frecuencia de Brünt-Väissälä; ϵ , tasa de disipación de energía cinética turbulenta y K_z , difusividad vertical. B) Aporte de nitrato mediante difusión vertical calculado a través de la profundidad de 25 m en la misma estación.

Estudios recientes indican que el método del trazador isotópico estable para la determinación de la fijación de N_2 subestima el proceso, debido principalmente al lento e incompleto equilibrio entre la muestra de agua y el $^{15}N_2$ añadido como burbuja de gas (Grosskopf et al. 2012; Mohr et al. 2010; White 2012; Wilson et al. 2012). Dicha subestimación es particularmente importante cuando se realizan incubaciones de corta duración, pero se reduce notablemente cuando la incubación dura 24 horas (Mohr et al. 2010). Estas observaciones han motivado un interés creciente por parte de la comunidad científica para establecer un nuevo protocolo que minimice el problema de la subestimación. Este protocolo se encuentra actualmente en fase de discusión, y entre las alternativas propuestas se incluye la adición a las incubaciones de una alícuota de agua de mar enriquecida con $^{15}N_2$. En este proyecto tenemos previsto realizar una intercalibración de ambos métodos utilizando las muestras superficiales obtenidas en las ocho salidas.

Determinación de turbulencia de microestructura

A partir de un perfilador de microestructura (MSS, ISW Wassermesstechnik; (Prandke and Stips 1998)) se obtendrán medidas de tasas de disipación de energía cinética turbulenta. El perfilador está equipado con dos sensores de microestructura de cizalla (tipo PNS98 microestructura), un sensor de microestructura de temperatura, una sonda CTD de alta precisión, así como un sensor para medir la aceleración horizontal del perfilador. Los flujos difusivos verticales de nutrientes se calcularán a partir del producto del coeficiente de difusión vertical (K_z) y el gradiente vertical de la concentración de nutrientes, donde K_z se calcula a partir de la fórmula propuesta por Osborn (1980).

Las medidas de turbulencia de microestructura realizadas por nuestro grupo de investigación a lo largo del año 2012 en la Ría de Vigo muestran que los eventos de afloramiento (junio-julio) provocan un aumento de la difusividad vertical en la parte inferior de la columna de agua (Figura 3A). Esta intensificación en los niveles de mezcla provoca un incremento en el transporte difusivo de nitrato hacia la capa fótica (Figura 3B). Estos resultados, obtenidos en el marco del proyecto DISTRAL (Dispersal, neutral models and the assembly of marine microbial plankton communities, IP: Pedro Cermeño), indican que la cuantificación de la mezcla vertical puede ser de gran utilidad a la hora de determinar la relevancia biogeoquímica del proceso de la fijación de nitrógeno, incluso en regiones en las cuales el transporte horizontal juega un papel principal, como son los sistemas costeros (Lucas et al. 2011; Scotti and Pineda 2004).

Determinación de la abundancia de fijadores de nitrógeno mediante PCR cuantitativa

Para la determinación de la abundancia de fijadores de nitrógeno, se filtrarán 1-2 l. de agua de mar sobre un filtro de policarbonato de 0.2 μm . Los filtros se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservarán a $-80\text{ }^{\circ}C$ hasta su análisis. Para la extracción de ADN a partir de los filtros se utilizará un kit comercial. La PCR (Proteína C reactiva) cuantitativa se realizará mediante la utilización de tres pares de cebadores para la detección del gen *nifH* de diazotrofos unicelulares, *Trichodesmium sp.* y de asociaciones *Richelia-Hemialulus* (Mulholland et al 2012).

Paloma Chouciño, responsable de esta actividad, posee una amplia experiencia en diversas técnicas de biología molecular, adquiridas tanto desde su incorporación al Grupo de Oceanografía Biológica de UVIGO, como en el trabajo anterior desarrollado en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Además esta tarea contará con la colaboración de la Dra. Marta Varela del IEO-Coruña, especialista en la aplicación de este tipo de técnicas para el estudio de la actividad y composición del plancton microbiano marino (ver carta de apoyo).

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Salgado, X. A., J. Aristegui, E. D. Barton, and D. A. Hansell. 2007. Contribution of upwelling filaments to offshore carbon export in the subtropical Northeast Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* 52: 1287-1292.
- Alvarez-Salgado, X. A. and others 2002. New production of the NW Iberian shelf during the upwelling season

- over the period 1982-1999. Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers 49: 1725-1739.
- Bakun, A. 1990. Global Climate Change and Intensification of Coastal Ocean Upwelling. *Science* 247: 198-201.
- Benavides, M., N. S. R. Agawin, J. Arístegui, P. Ferriol, and L. J. Stal. 2011. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* and small diazotrophs in the subtropical northeast Atlantic. *Aquatic Microbial Ecology* 65: 43-53.
- Blais, M. and others 2012. Nitrogen fixation and identification of potential diazotrophs in the Canadian Arctic. *Global Biogeochemical Cycles* 26: GB3022.
- Bode, A., M. T. Alvarez-Ossorio, A. Miranda, A. Lopez-Urrutia, and L. Valdés. 2012. Comparing copepod time-series in the north of Spain: Spatial autocorrelation of community composition. *Progress in Oceanography* 97: 108-119.
- Bode, A., R. Anadón, X. A. G. Morán, E. Nogueira, E. Teira, and M. Varela. 2011. Decadal variability in chlorophyll and primary production off NW Spain. *Climate Research* 48: 293-305.
- Bode, A., S. Barquero, N. González, M. T. Alvarez-Ossorio, and M. Varela. 2004. Contribution of heterotrophic plankton to nitrogen regeneration in the upwelling ecosystem of A Coruna (NW Spain). *Journal of Plankton Research* 26: 11-28.
- Bode, A., B. Casas, E. Fernández, E. Maraño, P. Serret, and M. Varela. 1996. Phytoplankton biomass and production in shelf waters off NW Spain: Spatial and seasonal variability in relation to upwelling. *Hydrobiologia* 341: 225-234.
- Bonnet, S., O. Grosso, and T. Moutin. 2011. Planktonic dinitrogen fixation along a longitudinal gradient across the Mediterranean Sea during the stratified period (BOUM cruise). *Biogeosciences* 8: 2257-2267.
- Capone, D. G. and others 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 19: doi:10.1029/2004GB002331
- Capone, D. G., J. P. Zehr, H. W. Paerl, B. Bergman, and E. J. Carpenter. 1997. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science* 276: 1221-1229.
- Cermeño, P., E. Maraño, V. Pérez, P. Serret, E. Fernández, and C. G. Castro. 2006. Phytoplankton size structure and primary production in a highly dynamic coastal ecosystem (Ria de Vigo, NW-Spain): Seasonal and short-time scale variability. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 67: 251-266.
- Codispoti, L. A. 2007. An oceanic fixed nitrogen sink exceeding 400 Tg Na-1 vs the concept of homeostasis in the fixed-nitrogen inventory. *Biogeosciences* 4: 233-253.
- Coles, V. J., R. R. Hood, M. Pascual, and D. G. Capone. 2004. Modeling the impact of *Trichodesmium* and nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research-Oceans* 109.
- Conley, D. J. and others 2009. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science* 323: 1014-1015.
- Church, M. J., C. M. Short, B. D. Jenkins, D. M. Karl, and J. P. Zehr. 2005. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5362-5370.
- Deutsch, C., J. L. Sarmiento, D. M. Sigman, N. Gruber, and J. P. Dunne. 2007. Spatial coupling of nitrogen inputs and losses in the ocean. *Nature* 445: 163-167.
- Duce, R. A. and others 2008. Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science* 320: 893-897.
- Falkowski, P. G. 1997. Evolution of nitrogen cycle and its influence on the biological pump in the ocean. *Nature* 342: 637-642.
- Fernández, A., B. Mouriño-Carballido, A. Bode, M. Varela, and E. Maraño. 2010. Latitudinal distribution of *Trichodesmium* spp. and N₂ fixation in the Atlantic Ocean. *Biogeosciences* 7: 3167-3176.
- Fernández-Castro, B. and others 2013. Patterns of ocean microstructure turbulence, diffusivity parameterization and nutrient fluxes during the Malaspina 2010 expedition. 6th Warnemünde Turbulence Days (WTD) 2013.
- Fernández-Castro, B. and others (under review). Microstructure turbulence and diffusivity parameterization in the tropical and subtropical Atlantic, Pacific and Indian Oceans during the Malaspina 2010 expedition. *Journal Geophysical Research*.
- Fernández, A. and others 2012. Community N₂ fixation and *Trichodesmium* spp. abundance along longitudinal gradients in the eastern subtropical North Atlantic. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*.
- Fernández, A., B. Mouriño-Carballido, A. Bode, M. Varela, and E. Maraño. 2010. Latitudinal distribution of

- Trichodesmium spp. and N₂ fixation in the Atlantic Ocean. *Biogeosciences Discuss.* 7: 2195-2225.
- Ferrari, R. 2011. A Frontal Challenge for Climate Models. *Science* 332: 316-317.
- Figueiras, F. G., G. C. Pitcher, and M. Estrada. 2006. Harmful Algal Bloom dynamics in relation to physical processes, p. 127-138. In E. Graneli and J. T. Turner [eds.], *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies. Springer-Verlag.
- Gómez-Gesteira, M., R. Beiras, P. Presa, and F. Vilas. 2011. Coastal processes in northwestern Iberia, Spain. *Continental Shelf Research* 31: 367-375.
- Grosse, J., D. Bombar, N. D. Hai, N. N. Lam, and M. Voss. 2010. The Mekong River plume fuels nitrogen fixation and determines phytoplankton species distribution in the South China Sea during low- and high-discharge season. *Limnology and Oceanography* 55: 1668-1680.
- Grosskopf, T. and others 2012. Doubling of marine dinitrogen-fixation rates based on direct measurements. *Nature* 488: 361-364.
- Gruber, N., and J. N. Galloway. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451: 293-296.
- Gruber, N., and J. L. Sarmiento. 1997. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochemical Cycles* 11: 235-266.
- Hojas-Sanchez, E. 2012. El control de la turbulencia sobre la composición y estructura de tamaños de la comunidad de picoplancton. Tesis de master.
- Hood, R. R., V. J. Coles, and D. G. Capone. 2004. Modeling the distribution of Trichodesmium and nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. *Journal of Geophysical Research-Oceans* 109.
- Howarth, R. W., R. Marino, J. Lane, and J. J. Cole. 1988. Nitrogen-Fixation in Fresh-Water, Estuarine, and Marine Ecosystems .1. Rates and Importance. *Limnology and Oceanography* 33: 669-687.
- Hutchins, D. A., M. R. Mulholland, and F. X. Fu. 2009. Nutrient Cycles and Marine Microbes in a CO₂-Enriched Ocean. *Oceanography* 22: 128-145.
- Jenkins, B. D., G. F. Steward, S. M. Short, B. B. Ward, and J. P. Zehr. 2004. Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1767-1776.
- Karl, D. and others 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry* 57: 47-+.
- Levitan O. and others 2007. Elevated CO₂ enhances nitrogen fixation and growth in the marine cyanobacterium Trichodesmium. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 531-538.
- Liu, X. and others 2013. Variability in nitrogen sources for new production in the vicinity of the shelf edge of the East China Sea in summer. *Continental Shelf Research* 61-62: 23-30.
- Longhurst, A. R. 2007. *Ecological geography of the sea*. Elsevier.
- Lucas, A. J., C. L. Dupont, V. Tai, J. L. Largier, B. Palenik, and P. J. S. Franks. 2011. The green ribbon: Multiscale physical control of phytoplankton productivity and community structure over a narrow continental shelf. *Limnology and Oceanography* 56: 611-626.
- Michaels, A. 2001. Element Stoichiometry, New Production and Nitrogen Fixation. *Oceanography* 14: 68-77.
- Mohr, W., T. Grosskopf, D. W. R. Wallace, and J. Laroche. 2010. Methodological Underestimation of Oceanic Nitrogen Fixation Rates. *Plos One* 5.
- Moisander, P. H. and others 2010. Unicellular Cyanobacterial Distributions Broaden the Oceanic N₂ Fixation Domain. *Science* 327: 1512-1514.
- Moncoiffe, G., X. A. Alvarez-Salgado, F. G. Figueiras, and C. Savidge. 2000. Seasonal and short-time-scale dynamics of microplankton community production and respiration in an inshore upwelling system. *Marine Ecology Progress Series* 196: 111-126.
- Montoya, J. P., M. Voss, P. Kahler, and D. G. Capone. 1996. A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 986-993.
- Moore, C. M. and others 2009. Large-scale distribution of Atlantic nitrogen fixation controlled by iron availability. *Nature Geoscience* 2: 867-871.
- Mouriño-Carballido, B. and others 2011. Importance of N₂ fixation vs. nitrate eddy diffusion along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* 56: 999-1007.
- Mouriño-Carballido, B., and D. J. McGillicuddy. 2006. Mesoscale variability in the metabolic balance of the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography* 51: 2675-2689.

- Mourino-Carballido, B., M. Pahlow, and A. Oschlies. 2012. High sensitivity of ultra-oligotrophic marine ecosystems to atmospheric nitrogen deposition. *Geophysical Research Letters* 39.
- Mouriño, B., E. Fernández, R. Pingree, B. Sinha, J. Escánez, and D. De Armas. 2005. Constraining effect of mesoscale features on carbon budget of photic layer in the NE subtropical Atlantic. *Marine Ecology-Progress Series* 287: 45-52.
- Mouriño-Carballido, B. 2009. Eddy-driven pulses of respiration in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 56: 1242-1250.
- Mulholland, M. R. and others 2012. Rates of dinitrogen fixation and the abundance of diazotrophs in North American coastal waters between Cape Hatteras and Georges Bank. *Limnology and Oceanography* 57: 1067-1083.
- Munk, W. 1966. Abyssal recipes. *Deep Sea Research* 13: 713-730.
- Munk, W., and C. Wunsch. 1998. Abyssal recipes II: energetics of tidal and wind mixing. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 45: 1977-2010.
- Needoba, J. A., R. A. Foster, C. Sakamoto, J. P. Zehr, and K. S. Johnson. 2007. Nitrogen fixation by unicellular diazotrophic cyanobacteria in the temperate oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 52: 1317-1327.
- Nogueira, E., F. F. Pérez, and A. F. Ríos. 1997. Seasonal patterns and long-term trends in an estuarine upwelling ecosystem (Ria de Vigo, NW Spain). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 44: 285-300.
- Osborn, T. R. 1980. Estimates of the local rate of vertical diffusion from dissipation measurements. *Journal of Physical Oceanography* 10: 83-89.
- Oschlies, A., and V. Garçon. 1998. Eddy-induced enhancement of primary production in a model of the north Atlantic Ocean. *Nature* 394: 266-269.
- Paerl, H. W., and J. P. Zehr. 2000. Marine nitrogen fixation, p. 387-426. In K. DL [ed.], *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss.
- Pérez, F. F. and others 2010. Plankton response to weakening of the Iberian coastal upwelling. *Global Change Biology* 16: 1258-1267.
- Pitcher, G. C., F. G. Figueiras, B. M. Hickey, and M. T. Moita. 2010. The physical oceanography of upwelling systems and the development of harmful algal blooms. *Progress in Oceanography* 85: 5-32.
- Planas, D., S. Agustí, C. M. Duarte, T. C. Granata, and M. Merino. 1999. Nitrate uptake and diffusive nitrate supply in the Central Atlantic. *Limnology and Oceanography* 44: 116-126.
- Prandke, H., and A. Stips. 1998. Test measurements with an operational microstructure-turbulence profiler: Detection limit of dissipation rates. *Aquatic Sciences* 60: 191-209.
- Rees, A. P., J. A. Gilbert, and B. A. Kelly-Gerreyn. 2009. Nitrogen fixation in the western English Channel (NE Atlantic Ocean). *Marine Ecology-Progress Series* 374: 7-12.
- Ruíz-Villarreal, M. and others 2011. Turbulence and mixing in the northern Galician shelf and rias during an upwelling event. 5th Warnemünde Turbulence Days (WTD) 2011 on Turbulence and Mixing in Estuaries and Coastal Seas.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A. 2001. Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central Atlantic Ocean. *Nature* 411: 66-69.
- Scotti, A., and J. Pineda. 2004. Observation of very large and steep internal waves of elevation near the Massachusetts coast. *Geophysical Research Letters* 31: L22307.
- Sherman, K., and G. Hempel. 2009. The UNEP large marine ecosystem report: a perspective on changing conditions in LMEs of the world's regional seas. *UNEP Regional Seas Reports and Studies*, Vol 182. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Sherwin, T. J., M. E. Inall, and R. Torres. 2002. The seasonal and spatial variability of small-scale turbulence at the Iberian margin. *Journal of Marine Research* 60: 73-100.
- Short, S. M., B. D. Jenkins, and J. P. Zehr. 2004. Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2186-2192.
- Somavilla, R., C. Gonzalez-Pola, A. Lavin, and C. Rodriguez. 2013. Temperature and salinity variability in the south-eastern corner of the Bay of Biscay (NE Atlantic). *Journal of Marine Systems* 109: S105-S120.
- Stevens, C., M. Smith, and A. Ross. 1999. SCAMP: measuring turbulence in estuaries, lakes, and coastal waters. *NIWA - Water and Atmosphere* 7: 20-21.

- Subramaniam, A., C. Mahaffey, W. Johns, and N. Mahowald. 2013. Equatorial upwelling enhances nitrogen fixation in the Atlantic Ocean. *Geophysical Research Letters* 40: 1766-1771.
- Tilstone, G. H., F. G. Figueiras, E. G. Fermin, and B. Arbones. 1999. Significance of nanophytoplankton photosynthesis and primary production in a coastal upwelling system (Ria de Vigo, NW Spain). *Marine Ecology Progress Series* 183: 13-27.
- Torres-Valdés, S. and others 2009. Distribution of dissolved organic nutrients and their effect on export production over the Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 23.
- Valdés, L. and others 2007. A decade of sampling in the Bay of Biscay: What are the zooplankton time series telling us? *Progress in Oceanography* 74: 98-114.
- Voss, M., P. Croot, K. Lochte, M. Mills, and I. Peeken. 2004. Patterns of nitrogen fixation along 10N in the tropical Atlantic. *Geophysical Research Letters* 31.
- Ward, B. B. 2013. How Nitrogen Is Lost. *Science* 341: 352-353.
- Webb, E. A., I. M. Ehrenreich, S. L. Brown, F. W. Valois, and J. B. Waterbury. 2009. Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, *Crocospaera watsonii*, isolated from the open ocean. *Environmental Microbiology* 11: 338-348.
- White, A. E. 2012. OCEANOGRAPHY The trouble with the bubble. *Nature* 488: 290-291.
- Wilson, S. T., D. Bottjer, M. J. Church, and D. M. Karl. 2012. Comparative Assessment of Nitrogen Fixation Methodologies, Conducted in the Oligotrophic North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6516-6523.
- Williams, R. G., and M. J. Follows. 1998. The Ekman transfer of nutrients and maintenance of new production over the North Atlantic. *Deep-Sea Res. I* 45: 461-489.
- Wolk, F., H. Yamazaki, L. Seuront, and R. G. Lueck. 2002. A new free-fall profiler for measuring biophysical microstructure. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology* 19: 780-793.
- Wunsch, C., and R. Ferrari. 2004. Vertical mixing, energy and the general circulation of the oceans. *Annual Review of Fluid Mechanics* 36: 281-314.
- Zehr, J. P. 2011. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in Microbiology* 19: 162-173.
- Zehr, J. P., B. D. Jenkins, S. M. Short, and G. F. Steward. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5: 539-554.
- Zehr, J. P., M. T. Mellon, and S. Zani. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes (vol 64, pg 3444, 1998). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5067-5067.
- Zehr, J. P., and H. W. Paerl. 2008. Biological nitrogen fixation in the marine environment. In K. D.L. [ed.], *Microbial Ecology of the oceans*. Wiley-Liss.
- Zehr, J. P. and others 2001. Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412: 635-638.