



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
Área de Ecología

Tesis Doctoral

**La Producción de Gases con
Efecto Invernadero en el Estuario del
Río Palmones**



Sonia Moreno Corrales
Málaga 2008



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)

Tesis Doctoral

La Producción de Gases con
Efecto Invernadero en el Estuario del
Río Palmones

Sonia Moreno Corrales
Málaga, 2008



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)

Visado en Málaga en mayo de 2008

El director

Fdo.: Prof. Dr. F. Xavier Niell Castanera

Catedrático de Ecología

Universidad de Málaga

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología

Fdo.: Sonia Moreno Corrales



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA
(Área de Ecología)

La presente memoria: “LA PRODUCCIÓN DE GASES CON EFECTO INVERNADERO EN EL ESTUARIO DEL RÍO PALMONES” presentada por D^a. SONIA MORENO CORRALES para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección del Prof. Dr. F. XAVIER NIELL CASTANERA, Catedrático de Ecología de la Universidad de Málaga, quien suscribe y autoriza su presentación:

Prof. F. Xavier Niell Castanera

Málaga, mayo de 2008

Esta tesis doctoral ha sido subvencionada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, mediante una beca de formación de personal investigador (convocatorio de 2002) y a una beca del contrato 8.06/44.2735 entre la Universidad de Málaga y la Empresa Nacional de Celulosa (ENCE).

El trabajo se ha realizado dentro del Grupo de Investigación de Ecofisiología de Sistemas Acuáticos (P.A.I., RMN-0176 de la Junta de Andalucía), del Departamento de Ecología de la Universidad de Málaga, en el marco de los proyectos: “Cambios en los ciclos biogeoquímicos y en la fisiografía de una cuenca de pequeño tamaño (Río Palmones, Cádiz). Repercusiones ambientales y socioeconómicas”, CICYT AMB 99-1088, “Intercambio gaseoso en comunidades de plantas de marismas. Estimación de los sistemas aéreos, radical-sedimentaria y de los aportes alóctonos”, CICYT (REN 2002-003407 MAR) y “Las marismas de Quenopodiáceas como sumideros con escasa exportación de materia y emisión de gases”, CMT 2005-05011.

❧ Agradecimientos ❧

Quiero dar las gracias a todos los que habéis hecho posible que hoy esté sentada delante del ordenador escribiendo la primera y última página de la memoria de mi tesis; en especial al profesor F. X. Niell por permitir completar mi formación académica a su lado y por los momentos compartidos fuera del departamento, siempre resulta interesante conversar contigo.

Mi agradecimiento al profesor D. B. Nedwell de la Universidad de Essex (Inglaterra) y su grupo, quienes me enseñaron todo lo necesario para trabajar en cromatografía de gases. Gracias a las personas del Instituto de Oceanografía de la Universidad de Lisboa, en especial a la profesora Isabel Caçador y a “sus meninas”, Marta y Ana, que además de ayudarme profesionalmente, me acogieron con cariño e hicieron que me sintiera como en casa durante mi estancia en Lisboa.

Agradecer a todos los miembros del Departamento de Ecología, profesores y “pseudoprofesores”, becarios y “pseudobecarios” haber compartido conmigo el día a día y estar ahí siempre que lo necesité. No me olvido de los que han emprendido otro camino y ya no están por aquí, pero que igualmente me han ayudado y siguen pendientes de mí. Muy especialmente quiero agradecer a los que habéis conseguido traspasar esa barrera y, además de ser mis compañeros de trabajo, hoy día también sois MIS AMIG@S.

A todos mis amigos: compañeros de carrera, del baile, del deporte, del inglés, a mi australiana....que a pesar de que muchos no tenéis nada que ver con este mundillo habéis mostrado vuestro interés por mi trabajo y habéis estado siempre dispuestos a ayudarme. Muchas gracias chic@s.

Terminaré con el agradecimiento más especial de todos a mi familia, especialmente a mis padres que siempre estarán ahí para escucharme y apoyarme en todo lo que haga.

De todos vosotros he aprendido algo que seguro que ha quedado reflejado en este trabajo.

GRACIAS de corazón.

A mi familia y amigos



Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| BSR | Bacterias sulfatorreductoras |
| CFCs | Compuestos clorofluorocarbonados |
| ECD | Electron capture detector |
| FID | Flame ionization detector |
| GESA | Grupo de Ecofisiología de sistemas acuáticos |
| HCFCCs | Compuestos hidroclorofluorocarbonados |
| IPCC | Intergovernmental Panel of Climate Change |
| MO | Materia orgánica |
| USEPA | United States-Environmental Protection Agency |

Índice

1. Introducción

| | |
|---|----|
| 1. Los Cambios del Clima en el Planeta | 3 |
| 2. Contribución de Algunos Gases Invernadero al Cambio Climático: Metano y Óxido Nitroso | 7 |
| 3. El Sedimento de los Estuarios como Escenario en la Producción y Emisión de Metano y Óxido Nitroso | 10 |
| 4. Justificación del Trabajo. Hipótesis y objetivos | 15 |

2. Marco Geográfico del Estudio y Estrategia de Muestreo

| | |
|------------------------------------|----|
| 1. Descripción del Área de Estudio | 21 |
| 2. Estrategia de Muestreo | 23 |

3. Caracterización Analítica del Sedimento

| | |
|---|----|
| 1. Métodos | |
| 1.1. En la fracción sólida del sedimento | |
| 1.1.1. Granulometría | 32 |
| 1.1.2. pH, potencial redox y oxígeno | 32 |
| 1.1.3. Temperatura | 33 |
| 1.1.4. Carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N | 34 |
| 1.1.5. Contenido de materia orgánica | 34 |
| 1.2. En el agua intersticial | |
| 1.2.1. Nutrientes (nitrato, nitrito y amonio) | 35 |
| 1.2.2. Sulfato | 35 |
| 2. Resultados | |
| 2.1. Características generales del sedimento | |
| 2.1.1. Granulometría | 36 |
| 2.1.2. pH, potencial redox y oxígeno | 37 |
| 2.1.3. Temperatura | 40 |
| 2.2. Nutrientes en la fracción sólida del sedimento: Carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N | 42 |
| 2.3. Contenido de materia orgánica | 45 |
| 2.4. Nutrientes y contenido de sulfato en el agua intersticial | 46 |

4. Experimentos de Producción y Emisión de Gases en el Sedimento

| | |
|--|----|
| 1. Métodos | |
| 1.1. Puesta a punto del método analítico: cromatografía de gases | 53 |
| 1.2. Diseño experimental | |
| 1.2.1 Experimentos de producción: incubaciones en slurry | 59 |
| 1.2.2 Experimentos de emisión | 70 |
| 2. Resultados | |
| 2.1. Caracterización analítica del sedimento en los experimentos | 75 |
| 2.2. Producción y emisión de gases in situ. ¿Sufre el metano oxidación aeróbica? | 75 |
| 2.3. Metanogénesis. Factores que controlan su producción | |
| 2.3.1 Efecto de la temperatura en la producción metano | 79 |
| 2.3.2 Efecto de dos sustratos: acetato y metanol | 81 |
| 2.3.3 Competencia entre bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras | 82 |
| 2.3.4 Inhibición por sulfato | 84 |
| 2.3.5 Inhibición por salinidad | 85 |
| 2.4. Producción de óxido nitroso y desnitrificación (N ₂) | |
| 2.4.1 Efecto de la temperatura en la producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular | 87 |
| 2.4.2 Disponibilidad de nitrato | 89 |
| 2.4.3 Fuente de carbono orgánico | 92 |
| 2.5. Metanogénesis y sulfatorreducción | 93 |

5. Discusión

| | |
|---|-----|
| 1. El Sedimento del Estuario: el Soporte Físico donde tiene lugar la Producción de gases | 97 |
| 2. Producción y Emisión in situ de Gases con Efecto Invernadero: CH ₄ , N ₂ O y N ₂ | 107 |
| 3. Producción y Emisión Espacial y Temporal de los Gases en el Estuario | 126 |
| 4. Capacidad de Producción y Degasificación del Estuario. Su Importancia en el Reciclado de los Nutrientes y su Incidencia en el Cambio Climático | 138 |

| | |
|------------------------|-----|
| 6. Conclusiones | 143 |
|------------------------|-----|

7. Summary

| | |
|----------------------------------|-----|
| 1. Introduction | 149 |
| 2. Sampling, Methods and Results | 151 |
| 3. Discussion | 154 |
| 4. Conclusions | 164 |

| | |
|------------------------|-----|
| 8. Bibliografía | 165 |
|------------------------|-----|

Anexos

1. Introducción

1. Los Cambios del Clima en el Planeta
2. Contribución de Algunos Gases Invernadero al Cambio Climático: Metano y Óxido Nitroso
3. El Sedimento de los Estuarios como Escenario en la Producción y Emisión de Metano y Óxido Nitroso
4. Justificación del Trabajo. Hipótesis y Objetivos

1. Los Cambios del Clima en el Planeta

A lo largo de la historia del Planeta el clima no ha permanecido constante. Durante los períodos interglaciales ha cambiado de forma gradual, permitiendo a los organismos adaptarse a las nuevas circunstancias. En períodos de transición entre épocas glaciales, el cambio ha sido brusco. En cualquier caso, los cambios respondían a procesos naturales: variaciones en la órbita de la Tierra y en la actividad solar, y a las emisiones a la atmósfera de aerosoles y gases de efecto invernadero (CO_2) durante las erupciones volcánicas que contribuyeron al enfriamiento o calentamiento global. En la actualidad, deberíamos gozar de una relativa estabilidad climática; al menos así ha sido desde el inicio de la era cristiana hasta principios del siglo XX, donde sólo se han producido algunas anomalías climáticas en la Edad Media (900-1300) y en la llamada pequeña Edad de Hielo entre 1500 y 1850, que han sido atribuidas a variaciones naturales del clima. Sin embargo, la rapidez con la que se produce el cambio climático en los últimos 100 años, al tiempo del desarrollo industrial, hace pensar que el cambio actual no responde a un fenómeno natural, de ahí que sea uno de los problemas ambientales de mayor interés y controversia en la comunidad científica, y en la sociedad en general (Figura 1.1).

Si bien es cierto que la concentración de aerosoles y de gases de efecto invernadero (CO_2 , CH_4 y N_2O entre otros) ha ido variando a lo largo de la historia, desde la Revolución Industrial (1750) se ha incrementado significativamente su concentración en la atmósfera, principalmente en respuesta a la quema de combustible fósil y biomasa. No hay que olvidar que algunos de estos gases aunque tienen una formación natural, se emiten a la atmósfera tanto por procesos naturales como por la acción del hombre, otros en cambio, los gases fluorados por ejemplo, son exclusivamente antropogénicos. Según la National Oceanic Atmospheric Administration's, la concentración de CO_2 , principal gas de efecto invernadero, ha aumentado en 100 ppm (un 36%) desde el inicio del desarrollo industrial hasta el 2006, la mayor parte debido a la actividad humana (Intergovernmental Panel of Climate Change, IPCC, 2007). En realidad no se habían registrado concentraciones tan altas desde hace más de 650.000 años (IPCC, 2007) lo que no resulta extraño si

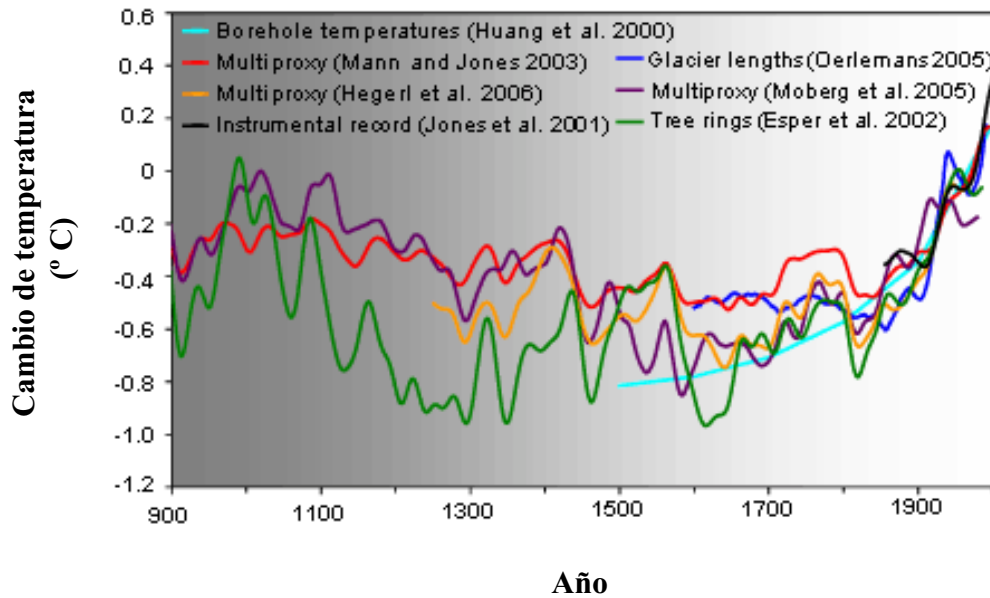


Figura 1.1.- Cambios de la temperatura atmosférica en los últimos 1.100 años (figura modificada del IPCC (2007)).

tenemos en cuenta que hoy día la emisión por parte del hombre supera con creces a la de origen volcánico en 150 veces.

El metano (CH_4), uno de los gases invernadero más efectivos a pesar de ser un gas traza en la composición atmosférica, es hoy más abundante que hace 650.000 años (IPCC, 2007). Actualmente, el aumento sufrido en el siglo XX supera al de la época industrial (148%), aunque en la última década su tasa de incremento va disminuyendo considerablemente (Figura 1.2).

La concentración de óxido nítrico (N_2O) se mantuvo más o menos constante hasta la época industrial, aumentando rápidamente hacia finales del siglo XX. Ha sufrido un aumento del 18% en los últimos 200 años, y continúa con la misma tendencia (Figura 1.3).

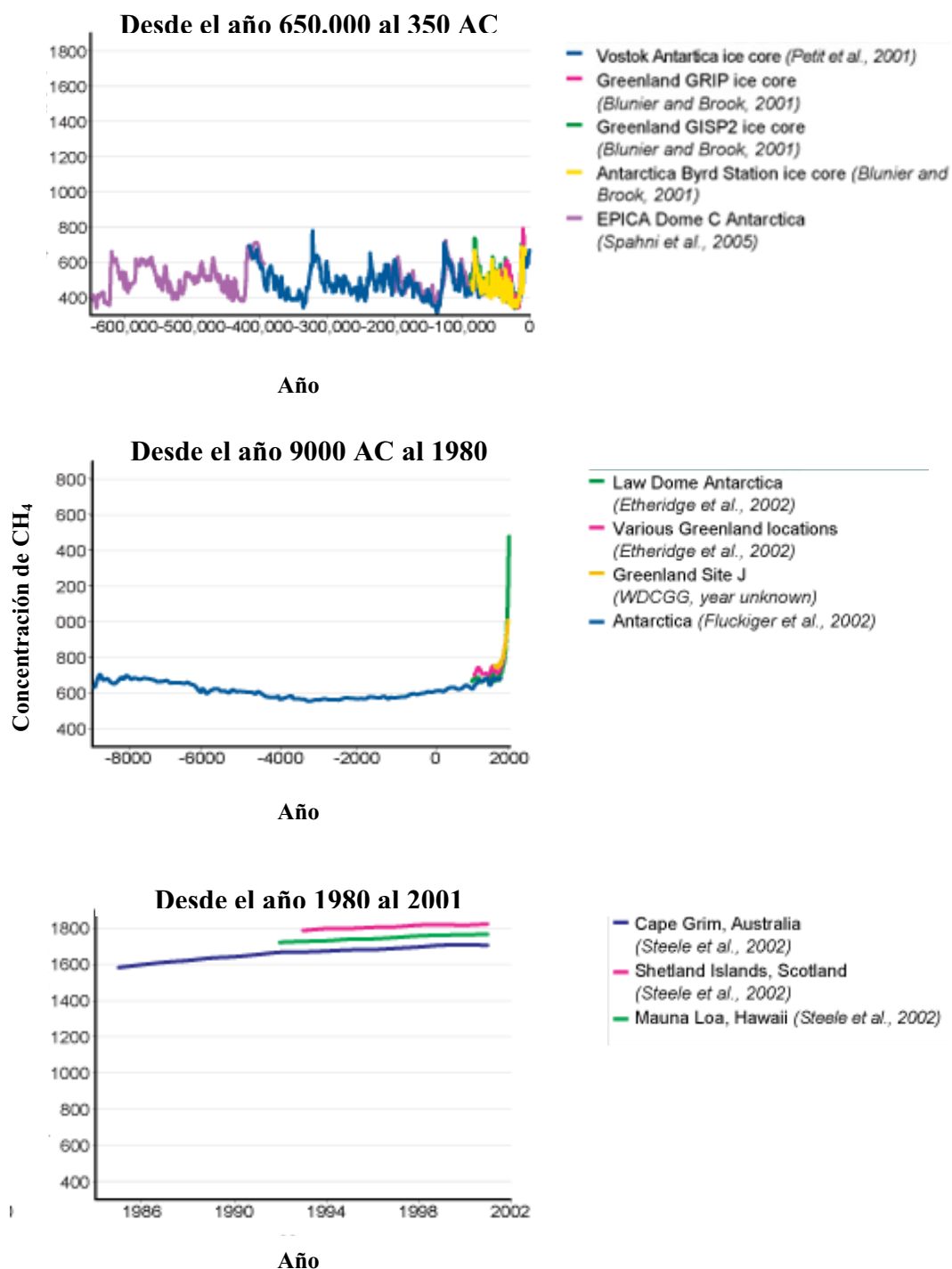


Figura 1.2.- Evolución de la concentración de CH₄ desde el año 650.000 AC al 2001 según distintas fuentes. En negativo se refiere a la Era AC. Figura modificada del IPCC (2007).

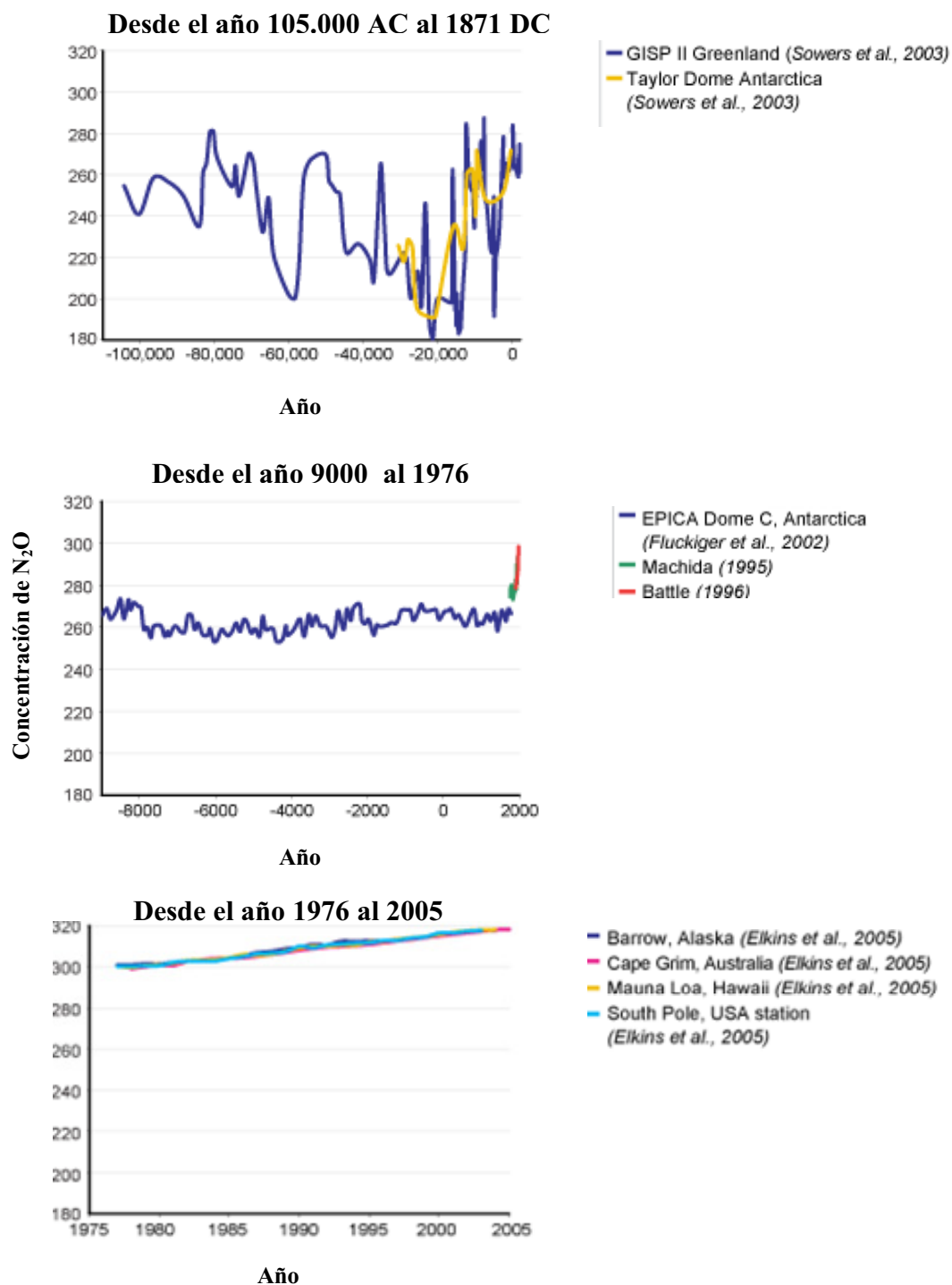


Figura 1.3.- Evolución de la concentración de N₂O desde el año 105.00 AC al 2005 según distintas fuentes. En negativo se refiere a la Era AC. Figura modificada del IPCC (2007)

Los compuestos clorofluorocarbonados (CFCs) e hidroclorofluorocarbonados (HCFCs) han aumentado desde que comenzaron a utilizarse en 1928 en aerosoles, pesticidas, solventes, refrigerantes, espumantes, extintores de fuego, etc. Hoy en día su concentración disminuye paulatinamente gracias a los esfuerzos realizados para limitar su uso.

Este aumento de aerosoles y gases de efecto invernadero en la atmósfera se supone que ejerce un papel claro en el cambio climático actual, los primeros por absorber y emitir calor además de reflejar luz contribuyendo al calentamiento atmosférico según sus propiedades, y los segundos por absorber parte de la radiación infrarroja emitida por el sol. En definitiva, según el IPPC (2007), estas alteraciones en la composición atmosférica ya han afectado al régimen de precipitaciones y a los patrones de tormentas, y han provocado un incremento de la temperatura de aproximadamente 0.6° C y del nivel del mar de 10 a 12 cm durante el siglo XX. A menos que disminuya considerablemente la emisión de gases invernadero en la atmósfera, las predicciones para el futuro no son optimistas. Aunque resulta difícil predecir la magnitud de los cambios, se prevé, entre otros efectos, la disminución de la biodiversidad, desnutrición, el aumento de enfermedades y de la tasa de mortalidad..

2. Contribución de Algunos Gases Invernadero al Cambio Climático: Metano y Óxido Nitroso

En este trabajo nos vamos a centrar sólo en dos de los gases de efecto invernadero, el metano y el óxido nitroso. Ambos han sido muy poco estudiados, víctimas del interés que ha suscitado el CO₂. Son de nuestro interés por tener ambos una clara implicación en el cambio climático, y por formar parte de procesos de mineralización de la materia orgánica (metanogénesis y desnitrificación) en sedimentos anóxicos marinos, tales como los del estuario del río Palmones, escenario en el que se ha realizado este estudio.

El metano, aún siendo constituyente minoritario de la atmósfera, es el tercer gas de efecto invernadero en importancia después del CO₂ y de los compuestos CFC_s (Lelieveld J. et al., 1993; Milich, 1999) por su alta capacidad de absorción de radiación infrarroja, 21 veces superior al CO₂, (Crutzen, 1995), contribuyendo aproximadamente al 15% del calentamiento global (Christiansen y Cox, 1995). Se produce en ambiente anóxicos durante el proceso de descomposición de la materia orgánica por bacterias metanogénicas que pertenecen al reino *Euarchaeota* del dominio *Archaea* (Woese et al., 1990). Estas bacterias se encuentran en ambientes muy diversos, como el tracto gastrointestinal de animales e insectos (Zinder, 1993), humedales, plantaciones de arroz, sedimentos dulceacuícolas y marinos, y marismas, entre otros (Balch et al., 1979; Oremland, 1988; Peters y Conrad, 1995; Whitman et al., 1991).

La emisión de metano a la atmósfera atiende al balance entre su producción y su secuestro por oxidación aeróbica o anaeróbica en suelos, que representa el 7%, y por las reacciones con átomos de cloro en la capa límite marina (2%). Finalmente, su concentración en la atmósfera dependerá de la relación entre el metano emitido, y el que es oxidado en la atmósfera por radicales OH, que afecta al 90% del gas emitido.

La concentración atmosférica de metano ha aumentado más rápidamente que la del CO₂ y la de otros gases durante la mayor parte del siglo XX (Cicerone y Oremland, 1988). Este aumento ha continuado en las últimas décadas, pero a menor ritmo, pasando de una tasa de crecimiento de 20 ppbv por año a finales de los setenta a 13 ppbv en los noventa. Las concentraciones se han disparado desde la Revolución Industrial, sin embargo, los flujos medidos apuntan a que este aumento tiene un origen biogénico derivado de la actividad humana. Se estima que el 60% de la emisión global se debe a diversas actividades asociadas al hombre como la quema de combustible fósil y de biomasa, la fermentación entérica en ganado doméstico, los cultivos de arroz y los vertederos (IPCC, 2007). En España, según datos del Inventario de Gases de Efecto Invernadero de España (1990-2005) del Ministerio de Medio Ambiente, el metano representa el 7.59% de los gases invernadero emitidos a

la atmósfera por acción del hombre, y su procedencia está ligada a la ganadería (el 3.06% por fermentación entérica en ganado doméstico, y el 2.01% por gestión del estiércol generado por el ganado) y a la gestión de residuos (1.96% por depósitos en vertederos y el 0.49% por tratamiento de aguas residuales).

Los humedales constituyen la principal fuente de emisión natural de metano con 100-200 Tg por año, el 30% del total la emisión total. Esto supone el 55% de la emisión de fuentes naturales, entre las que también merece la pena mencionar otros gases naturales, el permafrost, los termiteros, los ecosistemas marinos y epicontinentales, y los suelos (Le Mer et al., 2001).

El óxido nitroso (N_2O) es otro gas invernadero importante dada su alta capacidad de absorber calor, alrededor de 310 veces más potente que el CO_2 , y su larga permanencia en la atmósfera, unos 120 años (Environmental Protection Agency United States, USEPA, 2007), aunque contribuye al calentamiento global tan sólo en un 5-6% (Houghton et al., 1996). Además, es la principal fuente de radicales de óxido nítrico en la estratosfera, los cuales tienen un papel fundamental en la destrucción de la capa de ozono (Crutzen y Schmailzl, 1983). Se produce por acción microbiana en suelos y océanos durante la oxidación aeróbica de amonio (nitrificación) y la descomposición anaeróbica incompleta de la materia orgánica utilizando el nitrato como aceptor de electrones (desnitrificación). También se produce por procesos antropogénicos que incluyen la combustión industrial, y la combustión interna en vehículos, etc. La única vía de eliminación se da en la atmósfera principalmente por procesos de fotólisis y electrolisis.

La concentración media a nivel global ha aumentado en un 18% desde 1750 a 1998. En las dos últimas décadas, continúa creciendo a razón de 0.25% por año (IPCC, 2007). A pesar del incremento sufrido durante la Revolución Industrial, el 60% del óxido nitroso emitido a la atmósfera tiene su origen en fuentes naturales (IPCC, 2007). Los suelos tropicales (bosques húmedos y sabanas) y los océanos producen 6.3 y 4.3 Tg de óxido nitroso al año, y juntos suponen el 70% del óxido nitroso emitido a la atmósfera por fuentes naturales. La agricultura, la ganadería, el

tratamiento de aguas residuales, la combustión de hidrocarburos fósiles, la producción de ácido nítrico para fertilizantes, etc. constituyen las fuentes de emisión antropogénica. En España, de los gases de efecto invernadero de origen antrópico emitidos a la atmósfera, el óxido nítrico contribuye con 5.19%, de los cuales el 4.79% se debe a la agricultura (3.06% proceden de emisiones directas de suelos agrícolas, y el 1.73% a emisiones indirectas), el 0.66% a la gestión de estiércol y el 0.59% al transporte por carretera (datos del Inventario de Gases de Efecto Invernadero de España, 1990-2005, del Ministerio de Medio Ambiente).

3. El Sedimento de los Estuarios como Escenario en la Producción y Emisión de Metano y Óxido Nítrico

La contribución de los ecosistemas marinos a la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera es variable, ya que su producción está asociada a los procesos biogeoquímicos. Su papel es relativamente modesto en la emisión global de metano, contribuyendo sólo con el 1-10% de la emisión total (Cicerone y Oremland, 1988; Bange et al., 1994), pero constituye una de las principales fuentes de emisión de óxido nítrico (25% de dicha emisión global) (Nevison et al., 1995, Bouwman et al., 1995).

De estos ecosistemas, los estuarios sólo representan el 0.5% de la superficie oceánica total. Se les atribuyen entre el 7 y el 10% de la emisión total oceánica de metano (Bange et al., 1994; Upstill-Goddard et al., 2000, Middelburg et al., 2001); y sus sedimentos se consideran grandes productores de óxido nítrico vía desnitrificación (Nedwell 1975; Seitzinger et al., 1980; Ogilvie et al., 1997). Según Nixon et al. (1996) la mitad del nitrógeno que reciben los estuarios es eliminado vía desnitrificación; por ello son una fuente de producción y emisión de óxido nítrico importante (Bange et al., 1996; Seitzinger y Kroeze, 1998).

La producción de estos gases en el sedimento está asociada a procesos biogeoquímicos complejos relacionados con la mineralización bacteriana de la

materia orgánica (MO). Cuando hay oxígeno, la descomposición aeróbica es la vía preferente. Una vez que éste se agota, la mineralización tiene lugar mediante la reducción de nitrato a formas gaseosas de nitrógeno, como el óxido nitroso o el nitrógeno molecular, por bacterias desnitrificantes en condiciones anóxicas (desnitrificación) (Firststone, 1982). Cuando el nitrato escasea se emplean óxidos de metales, por ejemplo MnO_2 y Fe_2O_3 . En ausencia de éstos, las bacterias sulfatorreductoras (BSR) utilizan el sulfato como aceptor final de electrones (sulfatorreducción). Por último, la formación de metano (metanogénesis) permite la mineralización de carbono cuando se ha agotado todo el oxígeno, el nitrato y el sulfato (Martens y Berner, 1974). El orden en el que se utilizan estos aceptores de electrones en la oxidación de la materia orgánica, primero el oxígeno, después el nitrato y el sulfato y, por último el dióxido de carbono, atiende a la disminución de energía liberada en tales procesos. Éstos además se establecen en una clara distribución espacial estratificada en el sedimento según se observa en la figura 1.4.

El carácter anóxico y las altas concentraciones de sulfato de los sedimentos de los estuarios los convierten en un ambiente idóneo para que gran parte de la oxidación de carbono, entre el 50 y el 99%, ocurra a través del sulfato (sulfatorreducción) (Lovely y Klug, 1983; Takii y Fukui, 1991), sin embargo, esto no impide que también se dé la oxidación del nitrato (desnitrificación) produciendo gases de N (óxido nitroso, y nitrógeno molecular en su mayoría), según las condiciones del sedimento (Painter, 1977, Barnes y Owens, 1998, Fenchel y Blackburn, 1979). La nitrificación también puede contribuir a la producción de óxido nitroso, al ser un producto intermediario en la oxidación de amonio a nitrato (Goreau et al., 1980), aunque principalmente aporta nitrato a las capas anóxicas más profundas que junto con el nitrato que procede de la columna de agua será reducido por bacterias desnitrificantes. Por ello, la concentración de nitrato puede ser un factor limitante de la desnitrificación, y una mayor carga de nutrientes al agua incrementa la producción de óxido nitroso en sedimentos marinos (Seitzinger et al., 1983). Si bien la nitrificación supone la entrada y captura de N al sedimento, la desnitrificación supone la pérdida de N (óxido nitroso o nitrógeno molecular) hacia la atmósfera (Figura 1.5).

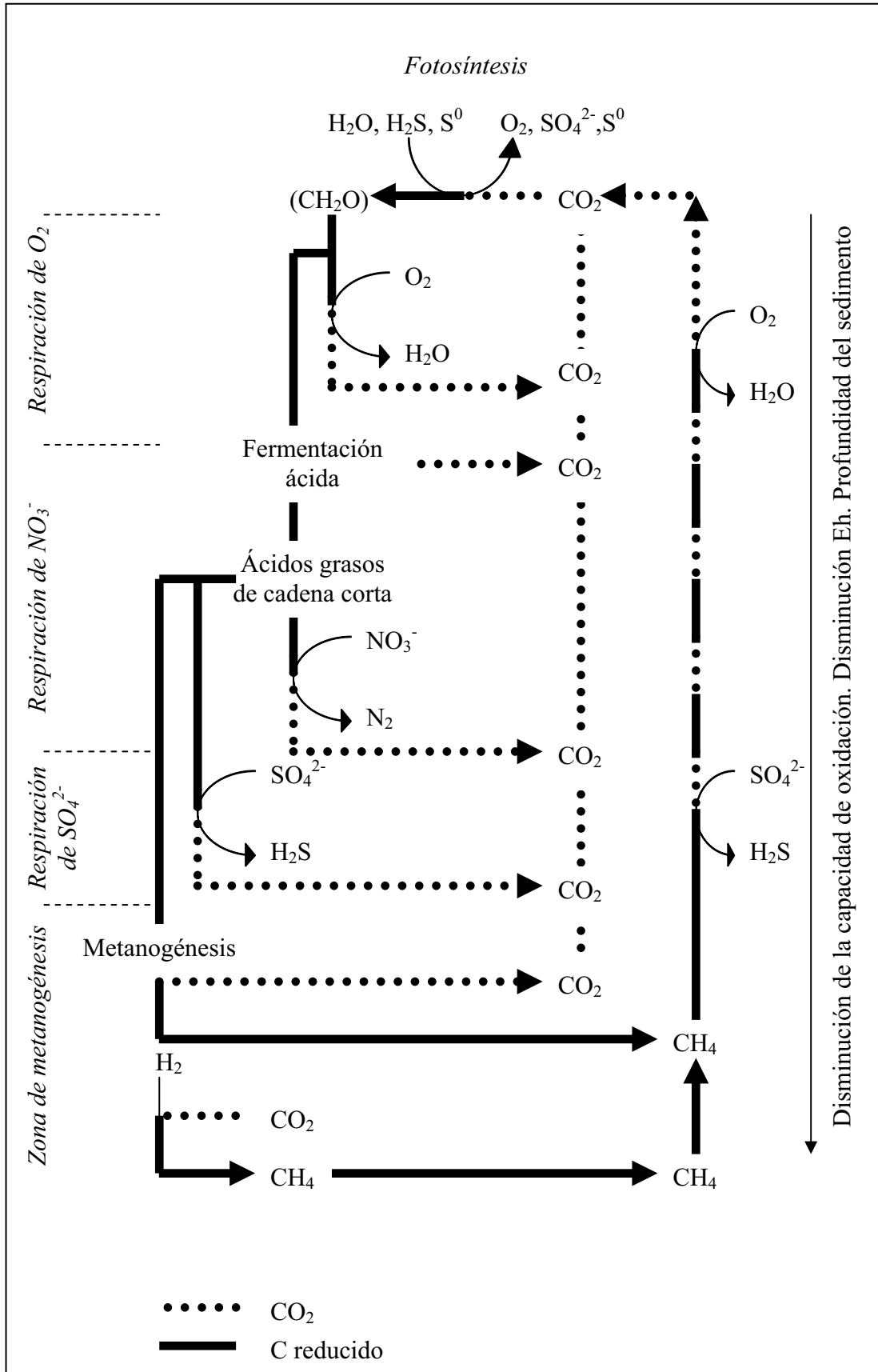


Figura 1.4.- Orden de utilización del O_2 , NO_3 , SO_4 y CO_2 como aceptores de electrones. (Redibujado de Fenchel y Blackburn (1979)).

Estos sedimentos no se revelan como un ambiente muy favorable para la formación de metano, ya que los procesos de metanificación están condicionados por la salinidad del medio, que inhibe a las bacterias metanogénicas, y por la concentración de sulfato (e.g. Oremland, 1988). En realidad, el sulfato no ejerce un efecto inhibitorio sobre las bacterias metanogénicas, sino que las bacterias sulfatorreductoras compiten más eficientemente por el mismo sustrato, el hidrógeno y el acetato, que las metanogénicas (Abram y Nedwell 1978 a,b). Aún así, hay evidencias de formación de metano en sedimentos con concentraciones más o menos elevadas de sulfato (5-60 mM) y lo suficientemente ricos en carbono orgánico como para que éste no sea un sustrato limitante (Holmer y Kristensen, 1994).

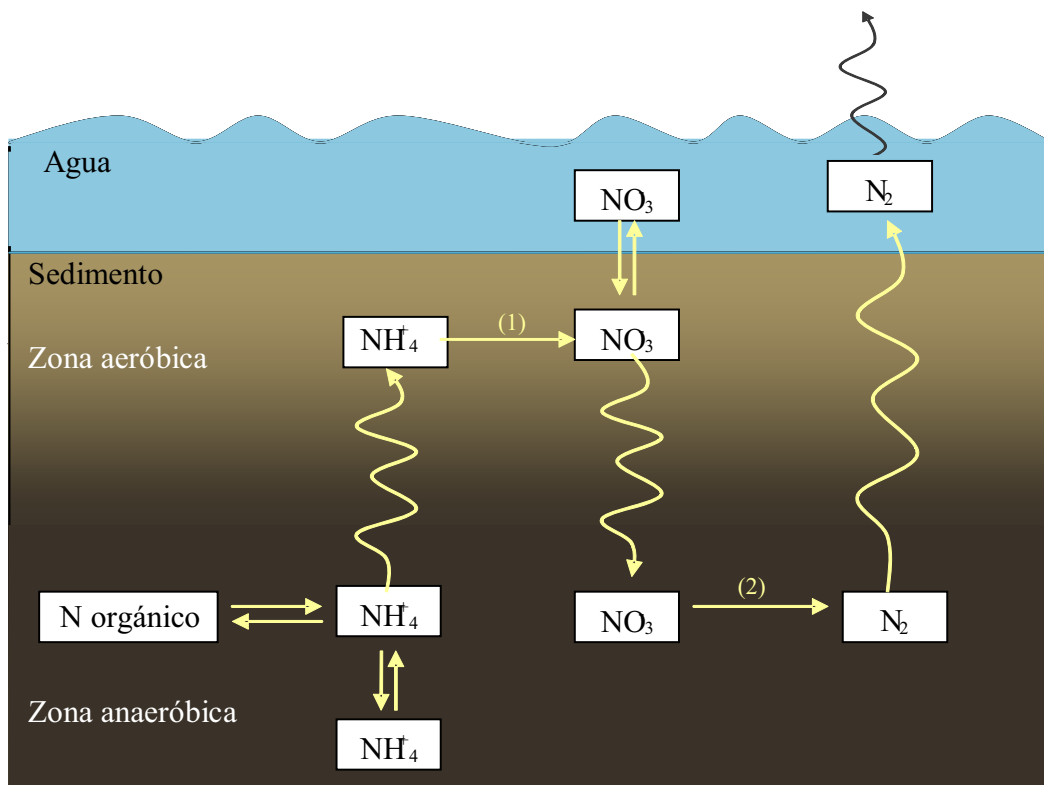


Figura 1.5.- Ciclo del nitrógeno en el sedimento. (1) y (2) representan la nitrificación y desnitrificación, respectivamente. (Redibujado de Fenchel y Blackburn (1979)).

Además, gran parte del metano, el 60%, es oxidado en el sedimento y no llega a la atmósfera. Generalmente, en sedimentos marinos predomina la oxidación anaeróbica, siendo insignificante la aeróbica, ya que para que tenga lugar esta última, se precisan concentraciones de oxígeno de 200-1600 μM en el primer milímetro y medio (Conrad et al., 1995). Se piensa que parte del metano producido es oxidado en la zona de sulfatorreducción por las bacterias metanotróficas durante su ascenso hacia la atmósfera. Parece ser que este proceso está ligado a la sulfatorreducción: $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$, aunque hasta el momento no se ha aislado ningún grupo único de bacterias capaces de llevar a cabo esta reacción; más bien se precisa la intervención de un consorcio de grupos (Martens y Berner, 1977; Reeburgh, 1980; Alperin y Reeburgh, 1985).

La mayoría de los procesos biogeoquímicos en sedimentos marinos están controlados en última instancia por el flujo y el tipo de materia orgánica reactiva; en el caso de la metanogénesis y la desnitrificación por la disponibilidad y la naturaleza de compuestos reducidos de carbono. El 70% de las bacterias metanogénicas utilizan compuestos de carbono simples como el acetato en sedimentos de agua dulce (Fenchel y Blackburn, 1979), mientras que en sedimentos marinos el 28% se utilizan compuestos metilados (metanol y metilaminas entre otros) (Le Mer y Roge, 2001). La magnitud de estos procesos y su distribución espacial, atienden a los cambios de temperatura del sedimento. En estuarios, las fluctuaciones de temperatura del sedimento son importantes, ya que por acción de la marea, sufren oscilaciones a lo largo del día. Las bacterias metanogénicas y desnitrificantes están adaptadas a un amplio rango de temperaturas, las primeras pueden actuar en un rango entre 9 y 110° C (Stetter, 1992; Huber et al., 1994), aunque su óptimo oscila entre 30 y 40° C (Le Mer y Roger, 2001). Las segundas pueden ser psicrófilas, mesófilas y termófilas, y se ha observado que su actividad aumenta el doble entre los 15 y 35° C, disminuyendo por encima de 45° C (Stanford et al., 1975).

4. Justificación del Trabajo. Hipótesis y Objetivos

En la cuenca del río Palmones (Bahía de Algeciras, Cádiz) se lleva realizando una labor de investigación desde hace más de 25 años. Los estudios se han abordado desde distintas perspectivas con objeto de tener una visión global del funcionamiento de este ecosistema que supone un modelo representativo de cuenca somera de pequeño tamaño en el Mediterráneo. Los esfuerzos se han centrado principalmente en el estuario, estudiando la dinámica de los nutrientes, especialmente el ciclo del fósforo, y su relación con el grado de eutrofización considerando los aportes del río (Avilés, 2002), la influencia de la marea (e.g. Clavero et al., 1997, 1999, Izquierdo 2001) y el papel de la marisma como fuente de materia orgánica (Palomo, 2004). Se han realizado también estudios más concretos con carácter descriptivo sobre la fauna (e.g. López-Figueroa y Niell, 1987; Guevara y Niell, 1990; Clavero et al., 1991), y sobre la ecofisiología de macrófitos (e.g. Pérez-Llorens et al., 1989, 1993, Palomo et al., 2004) y tapetes microbianos (Carrasco, 2006) que han ayudado a comprender los distintos procesos que tienen lugar en la cuenca.

A pesar de que el estuario del río Palmones está sometido a una fuerte carga antropogénica y presentar un alto grado de eutrofización, no se había evaluado hasta el momento el papel que juega el sedimento del estuario en la regeneración bentónica de nutrientes en forma gaseosa (metano, óxido nitroso, etc.) durante la descomposición anaeróbica de la materia orgánica y su relevancia en la química atmosférica relacionada con el cambio climático; aspecto importante, pues las aportaciones externas de nutrientes a la que están sometidos los estuarios aceleran los ciclos biogeoquímicos, intensificando el papel de éstos en la retirada de nutrientes del sistema y su liberación a la atmósfera. Algunos estudios anteriores en el estuario apuntan la importancia de la desnitrificación en el reciclado de nutrientes basados en cálculos de balance a partir de la concentración de nutrientes en el sedimento (e.g. Clavero 1992; Palomo 2004; Niell 2005) y hay constancia de una primera tentativa en el estudio de la desnitrificación *in situ* del estuario mediante cromatografía de gases llevada a cabo por García en 1997 (comunicación personal).

Según estos antecedentes, consideramos como punto de partida los procesos de degasificación en el sedimento de óxido nitroso y nitrógeno molecular; sin embargo, para tener una visión más completa de la implicación del estuario en el cambio climático por emisión de gases con efecto invernadero, también se analiza la dinámica del metano.

La importancia de los humedales en la emisión total de metano a la atmósfera ha propiciado que los trabajos desarrollados en sedimentos marinos sean muy escasos. Además, durante mucho tiempo se ha considerado que desempeña un papel modesto en la emisión global de metano; por ello, la mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo en suelos y sedimentos de turberas, arrozales y lagos con la intención de estimar la tasa de emisión de metano y valorar los principales factores ambientales (e.g. Rejmankova y Post, 1996; Watson y Nedwell, 1998; Furtado y Casper, 2000) y ecológicos (e.g. Watson et al., 1997; Kotelnidova, 2001; Bazhin, 2003) que controlan su producción y emisión a la atmósfera. La literatura es bastante limitada en sedimentos marinos. En cambio, los trabajos de desnitrificación en estuarios son más abundantes dada la importancia que éstos tienen en el reciclado de los compuestos nitrogenados que reciben los ríos en exceso derivados de la actividad humana (e.g. Nixon et al., 1996).

Los estudios más recientes (e.g. Bane et al., 1994, 1998; Lambert y Smith, 1993; Hovland et al., 1993) han demostrado que algunos estuarios son una importante fuente de emisión a la atmósfera de metano dentro de los sistemas marinos por los grandes aportes de nutrientes que reciben de origen antropogénico (e.g. Abril y Iversen, 2002). Por tanto, resultó evidente la necesidad de replantearse el papel que los estuarios desempeñan en la emisión global de metano a la atmósfera y su incidencia en el cambio climático. Abordar la dinámica del metano en estuarios, como hacemos en este trabajo, supone dar un nuevo enfoque a los estudios de emisión de gases con efecto invernadero.

A la hora de plantearnos la hipótesis de trabajo tenemos que considerar que el estuario no es un sistema homogéneo. Grosso modo se puede diferenciar la parte

terrestre, constituida por la marisma, del caño. Sus sedimentos tienen unas propiedades fisicoquímicas muy diferentes al estar gobernados por condiciones ambientales distintas. El sedimento del caño que limita con la marisma, depende directamente de la acción de la marea, emergiendo diariamente grandes extensiones de sedimento durante la bajamar (sedimento del intermareal). Son sedimentos algo básicos, muy reductores y anóxicos a partir del primer milímetro, todo a causa de la influencia directa que ejerce la marea en ellos. Aquí se establece un patrón de distribución de macrófitos en dirección a la parte terrestre donde se disponen estacionalmente algunas especies de *Ulva* sp. (*U. olivascens* y *U. dangeardii*), a continuación *Rhizoclonium riparium*, y bordeando la marisma algunas especies de *Enteromorpha* sp. (*E. intestinalis* y *E. prolifera*). En la marisma se establece un gradiente topográfico atendiendo a la frecuencia de inundación por la pleamar y en la que pueden diferenciarse distintos niveles, la zona más baja inundada diariamente donde se dispone *Sarcocornia perennis* subsp. *perennis*, por encima una zona que se inunda frecuentemente y dominada por praderas de *Sarcocornia perennis* subsp. *alpini*, seguida de una zona de inundación eventual donde se encuentra *Sarcocornia fruticosa* y la zona más elevada que sólo se moja ocasionalmente durante episodios de mareas vivas que está dominada por *Arthrocnemum macrostachyum*, y donde aparecen algunas lagunas con carácter estacional y amplias manchas de tapetes microbianos (*Microcoleus chthonoplastes*) que se distribuyen tanto en el interior como alrededor de las lagunas y entre las plantas (Palomo, 2004; Carrasco, 2006). El sedimento de la marisma, a pesar de su heterogeneidad, en general es menos reductor, más ácido y oxigenado, y con mayor contenido en nitrato y sulfato que el intermareal.

La heterogeneidad de ambientes del estuario, hace que consideremos tres zonas a la hora de estudiar la producción y degasificación del sedimento: el intermareal, la parte baja de la marisma próxima al caño y cubierta de macrófitos, y la parte alta próxima a las lagunas donde se disponen los tapetes microbianos. Según estas consideraciones, planteamos que en el sedimento del intermareal la sulfatorreducción debe ser la principal vía de descomposición anaeróbica de la materia orgánica; en cambio, en la marisma debe prevalecer la desnitrificación y, por tanto, la pérdida gaseosa de N (óxido nitroso y/o nitrógeno molecular). En ambos

ambientes, la metanogénesis debe ser el último paso en la descomposición de la materia orgánica.

Es en este marco donde nos planteamos los siguientes objetivos:

- Desarrollo del método de análisis (cromatografía de gases) y diseño experimental para estudiar la producción y emisión de metano, óxido nitroso y nitrógeno molecular en el sedimento del estuario.
- Estudiar *in situ* la producción y emisión a la atmósfera de estos gases.
- Identificar y evaluar el efecto de los principales factores de control en su formación.
- Valorar la importancia de las relaciones que se establecen entre la metanogénesis y los principales procesos de descomposición anaeróbica de la materia orgánica en el sedimento (desnitrificación y sulfatorreducción).
- Evaluar la capacidad de producción y degasificación del estuario y su incidencia en la atmósfera.

2. Marco Geográfico y Estrategia de Muestreo

1. Descripción del Área de Estudio
2. Estrategia de Muestreo

1. Descripción del Área de Estudio

El río Palmones se encuentra en la provincia de Cádiz, y junto con el río Guadarranque es el más importante del Campo de Gibraltar, con una cuenca de 302 Km² y una longitud de 42.3 Km (Figura 2.1). Nace en la Sierra de Montecoche y desemboca en la bahía de Algeciras, entre la pedanía de Palmones (Los Barrios) y Algeciras. La cuenca está constituida por casi 1000 afluentes; muchos de los cuales no presentan caudal la mayor parte del año. Los más importantes están regulados por conducciones que desembocan en la presa de Charco Redondo situada a 23 Km de la desembocadura. En la parte baja del río, a 5.6 Km de la desembocadura, se encuentra otra estructura reguladora, un azud que frena el ascenso de agua marina marcando el límite entre el río y el estuario. La parte alta del río forma parte del Parque Natural de los Alcornocales, el resto discurre a través de campos de cultivos y bosques de rivera.

El canal principal que discurre por el estuario, tiene una extensión total de 5.6 Km desde la bocana hasta el azud, una anchura media de 75 m y una profundidad entre 1.5 y 2 m en marea baja. Clavero et al. (1997) clasifican el estuario como bien mezclado, dominado por las mareas, que tienen una amplitud media de 1 metro, y con valores de salinidad que oscilan entre 29 y 35.

Al margen derecho del canal se dispone la marisma que se extiende alrededor y en el centro del estuario. Una parte, 58 de las 100 hectáreas que la componen, ha sido declarada Paraje Natural por la Conserjería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Está irrigada por numerosos canales y posee unas 74 lagunas, la mayoría de carácter temporal ocupando el 2% de su superficie. El resto lo ocupan praderas de vegetación arbustiva de carácter halófito, fundamentalmente las quenopodiáceas perennes de los géneros *Sarcocornia* y *Arthrocnemum* que se distribuyen en un claro gradiente (Palomo 2004). También aparecen tapetes microbianos entre la vegetación que se desarrolla próxima a las lagunas y en su interior (Carrasco, 2006).

El estuario del río Palmones puede ser considerado como un ambiente extremo por su alto grado de eutrofización (Clavero et al., 1999). La eutrofización se

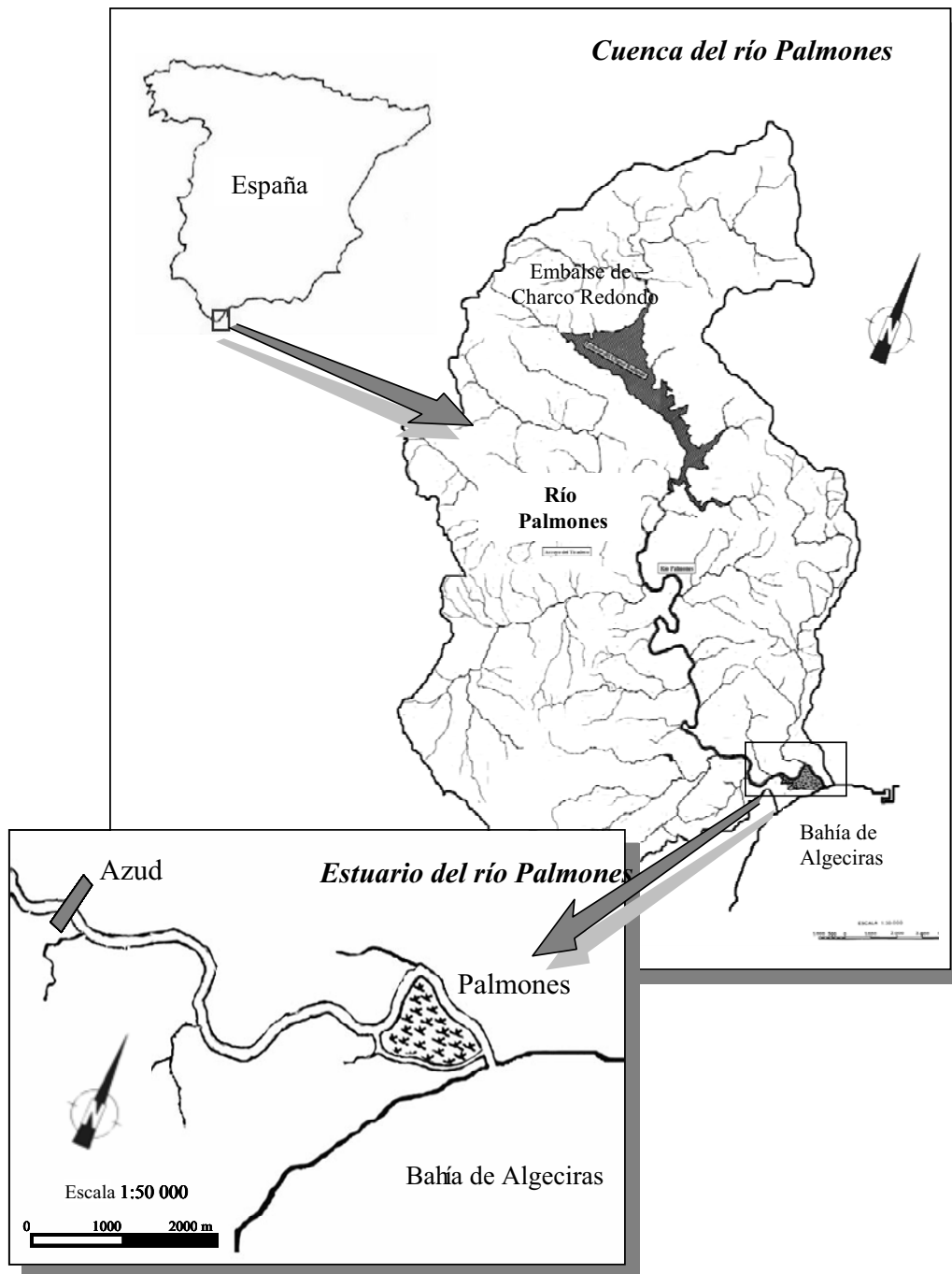


Figura 2.1.- Mapa de la cuenca y del estuario del río Palmones

ha favorecido por sus condiciones climáticas y la fuerte presión antropogénica a la que está sometida toda su cuenca. En general, predominan inviernos cálidos con abundantes precipitaciones, y veranos con altas temperaturas, escasas precipitaciones y alta tasa de evaporación. En los últimos años se ha dado una gran variabilidad interanual con largos periodos de sequía.

Además de las estructuras reguladoras de las que antes hemos hecho mención (presa y azud), el río está sometido a vertidos procedentes de las plantas de tratamientos de aguas residuales (EDAR) de algunos municipios colindantes, a lixiviados del vertedero de Los Barrios, y a vertidos industriales de las empresas ubicadas en las cercanías del estuario.

2. Estrategia de Muestreo

La heterogeneidad de ambientes característica del estuario del río Palmones, exige la elección de una estrategia particular a la hora de evaluar la dinámica de la formación de gases en el estuario, más aún si se tiene en cuenta que la variabilidad de los procesos que tienen lugar en el sedimento cobra mayor importancia a pequeña escala (Moreno y Niell, 2003). Se podría haber elegido en función de los distintos niveles topográficos de la marisma para después tener una conclusión global suma de todos ellos, sin embargo, se optó por un enfoque menos repetitivo y más representativo que atendiera a los ambientes más extremos que surgen dentro del estuario. Así, se han tomado tres estaciones de muestreo (Figura 2.2):

- las amplias zonas de sedimento próximas al caño que emergen diariamente con la frecuencia de la marea y a la que a partir de este momento se hará referencia a ella como **sedimento del intermareal**,
- la zona intermedia de la marisma, de inundación esporádica y donde se encuentran diversas especies del género *Sarcocornia* como *S. perennis* subsp. *alpini* y *S. fruticosa*, que se citará en el texto como la **zona baja de la marisma**

cubierta por vegetación, o simplemente **vegetación** en el caso de las figuras,

- y la zona más elevada de la marisma, ocasionalmente sometida a la marea, y próxima a las lagunas de carácter temporal donde se desarrollan los tapetes microbianos entre la quenopodiácea *Arthrocnemum macrostachyum*, y a la que llamaremos **zona alta de la marisma cubierta de tapetes**, o de forma abreviada en las figuras, **tapete**.



Figura 2.2.- Fotografía de las zonas de estudio: sedimento intermareal y marisma (zona baja cubierta por vegetación y alta cubierta por tapetes).

Algunos de los estudios que se llevaron a cabo precisaron la toma de muestras de sedimento en el río; es el caso de los experimentos de producción de gases en relación con la disponibilidad y tipo de sustrato en el sedimento, y de inhibición de la metanogénesis por sulfato y salinidad desarrollados en el capítulo 4 (apartados 2.3.4 y 2.3.5) de esta memoria. Esta estación de muestreo externa se encuentra justo antes del azud de CELUPAL, a unos 5 Km de la desembocadura. Se elige por ser la estación de agua dulce más próxima al estuario que ha sido estudiada previamente (Avilés, 2002). Haremos referencias a esta zona como **sedimento del río**.

En el estuario de Palmones, aunque es un modelo ideal de estudio, por su pequeño tamaño no se genera un gradiente de salinidad espacial, uno de los factores que precisamente debería influir en la dinámica de gases. Ante la imposibilidad estudiar *in situ* el efecto de la salinidad en la producción de metano, se lleva a cabo un experimento en el laboratorio incubando sedimento del río al que se le adiciona cloruro sódico a concentraciones crecientes y, de este modo, generar un rango de salinidad comprendido entre 0 y 35. Las conclusiones que se obtienen experimentalmente no se podían contrastar *in situ*, siendo necesaria la elección de otro marco de estudio. El estuario del río Tajo (Lisboa), se presenta como un sistema natural alternativo idóneo por su localización geográfica y su gran extensión. Es uno de los estuarios de mayor superficie de la costa oeste del Atlántico europeo, con 320 Km². Al sur y al este del estuario, destacan amplias zonas de sedimento intermareal rodeado de marismas de gran extensión. En ella se desarrolla una gran riqueza de comunidades de plantas típicas de marisma, entre las que se encuentran *Spartina maritima*, *Halimione portulacoides* y *Arthrocnemum fruticosum* dispuestas en una clara zonación. Presenta mareas semidiurnas con una amplitud media de 2.4 m, aunque oscila entre 0.9 y 4.1 m. Por su gran extensión, se encuentran zonas de características muy diversas; algunas están incluidas dentro de la Reserva Natural del río Tajo, mientras que otras están muy próximas a zonas industriales y urbanas, recibiendo una importante carga de nutrientes (Caçador et al., 2004).

Durante una estancia de un mes (septiembre 2007) en el Instituto de Oceanografía de la Facultad de Ciencias (Universidad de Lisboa) y, bajo la supervisión de la profesora Isabel Caçador, se llevaron a cabo los experimentos pertinentes para comprobar el efecto de la salinidad en la producción de metano a lo largo de un gradiente de salinidad en el estuario del río Tajo. Las estaciones se eligieron atendiendo a la salinidad del lugar, cubriendo en la medida de lo posible el mismo rango que había sido estudiado experimentalmente: 0 en Vila Franca, 10 en Alcochete, 25 en Pancas, 30 en Rosário y 35 en Corroios (Figura 2.3).

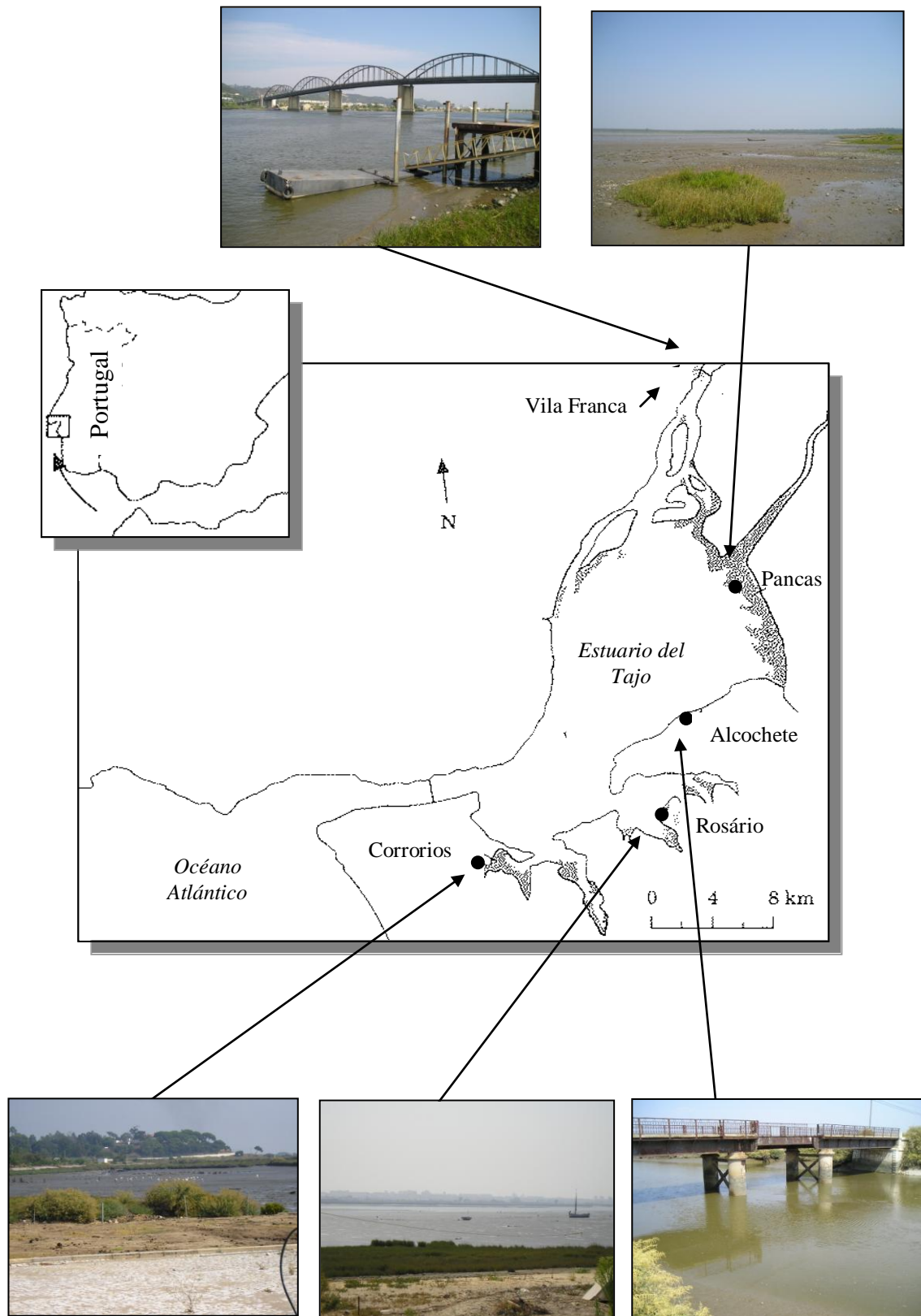


Figura 2.3.- Mapa del estuario del río Tajo (Lisboa, Portugal) y fotografías de las estaciones de muestreo.

3. Caracterización Analítica del Sedimento

1. Métodos
 - 1.1. En la fracción sólida del sedimento
 - 1.2. En el agua intersticial

2. Resultados
 - 2.1. Características generales del sedimento
 - 2.2. Nutrientes en la fracción sólida del sedimento: Carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N
 - 2.3. Contenido de materia orgánica
 - 2.4. Nutrientes y contenido de sulfato en el agua intersticial

1. Métodos

Se realizaron distintos muestreos en el tiempo para determinar las características del sedimento. Los análisis se han llevado a cabo en la fracción sólida o en el agua intersticial del sedimento. Las variables analizadas fueron:

en la fracción sólida,

- granulometría
- pH, oxígeno y potencial redox
- temperatura
- carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N
- contenido en materia orgánica

en el agua intersticial,

- nutrientes (nitrato, nitrito y amonio)
- sulfato

Estas variables también se analizaron para determinar las condiciones iniciales del sedimento en cada experimento.

Las muestras se tomaron mediante la toma de cilindros de PVC (cores) de 4.5 cm de diámetro y 20 cm de largo que mantienen la estructura vertical intacta para el estudio del sedimento en profundidad (Butman et al., 1986; Bender et al., 1987). Se insertan a mano en el sedimento, se cierran con tapones de silicona y se transportan a 4° C al laboratorio. Se toman tres cilindros a modo de réplicas en cada punto y se considera una única fracción de 10 cm de profundidad atendiendo a que la máxima concentración bacteriana se encuentra a 6 cm de profundidad (Clavero et al., 1999), y a la máxima actividad metanogénica a 10 cm (Oremland et al. 1982, King et al., 1983, Heyer et al., 1990).

Para el análisis de la fase sólida del sedimento (relación C:N, y contenido orgánico del sedimento y azufre total), una parte de la muestra se seca a 60° C y se pulveriza haciéndola pasar por un tamiz de 0.125 mm de malla con el fin de obtener

una muestra homogénea. El resto de la muestra se centrifuga a 5000 rpm durante 15 min para extraer el agua intersticial. Se pasa por un filtro Whatman GF/F y se congela hasta su posterior análisis.

1.1. En la fracción sólida del sedimento

1.1.1. Granulometría

El análisis granulométrico consiste en separar las distintas fracciones minerales del sedimento de acuerdo al tamaño de las partículas. Éstas se clasifican según una escala establecida en la fracción gruesa, que la componen las gravas (de diámetro >2 mm) y las arenas (entre 2 y 0.063 mm), y la fracción fina, compuesta por los limos (entre 0.063 y 0.002 mm) y las arcillas (de diámetro <0.002 mm).

Se tratan porciones de sedimento seco de 100 g de peso con peróxido de hidrógeno al 30% para oxidar la materia orgánica. Se disgregan las partículas inferiores a 2 mm con 100 ml de calgón (NaPO_3) al 5%. Posteriormente, para separar la fracción gruesa de la fina se procede al lavado del sedimento, pasándolo a través de un tamiz de 0.063 mm. La fracción gruesa queda retenida en el tamiz y la fina en el agua. Seguidamente se secan y se pesan.

1.1.2. pH, potencial redox y oxígeno

Los perfiles de pH, Eh y oxígeno en el sedimento se realizaron a partir de cores tomados en el sedimento intermareal, y en las dos zonas de la marisma con microelectrodos *Unisense PH-100*, *RD-100* y *OX 100*, respectivamente (Figura 3.1). La medición de pH y Eh requiere además, el uso de un microelectrodo de referencia *Unisense REF*. Estos perfiles se realizaron en los primeros 10 cm del sedimento en dos épocas diferentes del año, invierno y primavera, atendiendo a la temperatura y al grado de humedad del sedimento. Estas variables cambian bruscamente en los primeros cm, por ello los perfiles se realizaron cada cm desde la superficie hasta los 3 cm, y luego cada dos.

Estos microelectrodos presentan una punta con un diámetro de 100 μm lo que nos permitió trabajar con una gran resolución espacial.



Figura 3.1.- Fotografía del registro de los perfiles de pH, Eh y oxígeno con microsensors en el sedimento (tomada de Palomo, 2004).

1.1.3. Temperatura

Por primera vez se lleva a cabo un seguimiento continuado de la temperatura del sedimento *in situ* en las zonas más representativas del estuario (sedimento del intermareal, marisma baja cubierta de vegetación y marisma alta cubierta de tapetes

microbianos). El registro se obtiene colocando termistores del tipo HOBO Water Temp Pro a unos 2 cm de la superficie. Estos sensores permiten tomar la temperatura del sedimento con una frecuencia de 15 min. Están operativos desde el 1 de agosto de 2006, aunque en esta memoria sólo se muestran los datos correspondientes a un año. Los datos se descargaron a un ordenador donde se realizó el tratamiento previo del mismo con el software BoxCar Pro 4.3.

1.1.4. Carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N

El contenido total de carbono, nitrógeno y azufre del sedimento de todas las muestras se analizó con un autoanalizador elemental CNH Perkin-Elmer 240-C a 950° C, y se expresó en mg g⁻¹PS. La relación C:N se expresó como relación estequiométrica (molar).

1.1.5. Contenido de materia orgánica

El contenido orgánico del sedimento se estimó por ignición a 550° C durante 3 h. Los datos se expresan como el porcentaje de materia orgánica obtenidos por diferencia de peso entre la muestra secada a 60° C y después de su combustión, según indica Parker (1983), respecto a la muestra seca.

1.2. En el agua intersticial

La concentración de nutrientes y de sulfato, uno de los iones responsables de la salinidad del agua del sedimento, oscila mucho durante el año atendiendo a la inundación por la marea, las tasas de evaporación, al crecimiento y desarrollo de las plantas, y a otros procesos metabólicos y fisicoquímicos. Por esta razón, las muestras se tomaron en distintos meses representando las cuatro estaciones del año (noviembre de 2006, enero, marzo, mayo y julio de 2007).

1.2.1. Nutrientes (nitrato, nitrito y amonio)

La concentración de nutrientes en agua intersticial del sedimento se determinó con un autoanalizador de flujo automatizado BRAN & LUEBBE Technicon TRACCS 800.

Para las medidas de nitrato y nitrito se empleó el método industrial n° 818-871, basado en los de Shinn (1941) y Wood et al. (1967); para las de amonio el n° 786-861, basado en el de Slawyk y MacIsaac (1972).

1.2.2. Sulfato

La concentración del anión sulfato se determinó con un equipo de cromatografía iónica METROHM (separador 733 IC Separation Center, detector por conductividad 732 IC Detector y la columna Metrosep Anion Dual-2).

2. Resultados

2.1. Características generales del sedimento

2.1.1. Granulometría

En la figura 3.2, se muestran los resultados del **análisis granulométrico** obtenido en cada sedimento. Los datos se han agrupado en arenas, limos y arcillas, sin distinguir la fracción de gravas, pues sólo está presente en el sedimento intermareal en un porcentaje muy pequeño ($0.35 \pm 0.06\%$). Domina la fracción fina (limos y arcillas) en las tres zonas. En el sedimento intermareal el material limoso representa el $44.36 \pm 9.48\%$, y el arcilloso el $23.93 \pm 0.89\%$. En el sedimento de la marisma hay una mayor dominancia del material limoso que en del intermareal, $96.40 \pm 2.19\%$ en la zona de vegetación, y un $75.52 \pm 8.62\%$ en la de tapete; aunque el análisis estadístico no muestra diferencias significativas. En cambio, si son significativas entre el intermareal y la marisma (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

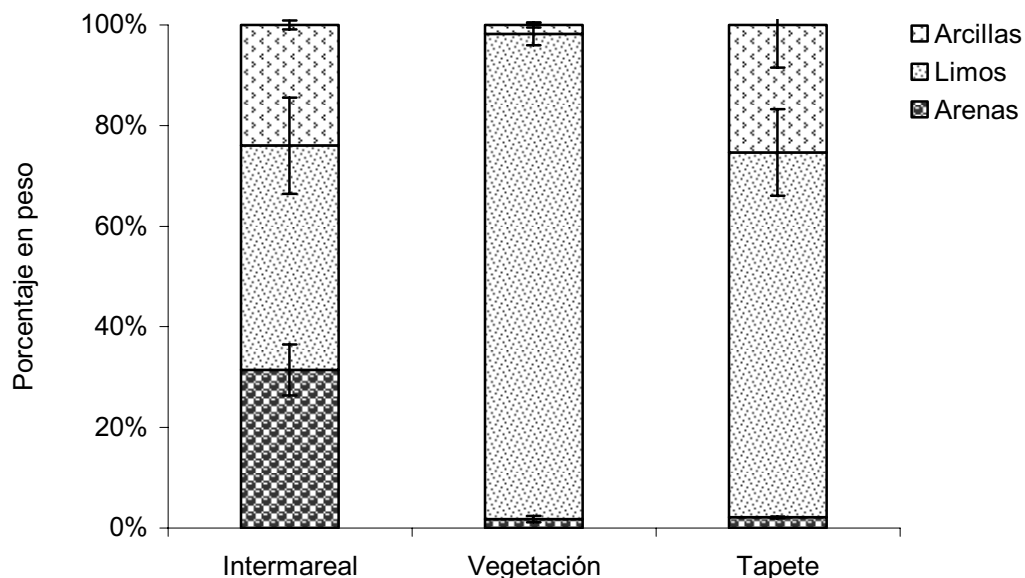


Figura 3.2.- Porcentaje en peso de arenas, limos y arcillas en el sedimento del intermareal y de la marisma.

2.1.2. pH, potencial redox y oxígeno

Las variaciones de **pH** son significativas en los sedimentos, en profundidad y en el tiempo (ANOVA, $P < 0.05$) (Figura 3.3). En profundidad, se distingue una zona más o menos homogénea a partir de los 3 cm, tanto en invierno como en verano en torno a 5.6, 6.2 y 7.2 de pH en sedimento de la zona de plantas de la marisma, la de tapete y el intermareal, respectivamente.

Las diferencias estacionales se establecen en superficie. En invierno, el sedimento del intermareal presenta un pH más alcalino que el de la marisma. Alcanza un valor máximo de 8.28 en superficie y un mínimo de 6.80 a 1 cm de profundidad. En la

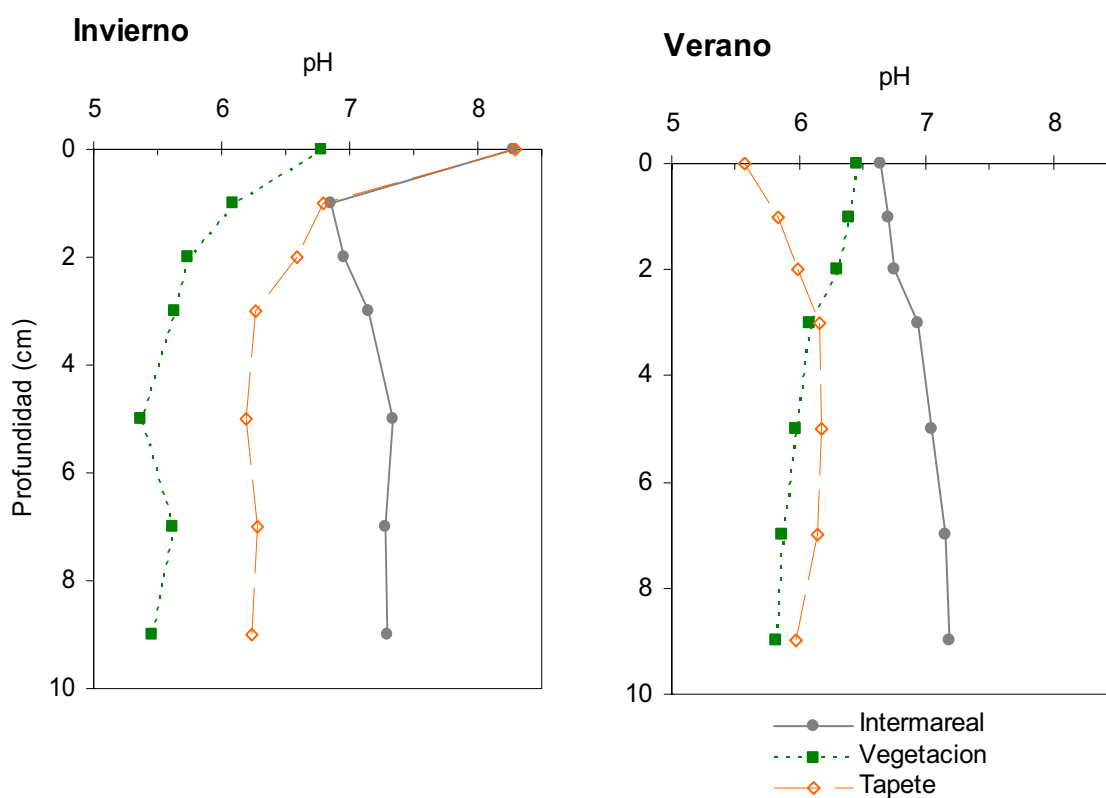


Figura 3.3.- Perfil de pH en el sedimento intermareal y la marisma (zona de vegetación y tapete) en invierno y verano.

marisma, el pH es más ácido en la parte baja cubierta de vegetación que en la de tapete. En superficie, el pH es de 6.78 y disminuye gradualmente en los 5 primeros cm hasta alcanzar un mínimo de 5.63, a partir del cual se mantiene más o menos homogéneo. En la zona de tapete, el pH disminuye drásticamente de 8.29 en superficie a 6.27 a los 4 cm de profundidad, manteniéndose más o menos alrededor de este valor en el resto del sedimento.

En verano, las condiciones de pH cambian en los 3 primeros cm del sedimento. En general, los pH son más ácidos que en invierno. En el intermareal, se registra el mínimo, 6.65, en superficie y aumenta ligeramente hasta 7.19 a 9 cm. En la zona de vegetación de la marisma, disminuye de 6.45 en superficie a 5.82 a 9 cm. En la superficie del sedimento con tapete se obtiene el valor más ácido, 5.57, que aumenta hasta 6.16 a 3 cm, y se mantiene en torno a este valor en el resto de las profundidades.

Las diferencias observadas en los perfiles de **oxígeno** en el sedimento, en profundidad y en el tiempo son significativas (ANOVA, $P < 0.05$). En invierno, los valores son inferiores al verano, debido a los largos periodos de encharcamiento del sedimento (Figura 3.4). En el sedimento intermareal el oxígeno se agota a 1 cm de profundidad. En la marisma, el oxígeno se reduce rápidamente pero sin llegar a una situación de anoxia absoluta. En la zona con tapete, se alcanza el mínimo (en torno a $8 \mu\text{M}$) a los 3 cm, mientras que en la zona con vegetación se alcanza a los 9 cm, también en torno a $8 \mu\text{M}$.

En verano, el sedimento del intermareal también alcanza la anoxia en el primer cm. En cuanto a la marisma, el contenido de oxígeno aumenta considerablemente respecto al invierno. En este caso, el valor mínimo alcanzado varía, aproximadamente, entre 85 en la zona de tapete y $110 \mu\text{M}$ en la de vegetación.

El **potencial redox** (Eh) del sedimento también varía significativamente por zonas, en profundidad y en el tiempo (ANOVA, $P < 0.05$) (Figura 3.5).

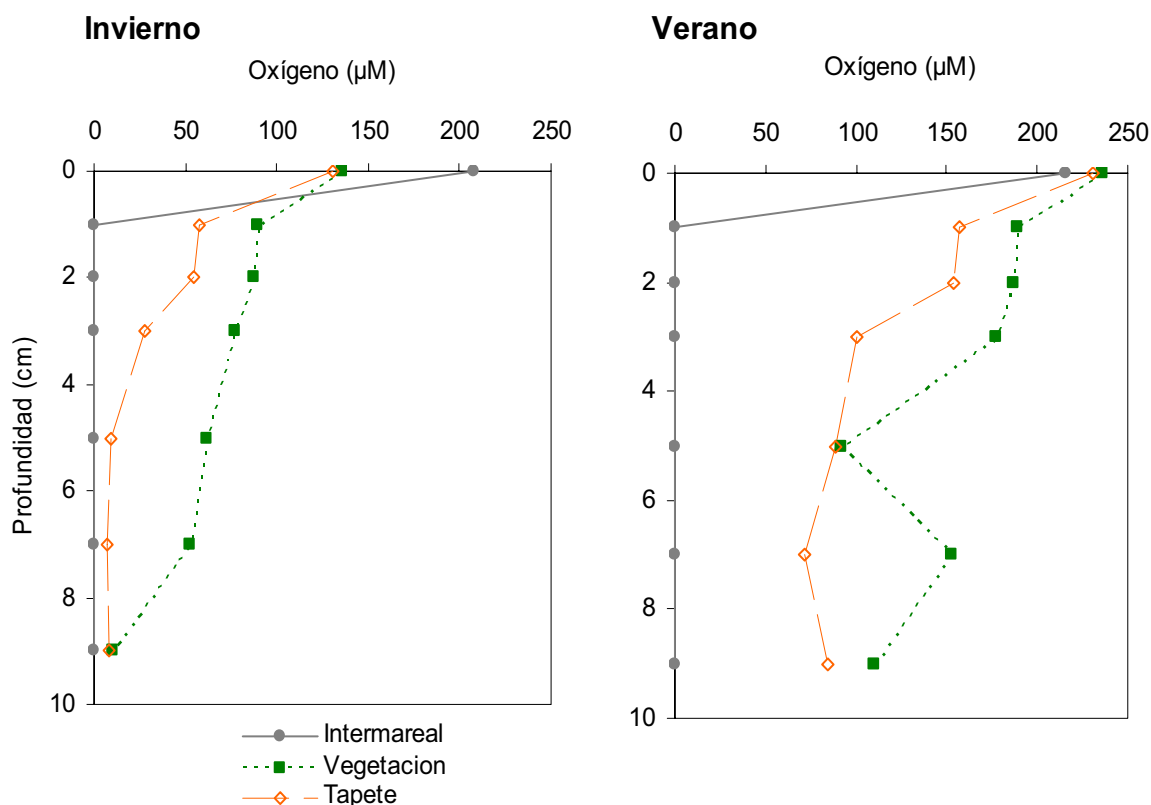


Figura 3.4.- Perfil de la concentración de oxígeno (μM) en el sedimento intermareal y la marisma (zona de vegetación y tapete) en invierno y verano.

En invierno, las condiciones de oxido-reducción del sedimento del intermareal cambian drásticamente en los 2 primeros cm del sedimento, de 181 a casi -381 mV. A partir de esta profundidad el Eh varía entre -376 y -420 mV, aproximadamente. En la marisma, los valores son siempre positivos, cercanos a 100 mV en superficie y aumenta en profundidad (en torno a 215 mV).

En verano, el intermareal mantiene potenciales muy negativos en todo el perfil. En la marisma se produce un aumento del carácter oxidante del sedimento en los 2 primeros cm, registrándose Eh de hasta 215 mV.

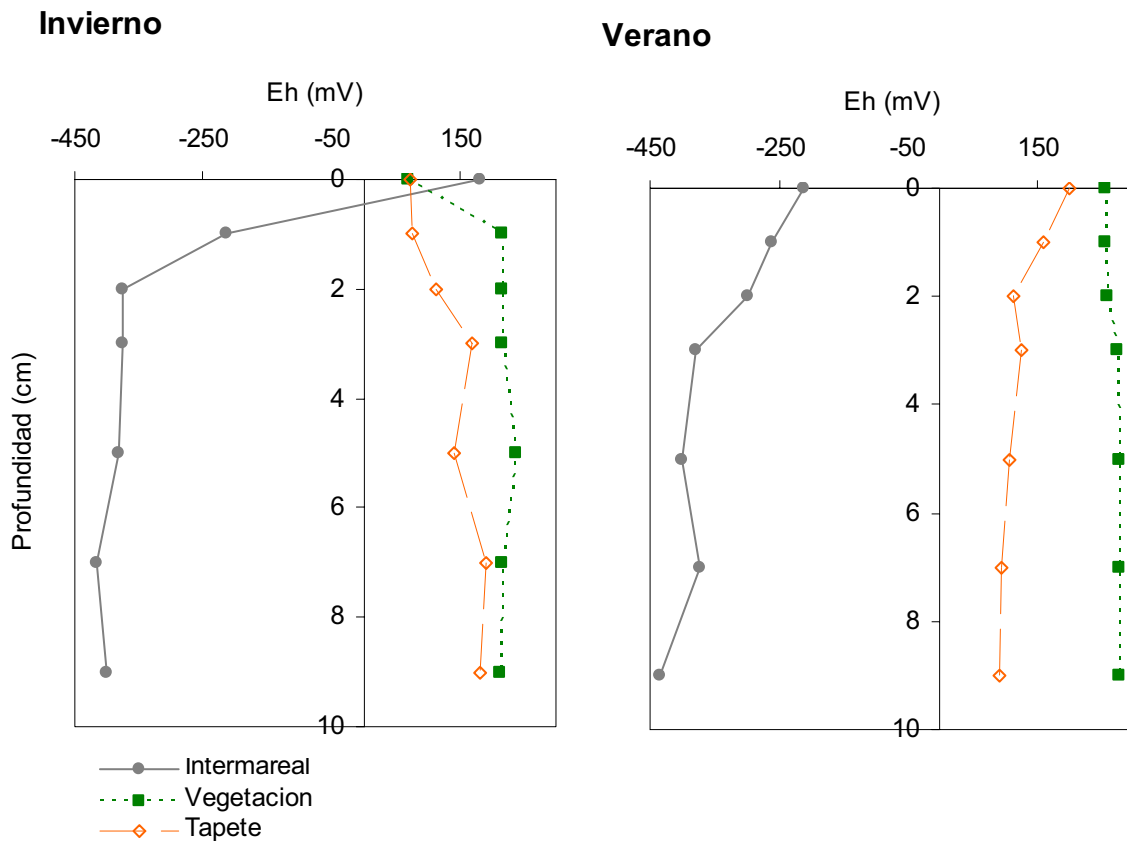


Figura 3.5.- Perfil del potencial redox (mV) en el sedimento intermareal y la marisma (zona de vegetación y tapete) en invierno y verano.

2.1.3. Temperatura

En la tabla 3.1, se recoge **la temperatura** media mensual durante el periodo de registro en las tres zonas. Según el análisis de la varianza, la temperatura media mensual no difiere en profundidad pero sí, como es esperable, estacionalmente (ANOVA, $P < 0.05$).

La temperatura máxima y mínima mensual del sedimento intermareal y de la marisma se muestra en la figura 3.6. De mayo a septiembre, se obtienen las temperaturas más altas, alcanzándose el máximo en el mes de julio en las tres zonas. El sedimento de la marisma cubierto de tapete, al tener menor influencia de la marea y estar directamente en contacto con la atmósfera, registra la temperatura más

| Temperatura media mensual del sedimento (° C) | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | intermareal | vegetación | tapete |
| ago-06 | 24.27 ± 3.04 | 24.14 ± 2.67 | 23.97 ± 2.79 |
| sep-06 | 22.62 ± 2.88 | 22.25 ± 2.44 | 21.91 ± 2.12 |
| oct-06 | 19.73 ± 1.72 | 19.67 ± 1.48 | 19.64 ± 1.33 |
| nov-06 | 16.74 ± 2.21 | 16.22 ± 2.47 | 16.30 ± 2.00 |
| dic-06 | 12.52 ± 2.10 | 12.09 ± 2.53 | 12.44 ± 1.96 |
| ene-07 | 11.36 ± 2.16 | 10.77 ± 2.79 | 10.91 ± 1.78 |
| feb-07 | 13.84 ± 2.45 | 13.34 ± 2.16 | 12.87 ± 1.72 |
| mar-07 | 14.40 ± 2.78 | 14.07 ± 3.10 | 12.93 ± 2.43 |
| abr-07 | 16.65 ± 3.03 | 16.02 ± 3.45 | 14.98 ± 2.94 |
| may-07 | 20.01 ± 4.12 | 19.77 ± 3.64 | 18.79 ± 4.25 |
| jun-07 | 22.82 ± 4.15 | 23.78 ± 3.67 | 23.73 ± 5.95 |
| jul-07 | 24.73 ± 3.86 | 25.52 ± 3.70 | 27.00 ± 6.42 |

Tabla 3.1.- Temperatura media mensual en el sedimento del intermareal y la marisma (zona de vegetación y tapete) durante un año (agosto 2006-julio 2007).

elevada, casi 47° C frente a los 42° C de la zona de plantas. En cambio, en el intermareal la temperatura máxima es más suave, próxima a 36° C. En cuanto a los mínimos, oscilan entre algo menos de 4° C y 20° C, aproximadamente, sin existir diferencias significativas en el sedimento, pero sí en el tiempo. En el anexo pueden consultarse algunos registros brutos de temperatura a modo de ejemplo.

El número de días al año que el sedimento alcanza o supera los 35° C, depende de la zona. En el intermareal, son 3 días, mientras que en la marisma varía entre 77 en la zona de vegetación, y 157 en la de tapete. Teniendo en cuenta el número de horas que el sedimento alcanza dicha temperatura cada día, el intermareal igualaría o superaría los 35° C durante 4 horas al año, la zona de vegetación de la marisma 40 y la de tapete 157.

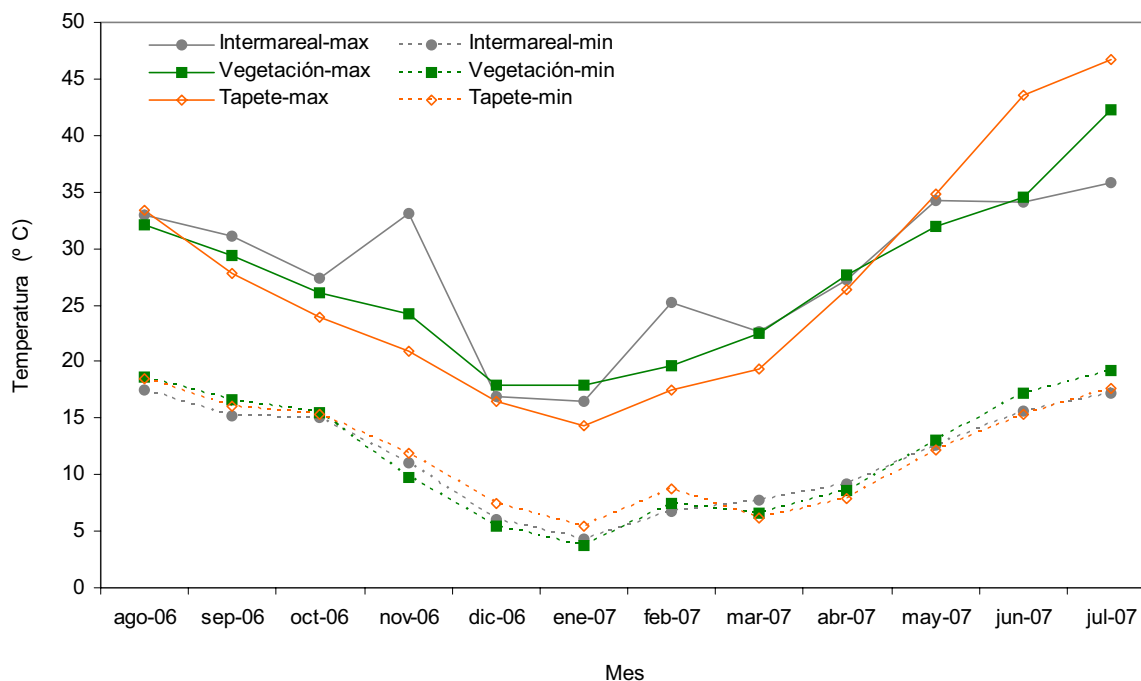


Figura 3.6.- Temperatura máxima y mínima mensual en el sedimento del intermareal y de la marisma (zona de vegetación y tapete) durante un año (agosto 2006-julio 2007).

2.2. Nutrientes en la fracción sólida del sedimento: Carbono, nitrógeno y azufre total en el sedimento. Relación C:N

En la figura 3.7 se representan las concentraciones de estos tres nutrientes en el sedimento del estuario a lo largo de un muestreo iniciado en octubre de 2005 y que finaliza en julio de 2007. Los valores de **carbono total** oscilan entre 15.63 ± 0.39 y 63.98 ± 1.27 mg C g⁻¹ps, ambas concentraciones registradas en julio de 2006 en el sedimento intermareal y de la marisma con vegetación, respectivamente. En general, las concentraciones fueron menores en el intermareal que en la marisma. En raras ocasiones superan los 30 mg C g⁻¹ps, mientras que en la marisma por lo general los valores más bajos superan los 40 mg C g⁻¹ps. En ésta se aprecia un ligero aumento de las concentraciones en el sedimento de la zona de vegetación respecto a

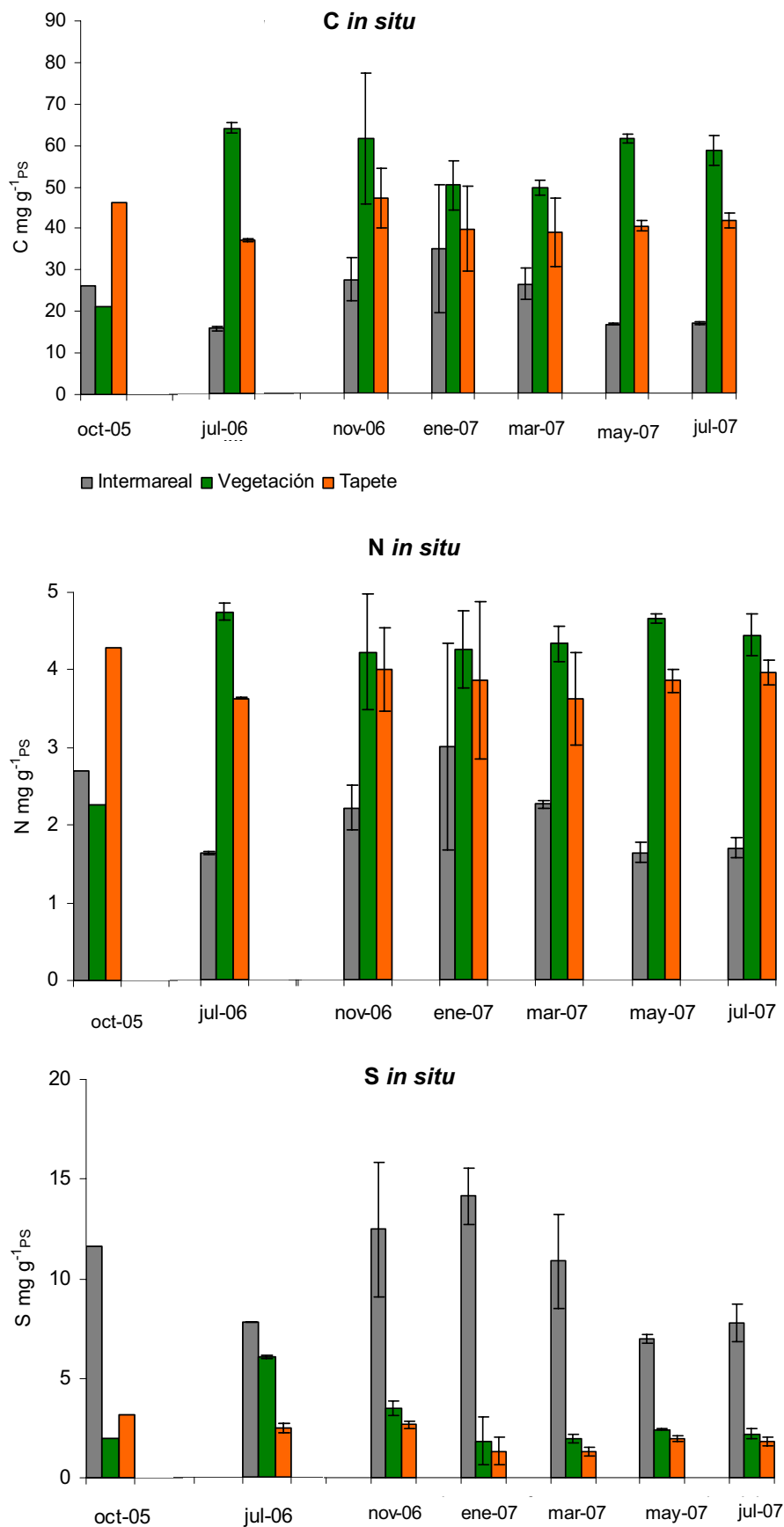


Figura 3.7.- Variación estacional del contenido total de carbono, nitrógeno y azufre en el sedimento intermareal y de la marisma (octubre 2005, julio 2006, enero, marzo, mayo y julio 2007)

la de tapete, diferencias que según el análisis de la varianza son significativamente distintas (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). En cuanto a las variaciones temporales, no resultan estadísticamente significativas.

A diferencia del carbono, las variaciones del contenido total de **nitrógeno** en los distintos sedimentos sólo resultan significativas entre el intermareal y la marisma, ya que en la zona de vegetación y de tapete de la marisma los valores fueron muy similares (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). En general, los mínimos se encuentran en el sedimento intermareal con valores que oscilan entre 1.63 ± 0.01 y 2.69 ± 0.56 mg N g⁻¹PS, y los máximos en el sedimento de la marisma cuyas concentraciones oscilan entre 2.27 ± 0.42 y 4.43 ± 0.11 mg N g⁻¹PS, correspondiendo ambas a la marisma con vegetación en octubre de 2005 y julio de 2006, respectivamente. El análisis estadístico no muestra significación estacional.

Por último, se muestra el contenido de **azufre total** en el sedimento que oscila entre los 1.44 ± 0.75 mg S g⁻¹PS registrados en el sedimento de marisma con tapete, y los 15.39 ± 1.52 mg S g⁻¹PS en el intermareal, ambos correspondientes a enero de 2007. El contenido de azufre en el intermareal y en la marisma es claramente distinto (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$), registrándose valores entre 3 y 10 veces superior en el sedimento intermareal respecto a la marisma. Una vez más, no se han producido diferencias estadísticamente significativas en el período muestreado.

Se representa **la relación** entre el **carbono y el nitrógeno total**(C:N) en el sedimento del intermareal y la marisma a lo largo del tiempo en la figura 3.8. El índice oscila entre 9.27 ± 0.02 y 15.78 ± 0.05 en octubre de 2005 y julio de 2006, ambos en sedimento de la zona de vegetación de la marisma. Los valores son similares en los distintos sedimentos, aunque ligeramente mayores en la marisma con vegetación. El análisis de la varianza corrobora que existen diferencias significativas entre esta zona y el resto (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

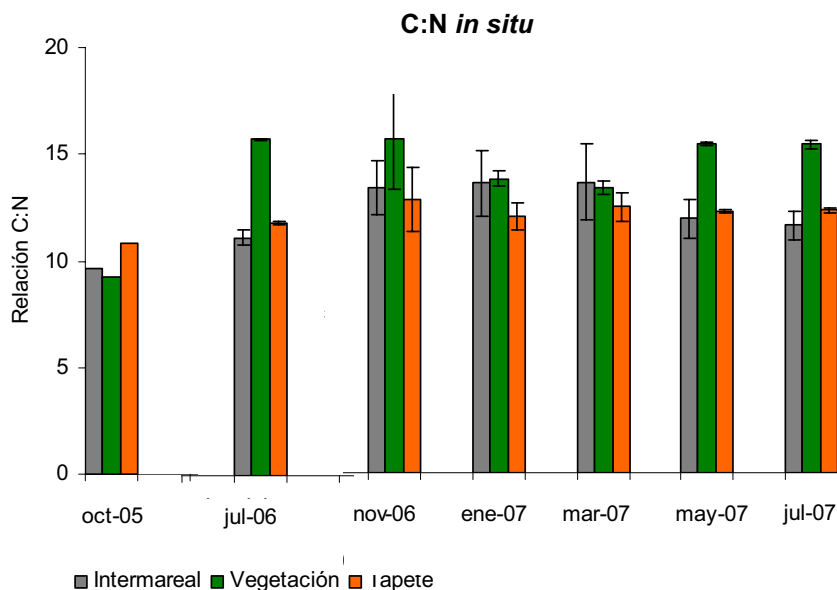


Figura 3.8.- Variación estacional de la relación C:N en el sedimento intermareal y de la marisma (octubre 2005, julio 2006, enero, marzo, mayo y julio 2007)

2.3. Contenido de materia orgánica

El contenido de materia orgánica en el sedimento varía entre las muestras de los distintos sedimentos y a lo largo del tiempo (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$), oscilando en un rango comprendido entre 4.49 ± 0.05 y $18.97 \pm 0.26\%$ en el sedimento intermareal en mayo de 2007 y a la zona la marisma cubierta de vegetación en julio de 2006 (Figura 3.9). Una vez más, el sedimento de la zona de la marisma con vegetación registra los mayores valores, en la mayoría de los casos con un contenido orgánico entre el 15 y el 20%, y el intermareal los menores, casi siempre inferior al 10%. En la zona de tapete el contenido orgánico es intermedio a estas dos zonas. Las diferencias en el tiempo varían en cada sedimento, así por ejemplo, en el intermareal las diferencias se establecen entre las muestras de invierno (enero de 2006) y primavera-verano de 2007, mientras que en la marisma no se establece un patrón claro.

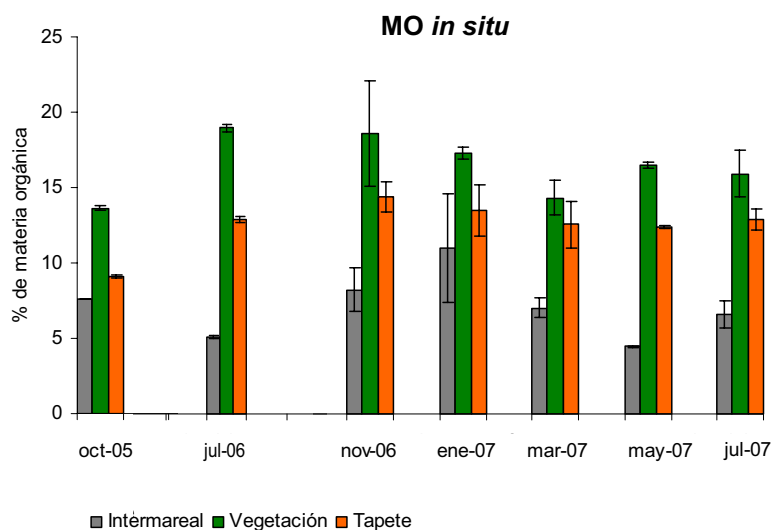


Figura 3.9.- Variación estacional del contenido en materia orgánica del sedimento intermareal y de la marisma (octubre 2005, julio 2006, enero, marzo, mayo y julio 2007)

2.4. Nutrientes y contenido de sulfato en el agua intersticial

Los resultados de la concentración de nutrientes en el agua intersticial del sedimento se muestran en la figura 3.10. En ella se observa que el **nitrito** se mueve en un rango comprendido entre 4.55 ± 1.37 y $117.64 \pm 32.56 \mu\text{M}$, valores correspondientes al mes de enero y marzo de 2007 en el sedimento del intermareal, respectivamente. En invierno-otoño, las concentraciones son más bajas que en primavera-verano, oscilando entre 4.55 ± 1.37 y $29.45 \pm 13.13 \mu\text{M}$, y entre 11.30 ± 7.26 y $117.64 \pm 32.56 \mu\text{M}$, respectivamente. Las variaciones observadas a lo largo del tiempo son estadísticamente significativas; por el contrario, no hay diferencias significativas entre los distintos sedimentos (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$), aunque se aprecien concentraciones más bajas en el intermareal.

En la misma figura se muestra la concentración de **nitrito**. Los datos varían entre 2.07 ± 0.13 y $12.57 \pm 5.53 \mu\text{M}$, correspondientes al sedimento de la marisma

con vegetación en los meses de mayo de 2007 y noviembre de 2006, respectivamente. En el sedimento intermareal se registran valores más bajos que en la marisma. Estas diferencias son estadísticamente significativas, al igual que en el tiempo, pero a diferencia del nitrato no se establece una estacionalidad clara (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

Por último en la figura aparecen reflejadas las concentraciones de **amonio**. Los resultados oscilaron entre 115.93 ± 17.56 y 1981.35 ± 307.79 μM en el sedimento de la zona de la marisma con vegetación durante el mes de marzo de 2007 y en el sedimento intermareal en noviembre de 2006, respectivamente. Al igual que en el caso del nitrito, el análisis estadístico indica que las diferencias son significativas en el tiempo, y entre el sedimento del intermareal y el de marisma (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). En esta ocasión las concentraciones fueron más altas en el intermareal donde se alcanza un máximo de aproximadamente 2000 μM frente al máximo obtenido en la marisma alrededor de 1000 μM .

La figura 3.11. presenta la variación de **sulfato** en agua intersticial del sedimento. El sulfato varía ampliamente, entre 14.74 ± 2.57 y 89.50 ± 8.84 mM que corresponden al sedimento intermareal en el mes de marzo y a la zona de la marisma con tapete en julio, respectivamente. Las concentraciones registradas en la marisma oscilaron entre 20.11 ± 6.02 y 89.50 ± 8.84 mM, llegando a duplicar a las obtenidas en el sedimento intermareal (14.74 ± 2.57 - 32.50 ± 1.12 mM). En ambas zonas se aprecia un descenso del contenido de sulfato durante el otoño-invierno hasta el inicio de la primavera, experimentando a partir de este momento un incremento considerable hasta alcanzar la máxima concentración en verano. Esta variación temporal resultó ser estadísticamente significativa, así como las observadas entre el sedimento del intermareal y la marisma (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

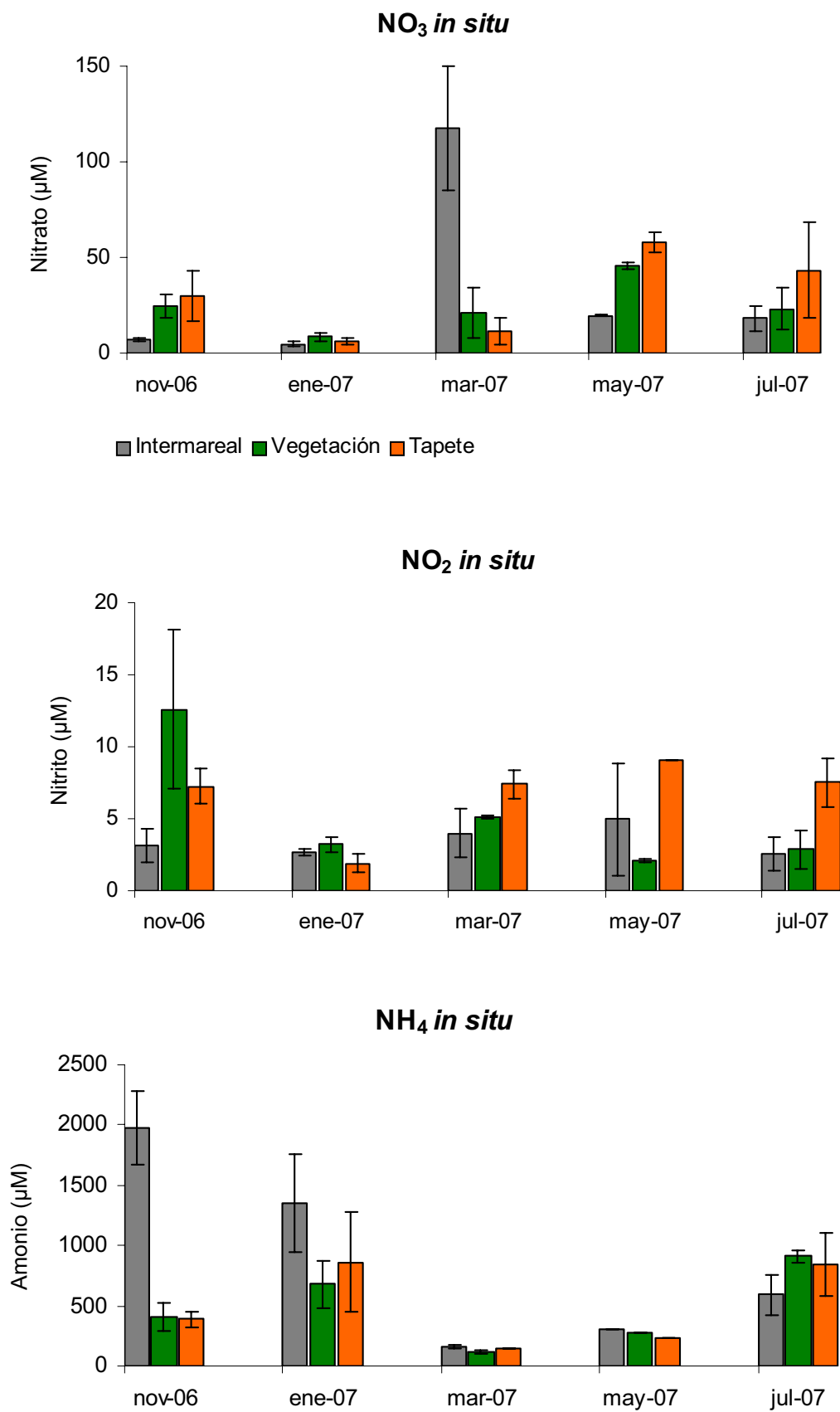


Figura 3.10- Variación estacional de la concentración de nitrato, nitrito y amonio en el agua intersticial del sedimento intermareal y de la marisma (noviembre de 2006 y enero, marzo, mayo y julio de 2007).

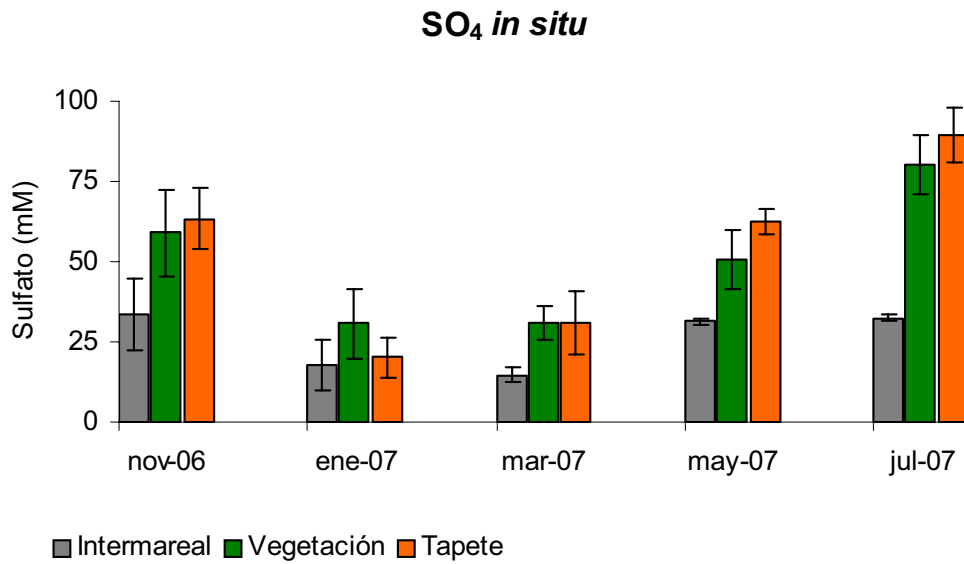


Figura 3.11.- Variación estacional de la concentración de sulfato en el agua intersticial del sedimento intermareal y de la marisma (noviembre de 2006 y enero, marzo, mayo y julio de 2007).

4. Experimentos de Producción y Emisión de Gases en el Sedimento

1. Métodos

- 1.1. Puesta a punto del método analítico: cromatografía de gases
- 1.2. Diseño experimental

2. Resultados

- 2.1. Caracterización analítica del sedimento en los experimentos
- 2.2. Producción y emisión de gases in situ. ¿Sufre el metano oxidación aeróbica?
- 2.3. Metanogénesis. Factores que controlan su producción
- 2.4. Producción de óxido nitroso y desnitrificación (N_2)
- 2.5. Metanogénesis y sulfatorreducción

1. Métodos

En los más de 20 años que lleva estudiándose el estuario del río Palmones, es la primera vez que se aborda el papel del sedimento en la producción y emisión de gases a la atmósfera. La carencia de experiencia previa del grupo de Ecofisiología de los Sistemas Acuático (GESA) en cromatografía de gases justifica la estancia de algo más de dos meses (septiembre-noviembre del 2004) realizada durante el periodo de tesis en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Essex (Reino Unido), bajo la supervisión del profesor David Nedwell. Se adquirieron los conocimientos básicos sobre la manipulación y el procesamiento de las muestras (incubaciones en slurry), el tratamiento de los datos, y la técnica de análisis para el metano, el óxido nitroso y el nitrógeno molecular mediante **cromatografía de gases**.

Terminada la estancia se realizó un gran esfuerzo en adaptar los métodos, y en la adquisición del material de laboratorio preciso para la manipulación y el procesado de las muestras en el Departamento de Ecología de la Universidad de Málaga. Además, fue necesario adecuar el cromatógrafo de gases disponible a nuestras necesidades. Esto supuso la instalación fija de una batería de gases, la instalación de dos detectores y columnas nuevas, la manipulación del aparato y del software, y el desarrollo de los métodos de análisis para el metano, el óxido nitroso y el sulfhídrico. Gracias a la **cromatografía iónica** se pudo estimar la tasa de sulfatorreducción por desaparición de sulfato en el agua de las muestras (Crill y Martens, 1983).

1.1. Puesta a punto del método analítico: cromatografía de gases

En nuestros análisis hemos empleado un cromatógrafo de gases HP 6890 (Figura 4.1 a y b) conectado a un PC. El inyector admite un volumen máximo de muestra de 2.5 ml, aunque los análisis se llevan a cabo inyectando 1 ml de la muestra (gas acumulado en los botes de incubación) con una jeringuilla Agilent Technologies de 1 ml con válvula de cierre Luer. En el interior del horno se encuentran dos

columnas capilares idénticas HP-Plot Q (30 m x 530 μm x 40 μm) dispuestas en paralelo, y dos detectores: uno de Ionización de Llama (FID), basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de sustancias eluidas, y otro de Captura Electrónica (ECD), basado en la electronegatividad de las sustancias eluidas y su capacidad para formar iones negativos por captura de electrones. Cada uno está conectado a una columna, y se asume que les llega el 50% de la muestra. Son responsables de detectar distintos gases: el FID nos revela la presencia de metano y otros gases que no son de nuestro interés, y el ECD el óxido nítrico y el sulfhídrico.

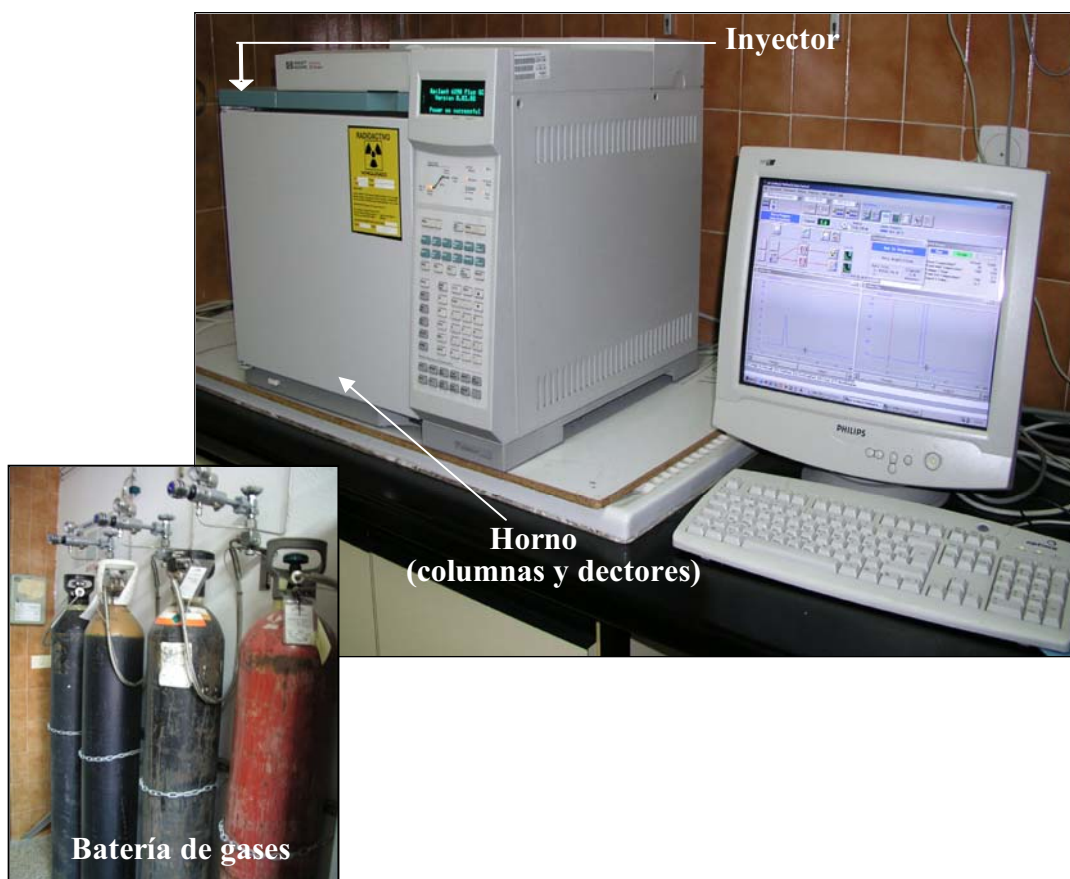


Figura 4.1a.- Fotografía del cromatógrafo de gases HP 6890 del Departamento de Ecología de la Universidad de Málaga.

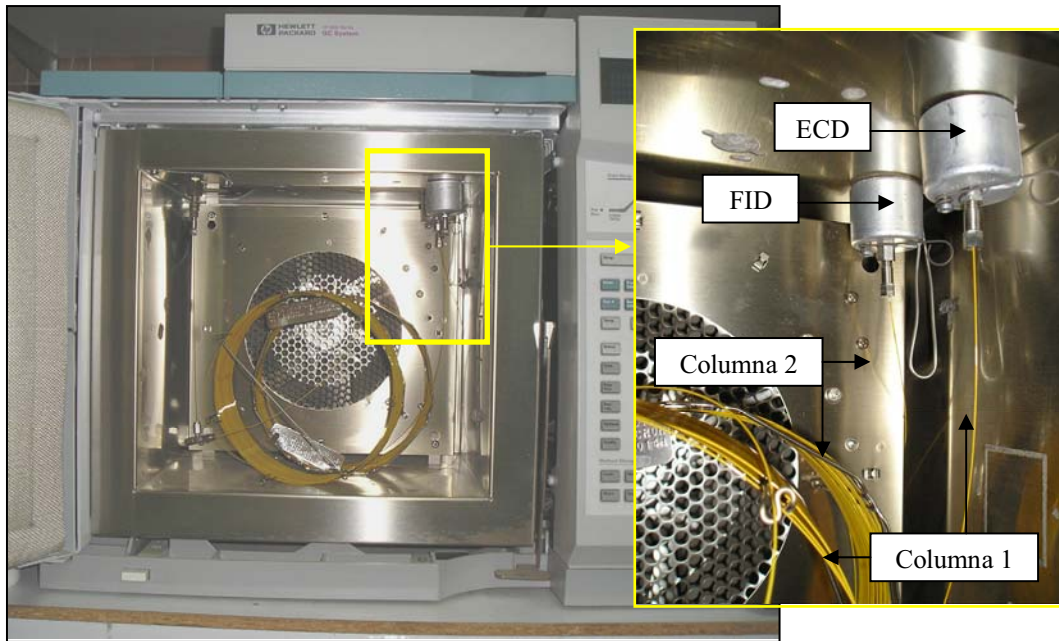


Figura 4.1b.- Interior del cromatógrafo de gases HP 6890

La puesta a punto del equipo ocupó una buena parte de nuestro tiempo, pues si es cierto que el fundamento de la cromatografía de gases es tan sencillo como el de las demás, su montaje instrumental y su uso es más complejo. Al operar con gases, se precisa trabajar en un sistema cerrado, controlar caudales, presiones y temperaturas. Realizada la elección del equipo y finalizada su correcta instalación, se desarrollaron dos métodos de análisis, uno para el metano y otro para el óxido nitroso, resumidos en la tabla 4.1. En ambos casos, el helio fue el gas portador, por ser inerte, evitar interacciones con la muestra y la fase estacionaria, ser adecuado para los dos detectores a utilizar, de fácil disponibilidad y económico.

La identificación de los gases precisó de un análisis cualitativo previo. Inyectando el gas puro a determinar, a una concentración conocida, se conoce el tiempo de retención en la columna, que para nuestro caso fue de 2.13 min para el

| | Método 1: Detección de CH₄ | Método 2: Detección de N₂O |
|---------------------------|--|--|
| Tipo de detector: | FID | ECD |
| Temperatura del horno: | 35° C isotermal | |
| Temperatura detector: | 250° C | |
| Temperatura del inyector: | 160° C | |
| Flujo H ₂ : | 40 ml/min | |
| Flujo aire: | 400 ml/min | |
| Flujo N ₂ : | 25ml/min | 60 ml/min |

Tabla 4.1.- Métodos empleados para el análisis de CH₄ y N₂O.

metano, y 3.55 min para el óxido nitroso (Figuras 4.2 a y b). Este procedimiento es esencial a la hora de analizar las muestras, identificando estos gases del resto de los componentes que hubiera en ellas.

La interpretación cuantitativa de los cromatogramas se basó en el método del calibrado absoluto. Consiste en inyectar cantidades conocidas de cada uno de los gases a determinar y se evalúan las áreas de los picos obtenidos. La cantidad absoluta del gas contenido en una muestra se determina a partir de una curva de calibrado área del pico/cantidad inyectada empleando el software ChemStation onn y off de Agilent Technologies 1990-2002. Este método tiene la ventaja de ser sensible, rápido y de fácil manejo una vez puesto a punto, y si se utiliza con el debido cuidado, suministra información cuantitativa exacta con cantidades muy pequeñas de muestra. Así se espera que los esfuerzos realizados para ponerla a punto no sólo se vean recompensados este trabajo, si no que permita continuar esta nueva vía de investigación iniciada en el estuario del río Palmones.

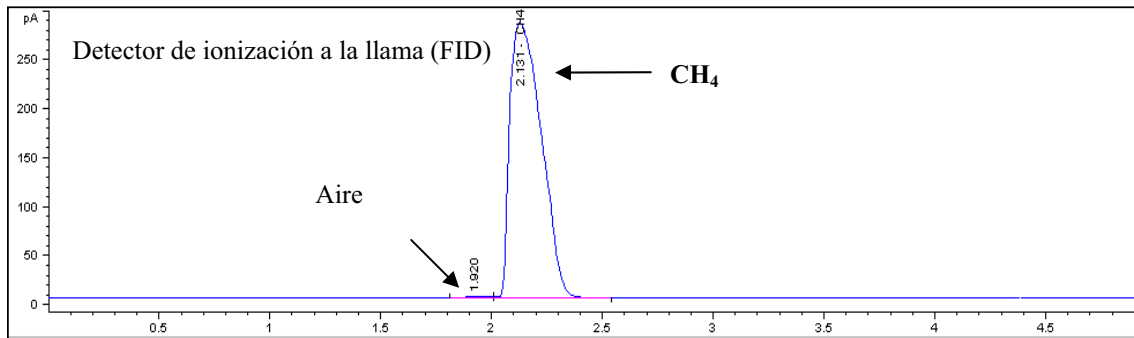


Figura 4.2a- Cromatograma obtenido según el método 1. Se identifica el tiempo de retención de CH_4 (2.13 min.) inyectando una muestra del gas puro al 0.05%

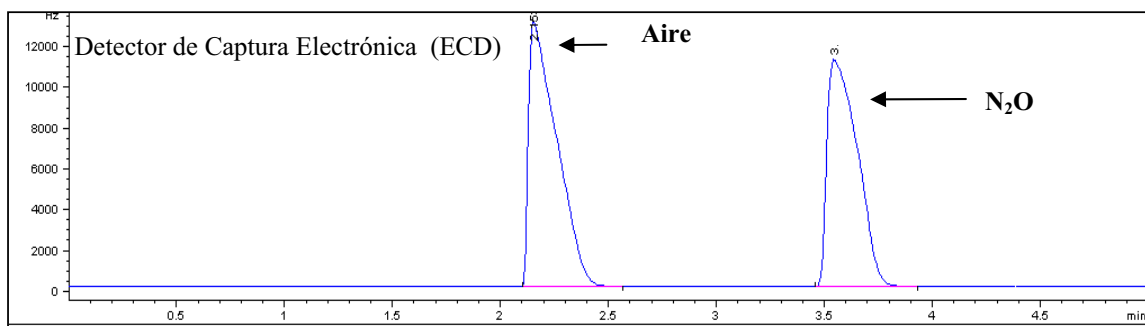


Figura 4.2b- Cromatograma obtenido según el método 2. Se identifica el tiempo de retención del N_2O (3.55 min.) inyectando una muestra del gas puro al 0.05%

1.2. Diseño experimental

Los experimentos realizados se resumen en la figura 4.3. A continuación, se describen los experimentos diferenciándolos según se haya estudiado la producción del gas en incubaciones en slurry, o la degasificación del sedimento (emisión a la atmósfera) Por **degasificación** del sedimento o **emisión** del gas a la atmósfera entenderemos la transmisión del gas desde el sedimento a la atmósfera a favor de gradiente, y por **producción** la transformación de un sustrato en su producto final en estado gaseoso.

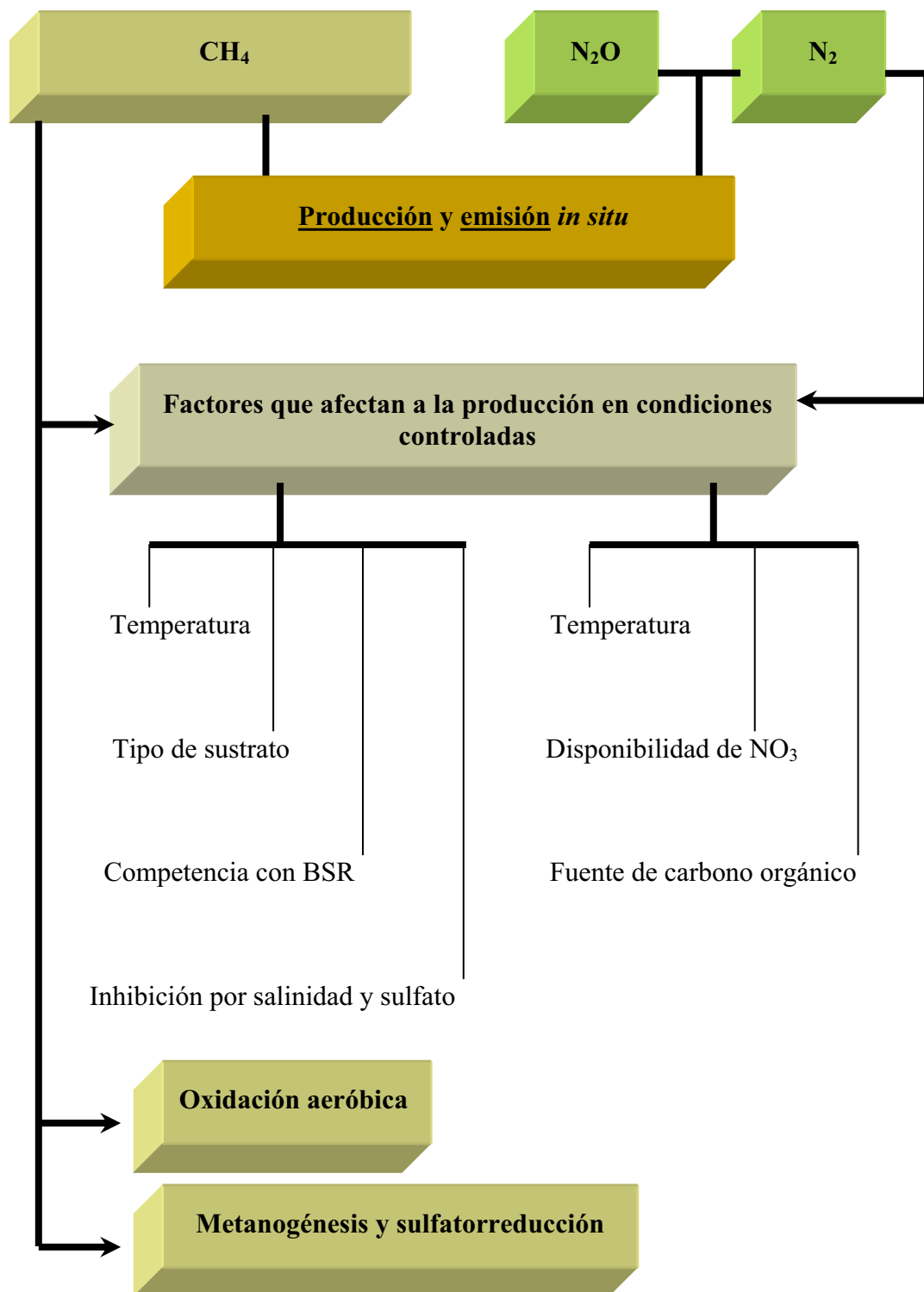


Figura 4.3.- Esquema que resume los experimentos realizados de producción y emisión de gases.

1.2.1. Experimentos de producción: incubaciones en slurry

Las incubaciones para determinar la producción de metano, óxido nítrico y nitrógeno molecular se llevaron a cabo mediante la técnica de slurry descrita por Smith et al. (1978) y Limmer y Steele (1982). Básicamente, esta consiste en incubar una mezcla homogénea de sedimento-agua (50% peso/volumen) dejando un volumen de aire conocido durante un tiempo determinado y controlado en botes cerrados herméticamente. La estrategia seguida en todos los experimentos ha consistido en realizar dos tipos de incubaciones con objeto de discriminar entre producción real y potencial del sedimento. Consideramos la **producción real** como la formación natural del gas sin modificar las condiciones del medio (sin añadir ninguna sustancia a las incubaciones), y será utilizado como el control. La **producción potencial** del sedimento será la capacidad de producir un gas en unas condiciones concretas que han sido impuestas experimentalmente con la adición de alguna sustancia a la mezcla sedimento-agua.

Tras finalizar la incubación, se toma la muestra de aire para analizarla directamente por cromatografía de gases.

a) *Producción de metano*

El metano es un gas que sufre fácilmente procesos de oxidación, por ello, la manipulación de las muestras y las incubaciones se han de realizar en condiciones de anoxia absoluta. Para ello, se empleó una cámara de anaerobiosis (Glove Bag, inflatable glove chamber MODEL X-27-27) como se muestra en la figura 4.4. Las muestras junto con el material necesario se introducen previamente en la cámara. Esta está conectada por un extremo a una botella de N₂ que permite crear un flujo constante y así desplazar el O₂ que hubiera en su interior. Una vez garantizada la ausencia de oxígeno, se cierra la cámara y se continúa su llenado con N₂. Se mezcla homogéneamente el sedimento (los primeros 10 cm, zona de mayor actividad metanogénica según estudios previos) con agua de mar artificial a 35 (50% peso/volumen) previamente **burbujeada con N₂** para crear anoxia y se le añade los tratamientos (distintas concentraciones de sustrato, inhibidores, etc.). La mezcla



Figura 4.4.- Fotografía mostrando la cámara de anaerobiosis utilizada en los experimentos de producción de CH₄.

homogénea de sedimento-agua se incubaba 72 h en botes cerrados herméticamente en oscuridad, en agitación y a temperatura constante en un baño térmico según las condiciones experimentales que se ensayen (Figura 4.5). Durante este tiempo la producción de metano es lineal por lo que se toman muestras a intervalos de 24 h. Finalmente se expresa la producción de metano como nmol de metano g⁻¹ día⁻¹ o nmol de metano ml⁻¹ h⁻¹.



Figura 4.5.- Fotografías de las muestras incubadas en el baño térmico y detalle de los botes de incubación.

Los experimentos de producción de metano y sus condiciones experimentales son las siguientes (Figura 4.6):

- Efecto de la temperatura.

Se estudia el efecto de la temperatura en la producción real y potencial de metano en la zona intermareal y en la marisma (zona baja de vegetación y alta con tapete) a 15, 25, 30 y 35° C. Al control no se añade ningún tratamiento y nos indica la producción real en el sedimento a cada temperatura. Para conocer la producción potencial se realizaron incubaciones con un sustrato metanogénico a concentración saturante (10 mM de acetato sódico), un inhibidor específico de las BSR (10 mM de molibdato sódico) y una mezcla de ambos. Los resultados se expresan en nmol de metano ml⁻¹ h⁻¹.

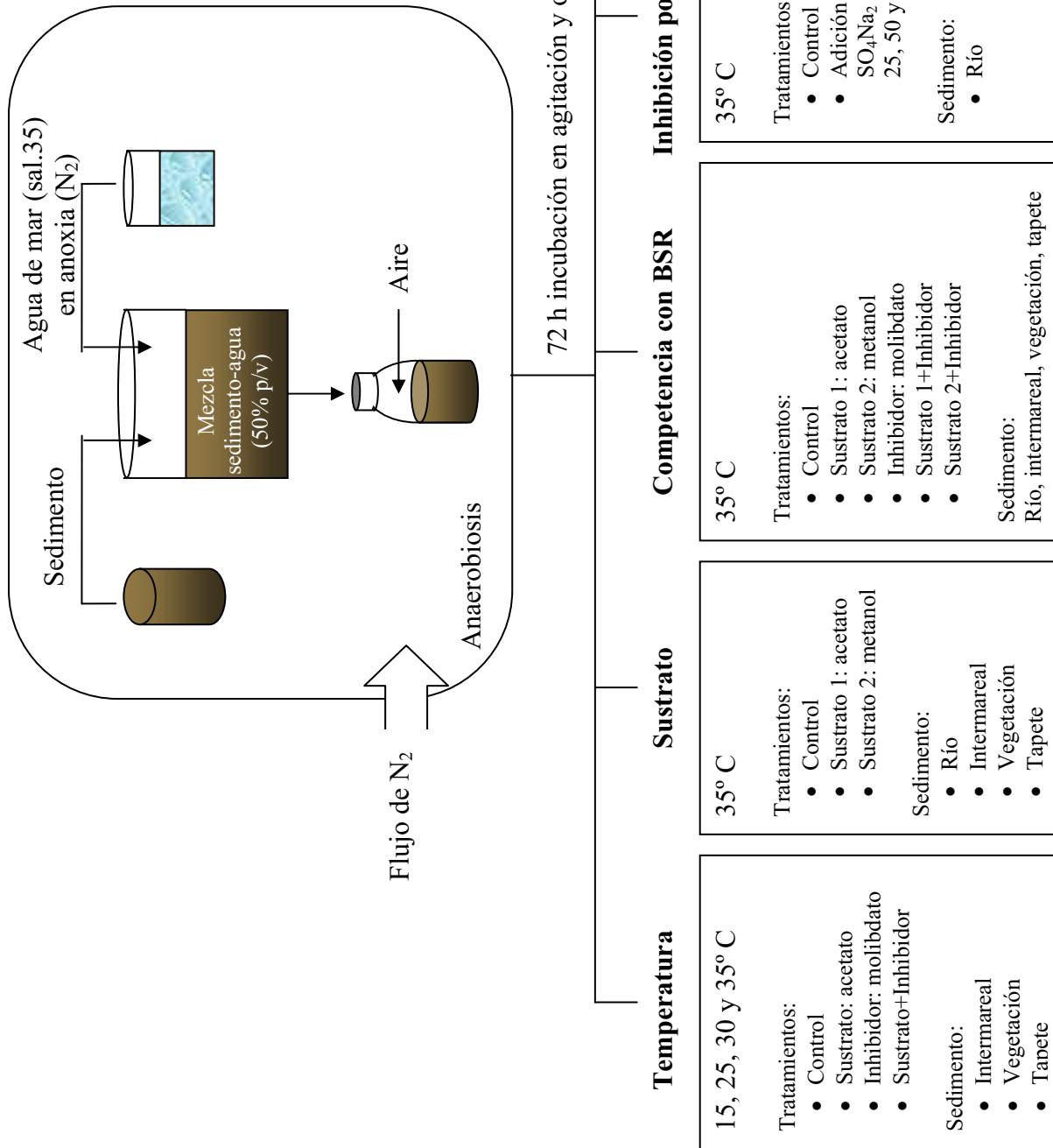
- Efecto de dos sustratos: acetato y metanol.

Con el fin de evaluar la importancia del sustrato en la producción de metano en el estuario, se incubó sedimento del río y del estuario (intermareal y marisma de la zona baja con vegetación y la alta con tapete) con dos sustratos a concentración saturante a 35° C: 10 mM de acetato y metanol. Los resultados se muestran como el incremento de la tasa de producción de metano respecto al control.

- Competencia entre bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras.

La relación de competencia entre bacterias metanogénicas y BSR se evalúa a partir de sedimento del río y del estuario incubado a 35° C, con un inhibidor específico de las BSR (molibdato sódico) a una concentración final de 10 mM. Se realizan dos experimentos, cada uno con un sustrato (acetato y metanol). Los resultados se muestran como el incremento de la tasa de producción de metano respecto al control.

Figura 4.6.- Esquema de los experimentos de producción de CH₄: incubaciones en slurry.



- Inhibición por sulfato.

Para estudiar el grado de inhibición que ejerce el sulfato en la producción de metano, se han llevado a cabo incubaciones a 35° C con sedimento del río añadiendo concentraciones crecientes de sulfato sódico (0.1, 1, 5, 25, 50 y 100 mM). El experimento no se ha llevado a cabo con sedimento del estuario por el alto contenido de sulfato que presenta. Los datos se expresan en porcentaje de inhibición de la tasa de producción de metano respecto al control.

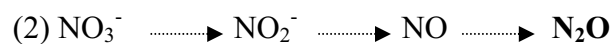
- Inhibición por salinidad.

El efecto de la salinidad se ha estudiado incubando sedimento del río (salinidad 0) a concentraciones crecientes de cloruro sódico para obtener una salinidad final de 0, 10, 20, 25, 30 y 35.

Además, se quiere comprobar el efecto de la salinidad *in situ*. Para ello, se han de tomar muestras de sedimento a lo largo del estuario con distinta salinidad. El estuario del río Palmones, por su pequeño tamaño, no muestra cambios de salinidad en toda su longitud; por tanto, el experimento se lleva a cabo en otro escenario, el estuario del río Tajo (Lisboa, Portugal). Se incubó sedimento de cinco estaciones atendiendo en lo posible al rango de salinidad considerado experimentalmente: 0, 10, 25, 30 y 35. Los resultados de ambos experimentos se muestran en porcentaje de inhibición de la tasa de producción de metano respecto al control.

b) Producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular

Según las condiciones del sedimento, el producto final de la desnitrificación puede ser el óxido nitroso o el nitrógeno molecular:



El óxido nitroso puede ser considerado producto intermediario (1) o final de la desnitrificación (2), por ello la necesidad de diferenciar entre producción de óxido nitroso y producción de nitrógeno molecular (desnitrificación). Cuando el producto final sea el óxido nitroso se hará referencia a la **producción de óxido nitroso**. En cambio, si el producto final fuera el nitrógeno molecular, el óxido nitroso es un producto intermediario, hablaremos de **desnitrificación**.

La producción de **óxido nitroso** se determina a partir de una mezcla homogénea de sedimento del intermareal y la marisma (los primeros 5 cm, zona de mayor actividad desnitrificante según indicaron estudios previos) y agua de mar artificial a 35 previamente burbujeada con N₂ (50% peso/volumen) a la que se le añaden los tratamientos.

La determinación del **nitrógeno molecular** (desnitrificación) por cromatografía de gases, requiere el uso de una técnica específica de incubación que modifica ligeramente el procedimiento seguido para el óxido nitroso. Se aplica la técnica de inhibición con acetileno (C₂H₂) (Sørensen, 1978; Kemp et al., 1990; Seitzinger et al., 1993) por ser sensible, económica y de fácil aplicación. Consiste en utilizar el acetileno como inhibidor de la enzima que transforma el óxido nitroso a nitrógeno molecular en el último paso de la desnitrificación (Koiike y Sørensen, 1988). La acumulación de óxido nitroso (el formado como producto final de la desnitrificación, más el que se forma por inhibición), se emplea como medida de la tasa de desnitrificación (e.g. Pattinson et al. (1998)) (Figura 4.7). En este caso, el sedimento se incuba con agua de mar artificial a 35 previamente burbujeada con N₂, y agua de mar artificial previamente burbujeada con acetileno a una concentración final de 10 %, la estimada por Pattinson et al. (1998) para garantizar la inhibición total.

En ambos casos, la mezcla homogénea de sedimento-agua se incuba 4 h. (tiempo durante el cual la formación de óxido nitroso es lineal) en botes cerrados herméticamente en oscuridad, en agitación y a temperatura constante según las

condiciones experimentales que se ensayen. Se toma una muestra de aire al inicio y al final de la incubación, y se analiza con el cromatógrafo. La producción de óxido nitroso se expresa en mol de N y no como N_2O ($\text{nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) para compararla con la producción de nitrógeno molecular que se expresa en $\text{nmol N g}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Los cálculos se realizaron a partir de la Ley de Henry, de acuerdo a Weiss y Price (1980).

Antes de iniciar las incubaciones, se toman muestras de la mezcla para la caracterización analítica del sedimento y se miden las variables fisicoquímicas.

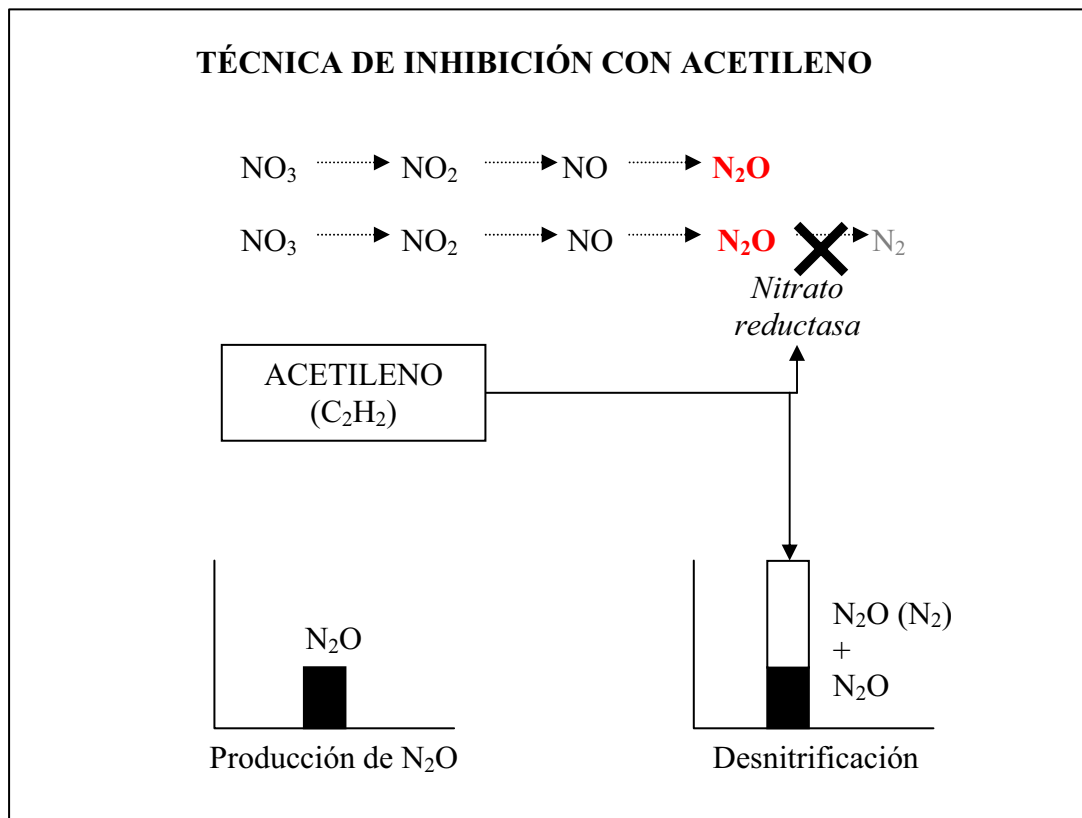


Figura 4.7.- Representación esquemática de la técnica de inhibición con acetileno.

A continuación, se detallan los experimentos de producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular llevados a cabo y las condiciones de incubación (Figura 4.8):

- Efecto de la temperatura.

Al igual que se hizo con el metano, se estudia el efecto de la temperatura en la producción real y potencial de óxido nitroso y nitrógeno molecular en el estuario a 15, 25, 30 y 35° C. Se realizan dos tipos de incubaciones, una a concentración real de nitrato (control) sin añadir ningún tratamiento, y otra con la adición de nitrato sódico (NO_3Na) a una concentración final de 10 mM (concentración saturante). Los resultados muestran la tasa de producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular real y potencial.

- Disponibilidad de nitrato.

Para comprobar el efecto de la disponibilidad del nitrato en la producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular, se incubó el sedimento añadiendo 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de NO_3Na , y se mantiene a 35° C. Se representa la tasa de producción de ambos frente a la concentración de NO_3Na .

- Fuente de carbono orgánico.

Se ha empleado metano, etanol, acetato y glucosa para estudiar el efecto de distintas fuentes de carbono orgánico en la producción de óxido nitroso y de nitrógeno molecular, a una concentración final de 10 mM y a 35° C.

c) *Tasa de sulfatorreducción*

La tasa de **sulfatorreducción** se estima por desaparición de sulfato en incubaciones en slurry. Para el análisis del sulfato se emplea la cromatografía iónica (Crill y Martens, 1983).

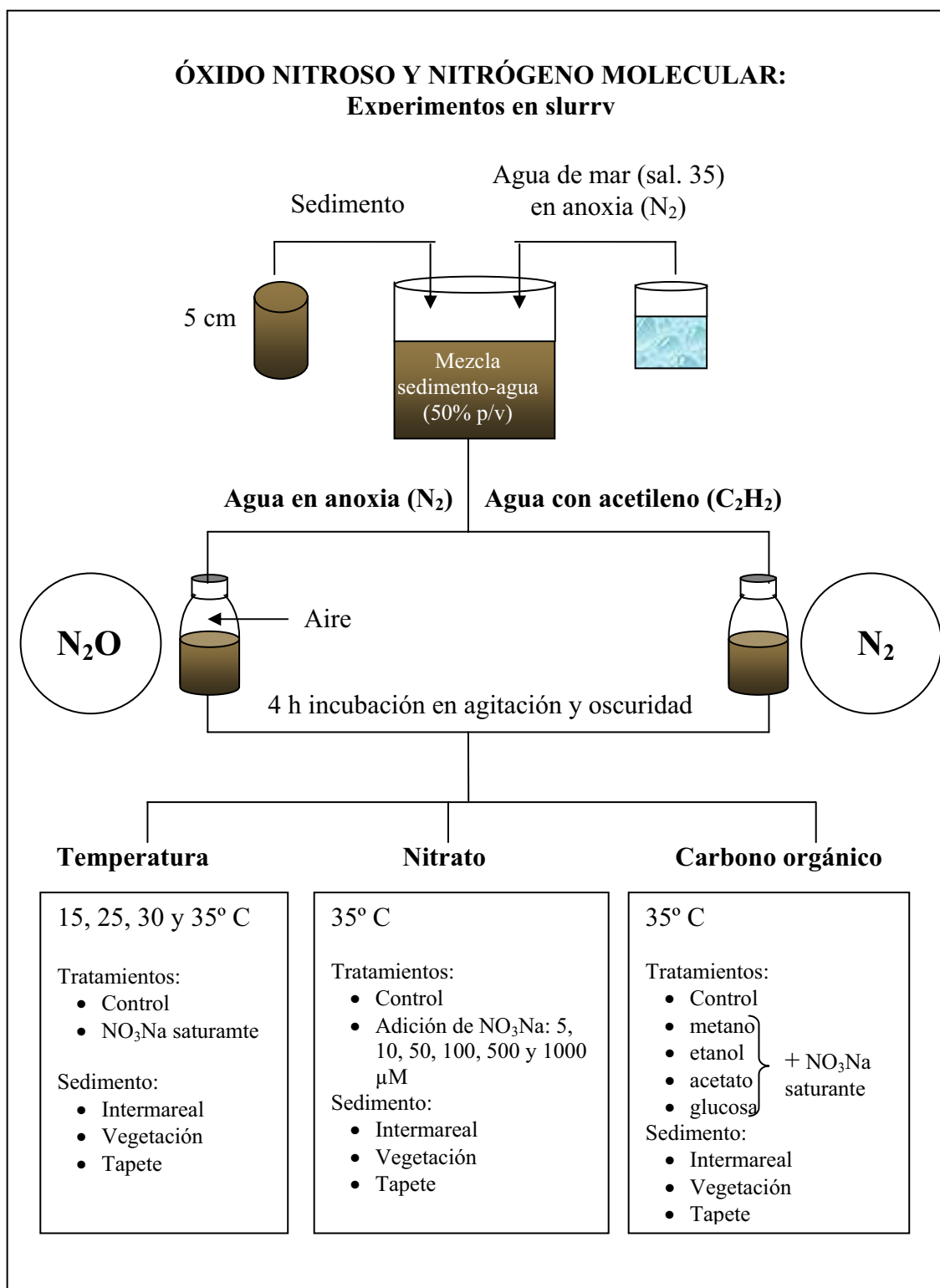


Figura 4.8.- Esquema de los experimentos de producción de N₂O y desnitrificación(N₂): incubaciones en slurry.

Para determinar la **tasa de producción de metano y de la oxidación anaérobica de la materia orgánica en el sedimento a través del sulfato (sulfatorreducción)**, se ha desarrollado el siguiente experimento (Figura 4.9):

- Metanogénesis y sulfatorreducción

Se mide simultáneamente la producción de metano y la tasa de sulfatorreducción en incubaciones en slurry con el objetivo de estudiar la influencia de las BSR en la producción de metano. Se mezclan los 10 primeros cm de sedimento del intermareal con agua de mar artificial (salinidad de 35, en anoxia previamente burbujeada con N₂). La mezcla homogénea de sedimento-agua se incuba con acetato (sustrato por el que compiten bacterias metanogénicas y BSR) a una concentración final de 10 mM, con el inhibidor específico de la sulfatorreducción (10 mM molibdato sódico) y con una mezcla de ambos, sin dejar aire en los botes de incubación, durante 10 días a 35° C en agitación y oscuridad. Cada 24 h se toma una muestra de la mezcla de 2 ml, se centrifuga a 4500 rpm durante 10 min, y se mide el contenido en sulfato del extracto por cromatografía iónica. Al mismo tiempo, se toma una muestra de aire de los botes de incubación (1ml) y se analiza en el cromatógrafo de gases para determinar la producción de metano. Los cambios de volúmenes de agua y aire en los botes de incubación tras la toma de muestra se tienen en cuenta a la hora de hacer los cálculos de las tasas. La tasa de sulfatorreducción se estima a partir de la desaparición de sulfato, y se expresa en nmol ml⁻¹ h⁻¹, al igual que la de metano.

Al inicio de las incubaciones, se toman muestras de la mezcla para la caracterización analítica del sedimento y se miden las variables fisicoquímicas.

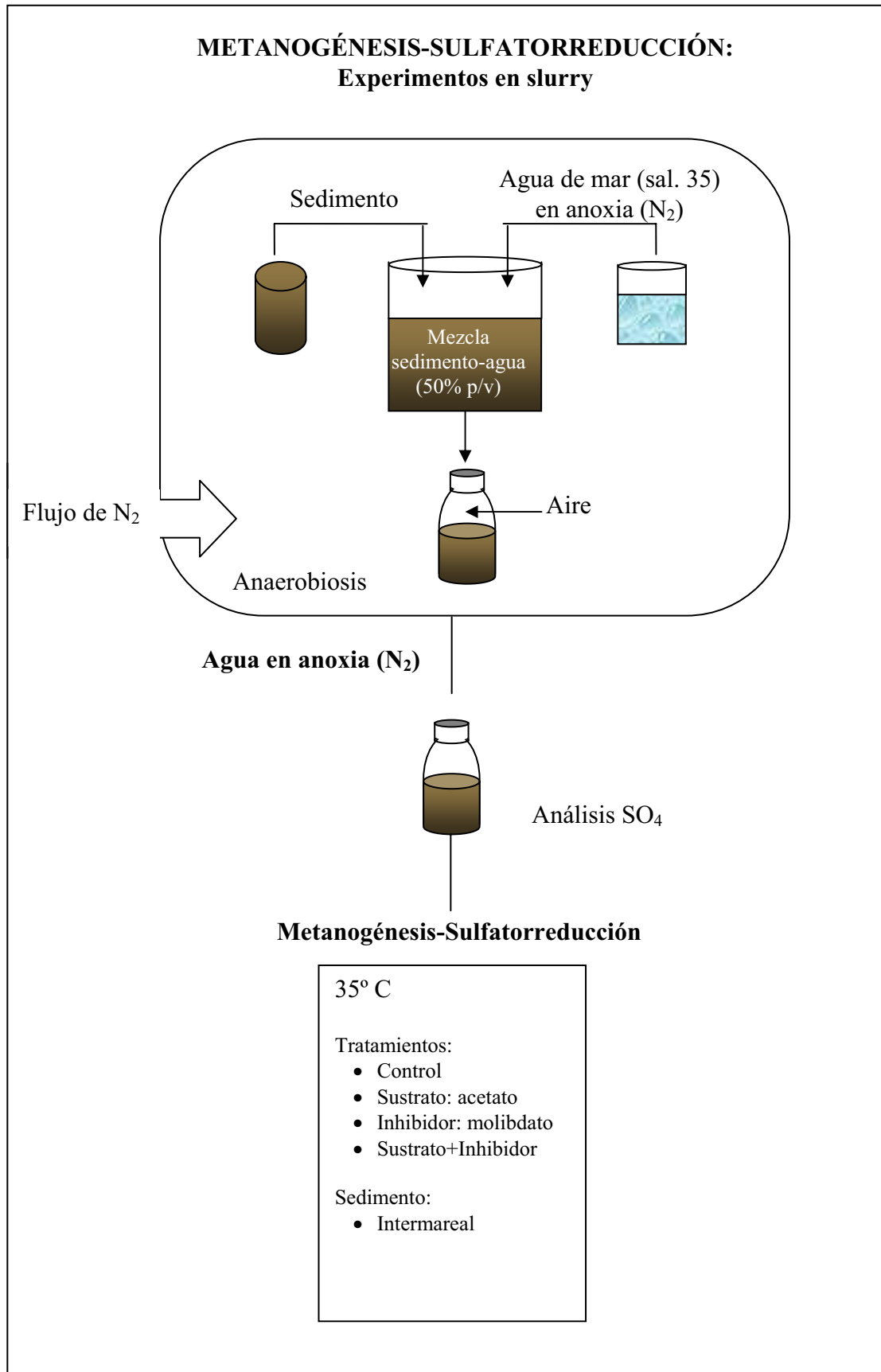


Figura 4.9.- Esquema del experimento simultáneo de metanogénesis y sulfatorreducción: incubación en slurry.

1.2.2 Experimentos de emisión

Los experimentos de emisión de gases requieren el uso de cilindros especiales de metacrilato de 20 cm de largo y un diámetro de 7.5 cm. Estos cilindros se clavan 10 cm en el sedimento, quedando un volumen de aire de 200 ml, aproximadamente. Se cierran herméticamente gracias a una tapa que contiene un par de septos de goma. La toma de muestra (10 ml de aire) se toma por uno de los septos con una jeringuilla, y se pasa a viales vacutainer al vacío (10 ml de capacidad) para posteriormente ser analizada. Para impedir que por diferencia de presión no se tome el volumen total de muestra, se genera sobrepresión insertando en el otro septo el mismo volumen de agua. La reducción de volumen del cilindro, se tiene en consideración a la hora de realizar los cálculos de concentración de los gases (Figura 4.10). Finalmente, se expresa la tasa de emisión de metano en $\text{nmol de metano ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $\text{nmol de metano g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, la de óxido nítrico y nitrógeno molecular en $\mu\text{mol N m}^2 \text{ h}^{-1}$.



Figura 4.10.-Fotografía que muestra el procedimiento seguido en la toma de muestra en los experimentos de emisión.

Se realizaron dos experimentos con sedimento intermareal y de la marisma (zona baja con vegetación y alta con tapete): uno para determinar la **producción y emisión *in situ*** de metano, óxido nitroso y nitrógeno molecular, y otro para evaluar el papel de la **oxidación aeróbica del metano**. Estos son los métodos seguidos:

- Producción y emisión de gases *in situ*.

Este experimento se llevó a cabo en los meses de enero, marzo y julio de 2007. Se emplearon 6 cilindros en cada zona, 3 para determinar la producción y emisión de metano y óxido nitroso, y 3 para el nitrógeno molecular (Figura 4.11). Los primeros



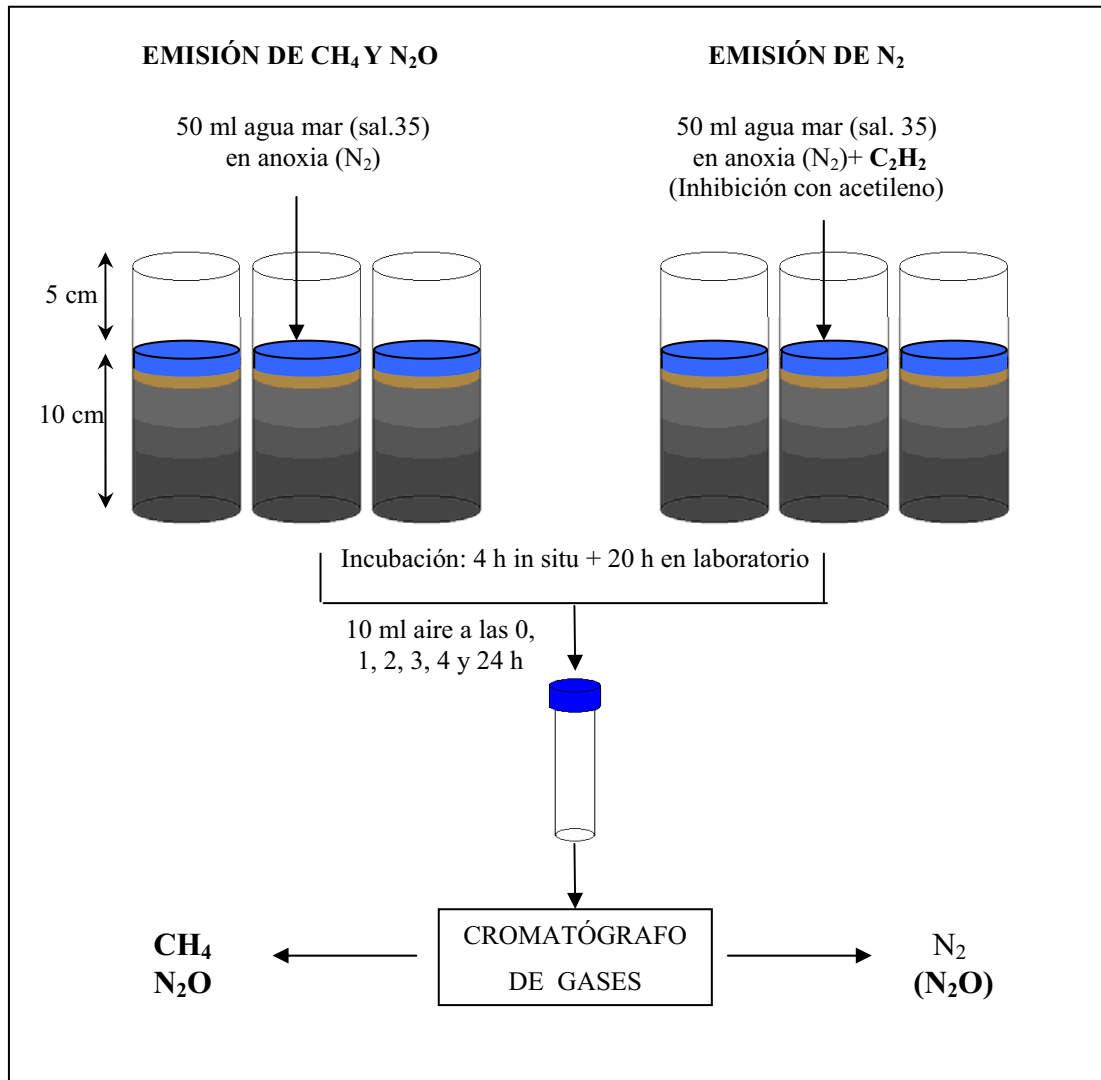
Figura 4.11.- Fotografías de las incubaciones durante los experimentos de emisión *in situ*.

se incuban con 50 ml de agua de mar artificial en anoxia (**burbujeada con N₂**) a 35 unidades de salinidad; los segundos con 50 ml de agua de mar artificial **burbujeado con acetileno** según la técnica de inhibición con acetileno (Koike y Sørensen, 1988). Se toman muestras de gases *in situ* en los viales vacutainer a intervalos de una hora, que serán analizadas posteriormente con el cromatógrafo. A las 4 horas, se sacan los cilindros del sedimento, y se transportan al laboratorio manteniendo la temperatura del estuario. Se continúa la incubación en el laboratorio y se toma la última muestra a las 24 h del inicio del experimento (Figura 4.12). A continuación, se procesa el sedimento siguiendo el método descrito para estimar la producción de metano, óxido nitroso y nitrógeno molecular sin añadir ningún tratamiento (producción *in situ*).

La distancia del estuario al laboratorio imposibilitó la realización completa del experimento *in situ*. Se asume que la producción y emisión es *in situ*, aunque en realidad los experimentos se realicen en condiciones seminaturales.

- Oxidación aeróbica del metano (emisión en el laboratorio).

Para el experimento de oxidación aeróbica se tomaron 6 cilindros en cada zona. Una vez en el laboratorio, se incuban en la cámara durante 24 h a 35° C. Tres de los cilindros se mantienen en luz y no se someten a ningún tratamiento; los otros 3 se mantienen en oscuridad y se les añade gas acetileno al 1%, un inhibidor de las bacterias responsables de la oxidación aeróbica del metano. La toma de muestra se realiza del mismo modo y a los mismos tiempos que en el experimento anterior, para posteriormente analizar el gas metano con el cromatógrafo (Figura 4.13). A continuación, se procesa el sedimento siguiendo el método descrito para estimar la producción de metano, con y sin inhibidor.



Temperatura de incubación

| | Enero 06 | Marzo 07 | Julio 07 |
|--------------|----------|----------|----------|
| Intermareal: | 10° C | 20° C | 30° C |
| Vegetación: | 10° C | 20° C | 35° C |
| Tapete: | 10° C | 20° C | 40° C |

Figura 4.12.- Esquema del experimento de emisión *in situ* de CH₄, N₂O y N₂. Abajo se indica la temperatura de las incubaciones en cada una de las zonas estudiadas.

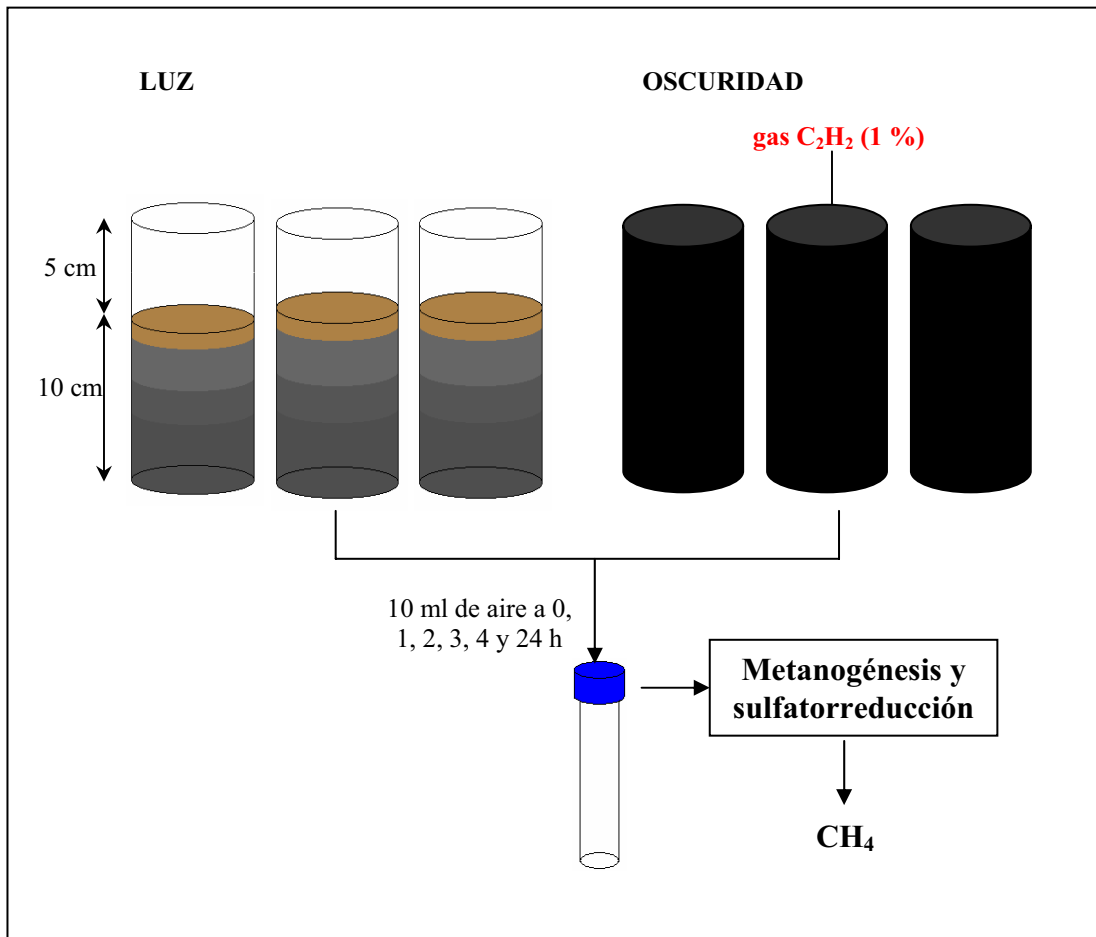


Figura 4.13.- Esquema del experimento de oxidación aeróbica del CH_4 (emisión en el laboratorio).

2. Resultados

2.1. Caracterización analítica del sedimento en los experimentos

Antes de iniciar los experimentos se determinan las condiciones iniciales del sedimento: MO, C:N y S en la fracción sólida; y nutrientes (NO_3 , NO_2 y NH_4), sulfato, Eh y pH en la mezcla sedimento-agua de las incubaciones.

Los datos de los experimentos de producción de metano coinciden con la caracterización analítica que se llevó a cabo del sedimento *in situ* desde octubre de 2005 a marzo de 2007. Estos datos pueden consultarse en el capítulo 3 (de la figura 3.7 a la 3.11), teniendo en cuenta que el análisis de octubre de 2005 corresponde al experimento sobre el efecto de la temperatura, el de julio de 2006 a la competencia con BSR y el de marzo de 2007 a los de inhibición de la metanogénesis por sulfato y salinidad.

En la tabla I.i del anexo I se muestran los datos de los experimentos sobre el efecto de la temperatura, la adición de nitrato y de distintas fuentes de C orgánico en la producción de óxido nítrico y desnitrificación a 35° C.

Los datos del experimento simultáneo de metanogénesis y sulfatorreducción a 35° C se recogen en la tabla I.ii, y los del experimento de producción y emisión de gases *in situ* en la I.iii del mismo anexo.

2.2. Producción y emisión de gases *in situ*. ¿Sufre el metano oxidación aeróbica?

En el estuario del río Palmones no se detecta degasificación ni producción de gases en invierno y primavera. **En verano** el sedimento produce metano y nitrógeno molecular, sin embargo sólo emite nitrógeno (N_2).

La producción depende de la zona del estuario. Mientras que el **metano se produce en todo el estuario** (intermareal y marisma), **el nitrógeno molecular** se forma sólo

en la marisma; y sin embargo, se produce 6 veces más nitrógeno molecular que metano (Figura 4.14).

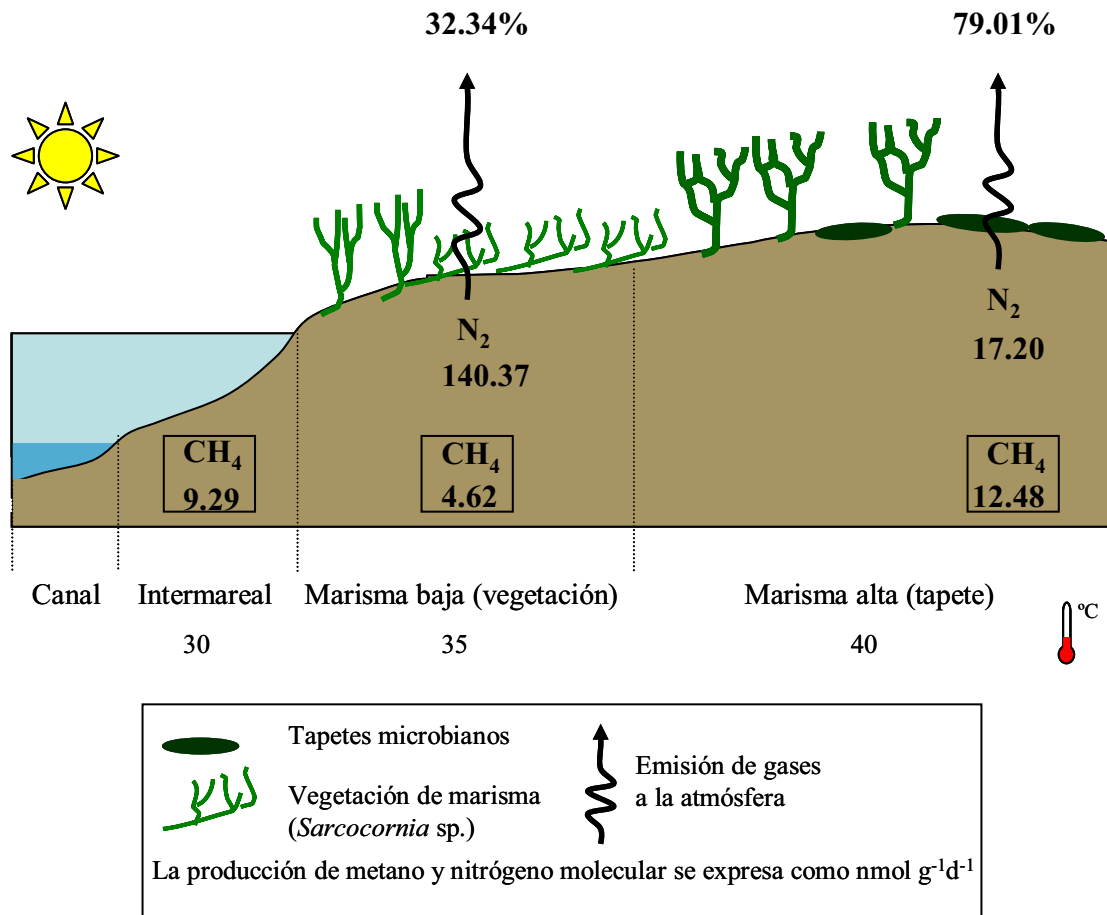


Figura 4.14.- Esquema de la producción y emisión de gases (CH₄, N₂O y N₂) del estuario (intermareal y marisma) en verano (julio 2007).

En la tabla 4.2 se muestran los valores de producción y emisión de metano y nitrógeno en las tres zonas del estuario. En cuanto al **metano**, la marisma produce casi el doble que el intermareal, 17.1 nmol CH₄ g⁻¹d⁻¹ (4.62 y 12.48 nmol CH₄ g⁻¹d⁻¹

en sedimento con plantas y tapete), y $9.29 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. De **nitrógeno molecular** se forman $157.57 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, de los cuales $140.37 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ se forman en el sedimento cubierto con vegetación, y $17.20 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en sedimento con tapete. Sólo se pierde a la atmósfera el 37.46% del nitrógeno molecular producido, siendo el sedimento con tapete el que mayor tasa de emisión presenta (79.01%) a pesar de producir menos.

a)

| | Producción CH_4 ($\text{nmol CH}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) | | Emisión CH_4 ($\mu\text{mol CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) |
|--------------------|---|-----------------------------------|---|
| Intermareal | 0.50 ± 0.01 | 9.29 ± 1.68 | nd |
| Marisma | 0.93 ± 0.37 | 17.1 ± 2.06 | nd |
| Vegetación | 0.25 ± 0.04 | 4.62 ± 0.78 | nd |
| Tapete | 0.68 ± 0.02 | 12.48 ± 1.20 | nd |

b)

| | Tasa producción N_2O ($\text{nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | Tasa desnitrificación* ($\text{nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | Emisión N_2O ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | Emisión N_2 ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) | % Emisión de N_2 ** |
|--------------------|--|--|---|---|------------------------------------|
| Intermareal | nd | nd | nd | nd | nd |
| Marisma | nd | 157.57 ± 50.87 | nd | 8.35 ± 0.09 | 37.46 |
| Vegetación | nd | 140.37 ± 45.87 | nd | 6.43 ± 0.02 | 32.34 |
| Tapete | nd | 17.2 ± 1.87 | nd | 1.92 ± 0.18 | 79.01 |

* 100% de desnitrificación total a N_2 **100% de emisión en forma de N_2

Tabla 4.2.- Producción y emisión en verano de CH_4 (a) y de las formas gaseosas de nitrógeno (N_2O y N_2) (b) en el sedimento del intermareal y de la marisma (zona con vegetación y con tapete). (nd, no detectado).

Resulta de interés que no haya degasificación de metano cuando si que se produce. Está claro que en los sedimentos el metano sufre oxidación aeróbica o anaeróbica en su ascenso hacia las capas más superficiales. ¿Podría darse oxidación aeróbica en el sedimento del estuario? En la tabla 4.3 se recogen los datos de producción y emisión de metano cuando se inhibe la oxidación aeróbica del metano.

Como puede verse en la tabla, la producción de metano que tiene lugar con o sin inhibidor no es significativamente distinta (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). En cambio, no se detecta emisión, ni en presencia ni sin el inhibidor. Estos resultados descartan la oxidación aeróbica como causa de la ausencia de emisión de metano en el estuario.

| | Producción CH ₄ | | | | Emisión CH ₄ | |
|--------------------|--|---------------------|---|----------------------|---|---------------|
| | (nmol CH ₄ ml ⁻¹ h ⁻¹) | | (nmol CH ₄ g ⁻¹ d ⁻¹) | | (μmol CH ₄ m ⁻² h ⁻¹) | |
| | Sin inhibidor | Con inhibidor | Sin inhibidor | Con inhibidor | Sin inhibidor | Con inhibidor |
| Intermareal | 6.54 ± 0.36 | 7.24 ± 0.16 | 104.56 ± 5.77 | 115.76 ± 2.60 | nd | nd |
| Marisma | 12.04 ± 0.4 | 10.76 ± 0.51 | 177.71 ± 6.54 | 158.77 ± 8.3 | nd | nd |
| Vegetación | 0.19 ± 0.00 | 0.24 ± 0.02 | 2.87 ± 0.00 | 3.47 ± 0.31 | nd | nd |
| Tapete | 11.85 ± 0.40 | 10.52 ± 0.49 | 174.84 ± 5.95 | 155.30 ± 7.21 | nd | nd |

Tabla 4.3- Producción y emisión de CH₄ en el sedimento del intermareal y de la marisma (zona con vegetación y con tapete) con y sin inhibidor de la oxidación aeróbica. (nd, no detectado).

Por otro lado, los resultados sugieren que la mineralización anaeróbica de la materia orgánica tiene lugar, principalmente, a través de la reducción completa del nitrato a nitrógeno molecular (desnitrificación), sin formarse compuestos gaseosos intermediarios como el óxido nitroso. Al menos así podría ocurrir en la marisma. En el sedimento del intermareal ¿tendrá lugar la mineralización anaeróbica de la materia orgánica a través de la sulfatorreducción? La ausencia de desnitrificación y las características fisicoquímicas del sedimento del intermareal nos hace pensar que esto podría ser así y se intentará dar una respuesta.

2.3. Metanogénesis. Factores que controlan su producción

2.3.1. Efecto de la temperatura en la producción metano

Según muestra la figura 4.15, la **producción real (control) y potencial** (condiciones experimentales) de metano en el estuario **es casi nula entre 15 y 30° C**, aumentando cuando el sedimento alcanza los 35° C. El análisis estadístico confirma las diferencias observadas en la temperatura (ANOVA, $P < 0.05$).

A 35° C se produce metano en **situación real** (control) en la marisma, a razón de 0.14 ± 0.04 y 0.64 ± 0.14 nmol ml⁻¹ h⁻¹, valores correspondientes a la zona de tapete y de vegetación, respectivamente. En cuanto a la **producción potencial**, el sedimento intermareal es el que presenta mayores tasas, registrándose un máximo de 5.4 ± 0.5 nmol ml⁻¹ h⁻¹ en la incubación con sustrato (acetato) e inhibidor de sulfatorreducción. En la zona de la marisma con vegetación se produce como máximo 2.84 ± 0.79 nmol ml⁻¹ h⁻¹, mientras que en la de tapete tan sólo 0.21 ± 0.06 nmol ml⁻¹ h⁻¹, ambos en adición de sustrato. Las diferencias entre las distintas zonas resultaron estadísticamente significativas (ANOVA, $P < 0.05$). El aumento observado en la tasa de producción con los distintos tratamientos a 35° C no siempre es significativo. El test de Tukey ($P < 0.05$), muestra que el sustrato no ejerce ningún efecto significativo; en cambio, el inhibidor sólo o junto con el sustrato, aumenta la producción significativamente hasta 5.4 veces respecto al control en el sedimento intermareal.

Estos resultados ponen de manifiesto que la temperatura del sedimento es un factor clave en la producción de metano. La temperatura óptima, del rango ensayado, para las bacterias metanogénicas es 35° C; sin embargo, incluso a esta temperatura hay otros factores que intervienen en el control de la producción de metano. ¿Cuales son estos factores? ¿Cómo influyen? En este experimento ya se apunta al sustrato y a la competencia por él entre bacterias metanogénicas y BSR, pero ¿cómo influye el sustrato en la metanogénesis? ¿estará la producción de metano limitada por su disponibilidad *in situ*? ¿afectará el tipo de sustrato? Estas son algunas de las cuestiones que se irán resolviendo en los siguientes apartados.

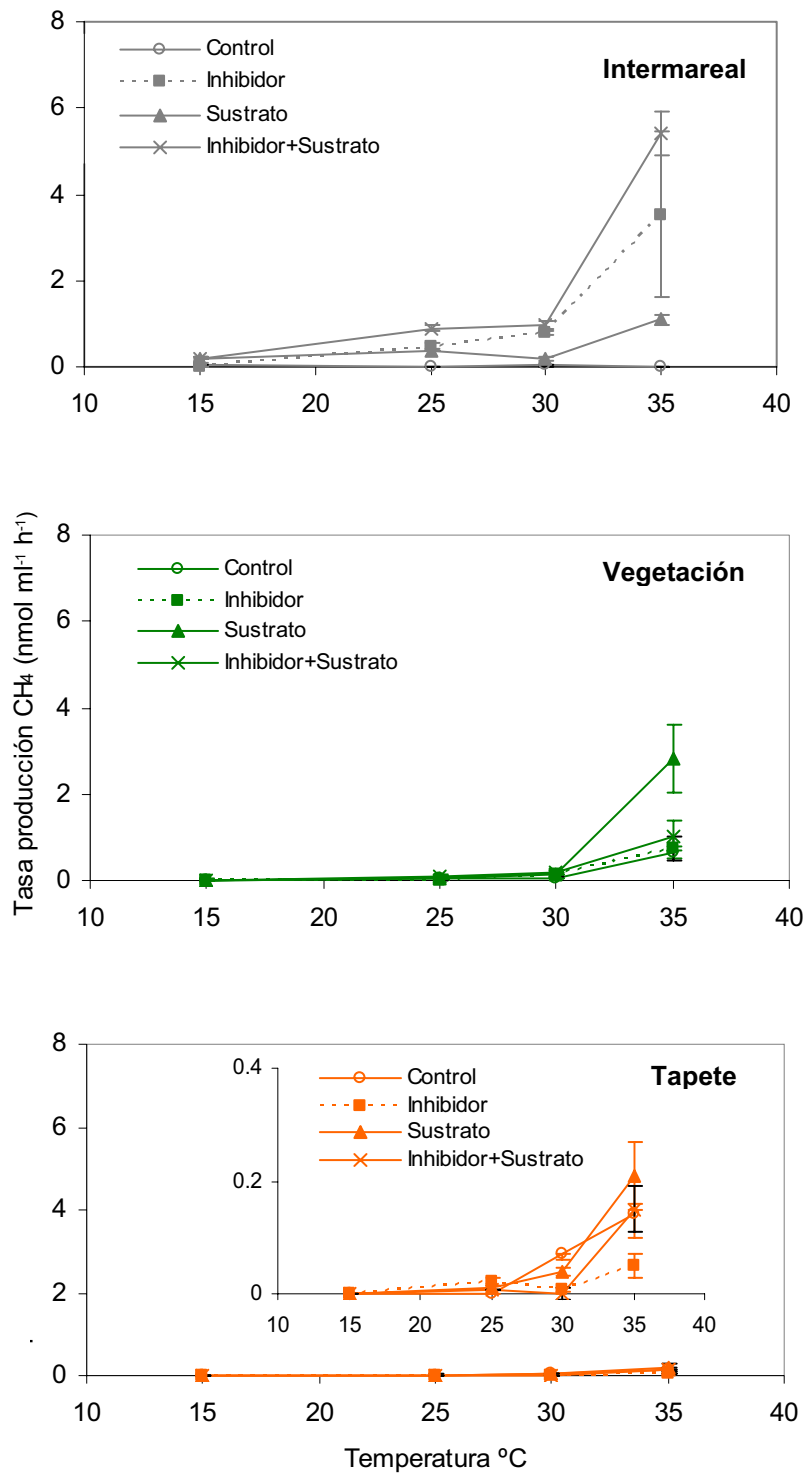


Figura 4.15.- Producción de CH₄ a distintas temperaturas (15, 25, 30 y 35° C) para los distintos tratamientos en cada uno de los sedimentos estudiados.

2.3.2. Efecto de dos sustratos: acetato y metanol

La producción de metano aumenta significativamente **con los dos sustratos** ensayados (Figura 4.16). El análisis estadístico encuentra diferencias significativas entre ellos y en el sedimento, lo que indica que no aumentan por igual en cada zona (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

En el estuario, las bacterias metanogénicas usan **el metanol** con preferencia sobre el acetato. En el sedimento del intermareal la tasa aumenta 15 veces más con el metanol que con el acetato. En la zona de la marisma con tapete el efecto es menor, aumentando 7 veces más que el acetato, mientras que en la zona con vegetación no podemos confirmar que haya preferencia por algún sustrato. La casi inexistente formación de metano en este caso, sugiere que es otro el factor que limita la actividad.

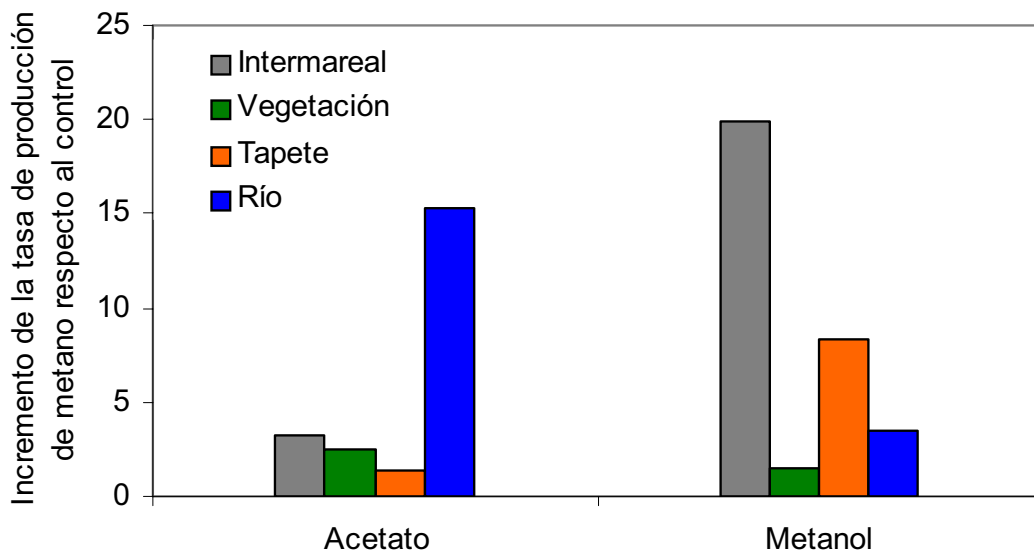


Figura 4.16.- Efecto de la adición de dos sustratos (acetato sódico y metanol) en la tasa de producción de CH_4 en sedimento del estuario (intermareal, y marisma con vegetación y tapete) incubado a 35°C . Se muestra el incremento de la tasa respecto al control.

En el río, las bacterias utilizan preferentemente **el acetato**, aumentando la actividad casi 12 veces respecto al metanol. Estos resultados nos sugieren que la producción de metano en el estuario del río Palmones está sujeta a la disponibilidad y al tipo de sustrato en el sedimento. La concentración del sustrato en el estuario no es suficiente para mantener el rendimiento óptimo de las bacterias metanogénicas. ¿Por qué esa preferencia por el sustrato en los distintos sedimentos? Se conoce que las bacterias metanogénicas compiten con las BSR por el sustrato. En sedimentos marinos ricos en sulfato, las BSR compiten con ventaja sobre las metanogénicas por el CO_2/H_2 y el acetato (Winfrey and Zeikus, 1977; Schönheit et al., 1982; Zinder, 1993), de ahí que en estos sedimentos utilicen compuestos metilados como el metanol (Le Mer and Roger, 2001). En cambio, en sedimentos fluviales el acetato es el sustrato que sustenta a las bacterias metanogénicas. A continuación, nos preguntamos: ¿Se establece competencia por el sustrato en el estuario de Palmones?

2.3.3. Competencia entre bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras

En las figuras 4.17 y 4.18, se representan las tasas de producción de metano obtenidas en el estuario y en el río utilizando los sustratos acetato y metanol, respectivamente. Con **acetato** (Figura 4.17), el aumento observado en la tasa de producción con todos los tratamientos es significativo excepto con el inhibidor (ANOVA y test de Tukey, $P < 0.05$). Sin embargo, el aumento significativo de la tasa cuando hay sustrato y la sulfatorreducción está inhibida respecto al sustrato sólo, indica que las bacterias metanogénicas y las BSR compiten por el acetato, aunque la disponibilidad del sustrato es el factor de control clave en la producción de metano.

Estos resultados se han observado en el sedimento del río, en el intermareal y en la zona de la marisma con tapete. En cambio, en la zona de la marisma con vegetación es probable que haya otra causa por la que no se detecta producción en el control, ni se haya producido respuesta con los tratamientos. El análisis de la varianza corrobora las observaciones realizadas en los distintos sedimentos (ANOVA y test de Tukey, $P < 0.05$).

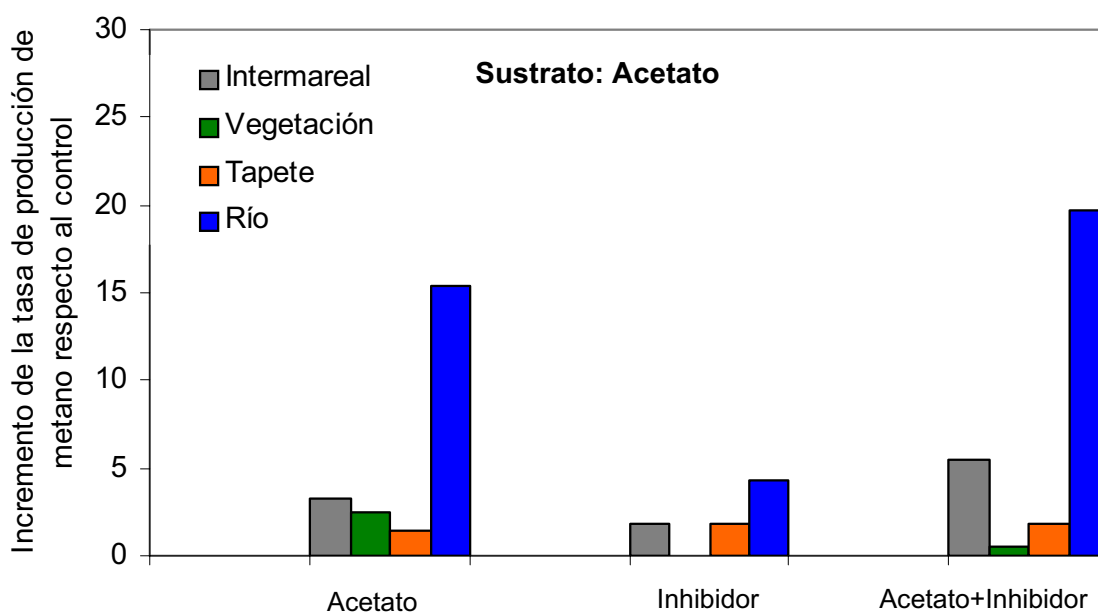


Figura 4.17.- Efecto de un inhibidor de la sulfatorreducción (Molibdato sódico, 10 mM) en la tasa de producción de CH_4 con el sustrato acetato. Los resultados se expresan como incremento de la tasa respecto al control.

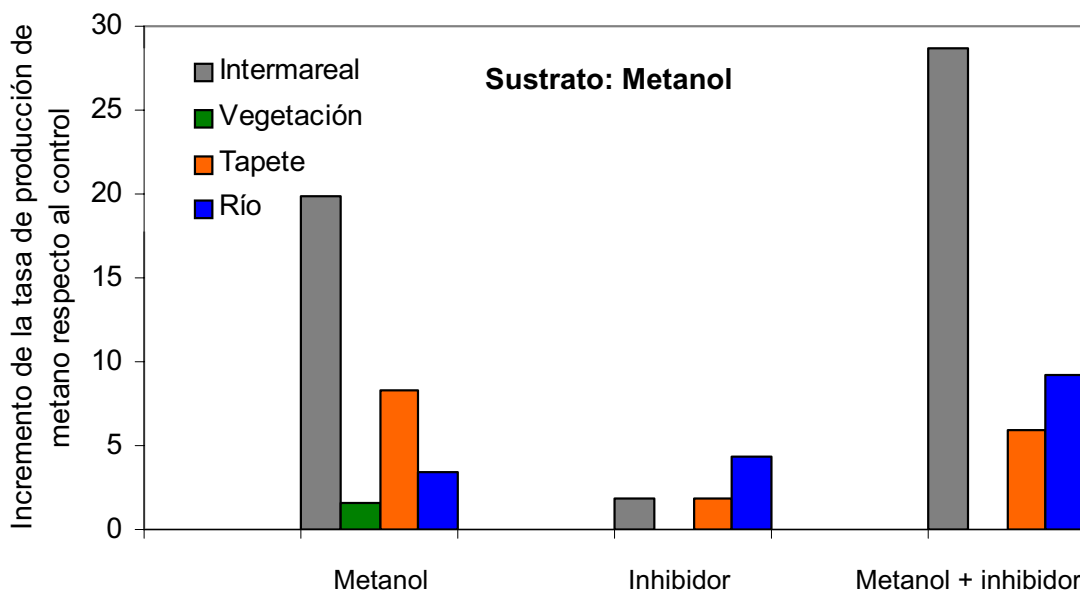


Figura 4.18.- Efecto de un inhibidor de la sulfatorreducción (Molibdato sódico, 10 mM) en la tasa de producción de metano CH_4 con el sustrato metanol. Los resultados se expresan como incremento de la tasa respecto al control.

En las incubaciones con **metanol** (Figura 4.18), a diferencia de lo que ocurre con el acetato, la producción de metano sólo aumenta significativamente con el sustrato, entre 1.5 y 20 veces en el estuario y 3.5 en el río (ANOVA y test de Tukey, $P < 0.05$). Por tanto, las bacterias metanogénicas y las BSR no compiten por el metanol, y el factor que controla la producción de metano en el sedimento es la disponibilidad del sustrato. Las diferencias observadas en los distintos sedimentos son estadísticamente significativas (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

Si en sedimentos ricos en sulfato las BSR compiten más eficientemente que las metanogénicas por el metanol, ¿en qué grado afecta la concentración de sulfato en la producción de metano?

2.3.4. Inhibición por sulfato

La inhibición que sufre la producción de metano por el sulfato sigue el modelo de saturación descrito por Michaelis-Menten (Figura 4.19). A partir de este modelo se estima que a 0.40 ± 0.18 mM de sulfato sódico, concentración muy inferior a la que habitualmente se encuentra en los sedimentos marinos, la metanogénesis se inhibe en un 50%. Según el modelo el porcentaje de inhibición máximo ($81.78 \pm 3.37\%$) se alcanza a una concentración de 60 mM.

Teniendo en cuenta estos resultados y que la concentración de sulfato en el estuario del río Palmones varía entre 14.74 ± 2.57 y 33.51 ± 11.14 mM en el intermareal, y entre 20.11 ± 6.02 y 89.50 mM en la marisma, la actividad metanogénica estaría inhibida entre un 60 y un 80%, aproximadamente. Según el rango de sulfato, en la marisma la inhibición sería algo mayor que el sedimento del intermareal.

El sulfato se correlaciona positivamente con el contenido en sales, por lo que la salinidad es otro factor clave que inhibe la producción de metano en sedimentos marinos. ¿En que grado afectará al estuario?

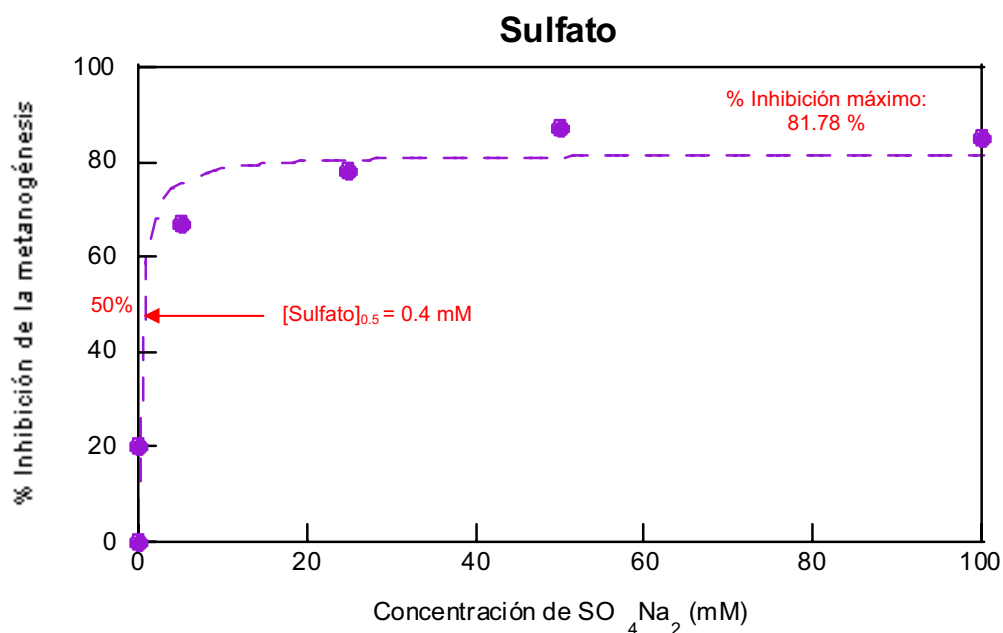


Figura 4.19.- Porcentaje de inhibición de la metanogénesis a concentraciones crecientes de sulfato sódico (SO_4Na_2) en sedimento del río Palmones (0.1, 1, 5, 25, 50 y 100 mM). La línea de puntos discontinuos representa el ajuste según el modelo de saturación de Michaelis-Menten.

2.3.5. Inhibición por salinidad

En la figura 4.20 se muestra el porcentaje de inhibición de la metanogénesis en relación con el gradiente de salinidad obtenido experimentalmente con sedimento fluvial del río de Palmones y al gradiente espacial en el estuario del río Tajo. Como puede observarse en la figura, en ambos casos la salinidad ejerce una fuerte inhibición.

En el sedimento del **río Palmones** la inhibición es casi del 95% en todo el rango ensayado, sin que existan diferencias significativas entre sí (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). En el estuario del **río Tajo** el grado de inhibición es algo menor, entre el 68 y el 88%, y el análisis de la varianza tampoco manifiesta diferencias significativas en el rango de salinidad ensayado.

Estos resultados indican que las bacterias metanogénicas están poco adaptadas a vivir en sedimentos salinos. Por otro lado, el menor grado de inhibición registrado en el sedimento del estuario del río Tajo frente al sedimento fluvial del río Palmones, pone de manifiesto la adaptación de las bacterias metanogénicas *in situ* al estar sometidas a cambios de salinidad diarios, estacionales y anuales derivados de la propia dinámica del estuario.

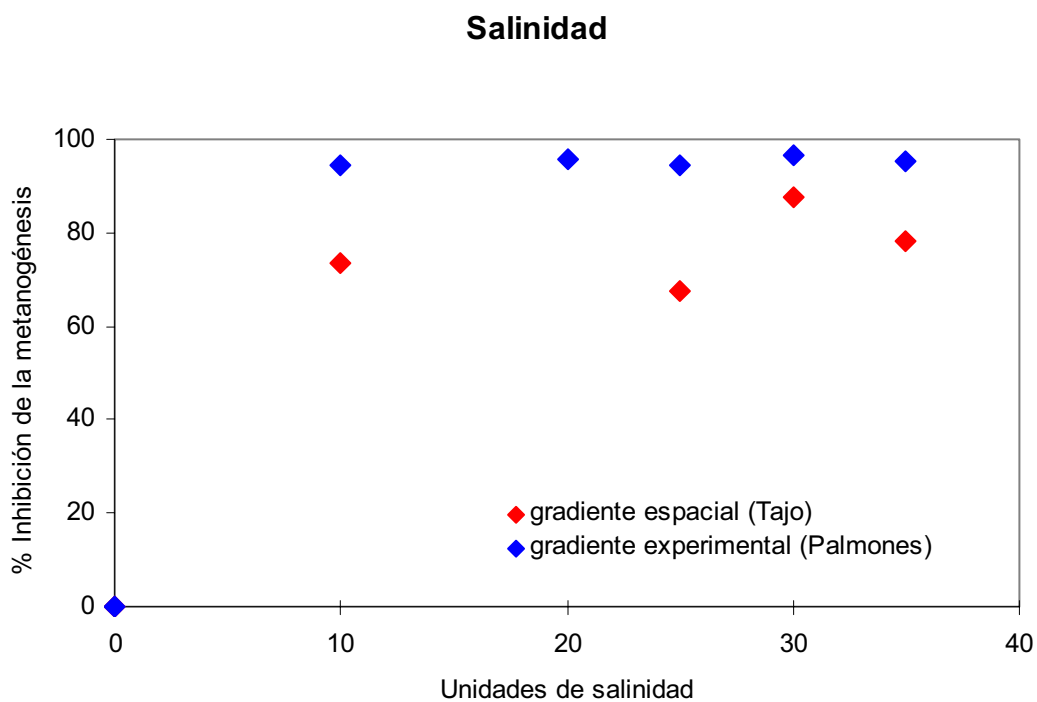


Figura 4.20.- Porcentaje de inhibición de la metanogénesis a concentraciones crecientes de salinidad en sedimento del río Palmones (0, 10, 20, 25, 30 y 35) y a lo largo de un gradiente espacial en el estuario del río Tajo (Lisboa, Portugal): sal. 0 en Vila Franca, 10 en Alcochete, 25 en Pancas, 30 en Rosário y 35 en Corroios.

Anualmente, la salinidad del estuario del río Palmones oscila en un rango muy amplio, entre 30 y 90, debido a la frecuencia de la inundación de la marea y a las tasas de evaporación (Palomo, 2004). Según esta observación y los resultados

obtenidos experimentalmente en Palmones las bacterias metanogénicas estarían sometidas a una inhibición casi total por el contenido en sales en el sedimento.

2.4. Producción de óxido nitroso y desnitrificación (N₂)

2.4.1. Efecto de la temperatura en la producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular (desnitrificación)

No se detectó **producción real** (control) de óxido nitroso ni actividad desnitrificante (producción de nitrógeno molecular) a ninguna de las temperaturas ensayadas (Figura 4.21). Para ambos se detecta **producción potencial**, la producción de nitrógeno molecular puede llegar a ser hasta dos órdenes de magnitud superior a la de óxido nitroso. La temperatura aumenta la producción de ambos, alcanzando el valor más alto a 35° C. En el sedimento de la marisma es donde más claramente se observa el aumento, especialmente en la de tapete, registrándose a 35° C una tasa de producción de óxido nitroso de 40.77 ± 0.17 nmol N₂O-N g⁻¹ d⁻¹ frente a los 10.41 ± 1.65 y los 3.32 ± 0.63 nmol N₂O-N g⁻¹ d⁻¹ producidos en el sedimento de la zona de la marisma con vegetación y el intermareal, respectivamente. Los valores obtenidos de la tasa de desnitrificación fueron 946.07 ± 35.64 nmol N g⁻¹ d⁻¹ en la zona de tapete, 638 ± 94.14 en la zona de plantas y 424.12 ± 35.64 en el intermareal. El análisis de la varianza indicó que las diferencias observadas en cada sedimento, con cada tratamiento (con o sin la adición de nitrato) y a cada temperatura ensayada son estadísticamente significativas (ANOVA y Test de Tukey, P<0.05).

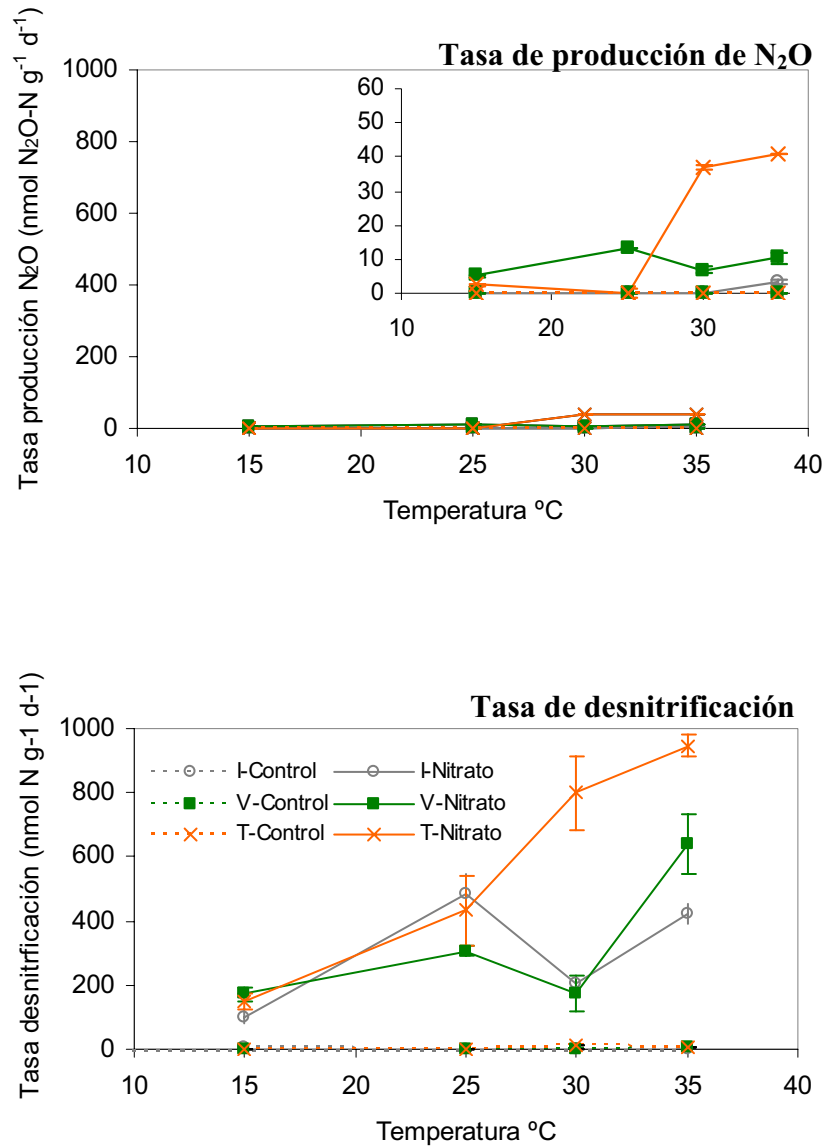


Figura 4.21.- Tasa de producción de N₂O y de desnitrificación (N₂) a distintas temperaturas (15, 25, 30 y 35 °C) en el control y en concentración saturante de NaNO₃ (10 mM). En la leyenda se indica el sedimento intermareal (I), sedimento de la marisma cubierto de vegetación (V) y con tapete (T).

2.4.2. Disponibilidad de nitrato

La producción de óxido nitroso y la tasa de desnitrificación aumenta linealmente de forma significativa en el rango ensayado de nitrato sódico (5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM), según se representa en el ajuste de regresión lineal de la figura 4.22.

El estuario sólo produce **óxido nitroso** a las concentraciones más elevadas de nitrato ensayadas, 500-1000 μM , valores muy superiores a los que se encuentran habitualmente en el sedimento del estuario (4.55 ± 1.37 y $117.64 \pm 32.56 \mu\text{M}$). El análisis estadístico muestra que hay diferencias significativas al aumentar la adición de nitrato de 500 a 1000 μM , salvo en la zona de marisma cubierta con tapete (ANOVA, $P < 0.05$). Se produce como máximo $49.23 \pm 2.75 \text{ nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que corresponde a la zona de la marisma cubierta de macrófitos incubada con 1000 μM (Tabla 4.4). Los valores más bajos se registran en el sedimento intermareal, menos de $10 \text{ nmol N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Las diferencias observadas en los sedimentos resultan significativas (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$).

La **producción de nitrógeno molecular** (desnitrificación) en el estuario es hasta 20 veces superior a la de óxido nitroso. Incluso sin la adición de nitrato (control) se detecta producción en el sedimento de la marisma alta cubierto con tapete ($6.18 \pm 0.5 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$). La adición de concentraciones crecientes de nitrato aumenta significativamente la producción en todos los casos, desde valores inferiores a $3 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a 5 μM hasta casi $1000 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a 1000 μM . Por zonas, la marisma con tapete es la que muestra menor producción ($6.18 \pm 0.5 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $160.13 \pm 4.62 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a 5 y 1000 μM , respectivamente) y la cubierta por vegetación la que más, con valores que oscilan entre 1.98 ± 0.55 y $922.50 \pm 2.25 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a 5 y 1000 μM , respectivamente. En el sedimento intermareal se producen entre 2.88 ± 0.97 y $613.58 \pm 5.67 \text{ nmol N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El análisis estadístico muestra que las diferencias por zonas son significativas (ANOVA, $P < 0.05$).

Atendiendo a estos resultados y al rango de concentración real de nitrato en el agua intersticial del estuario la producción de óxido nitroso y nitrógeno molecular estaría limitada. ¿Influirá la fuente de carbono orgánica?

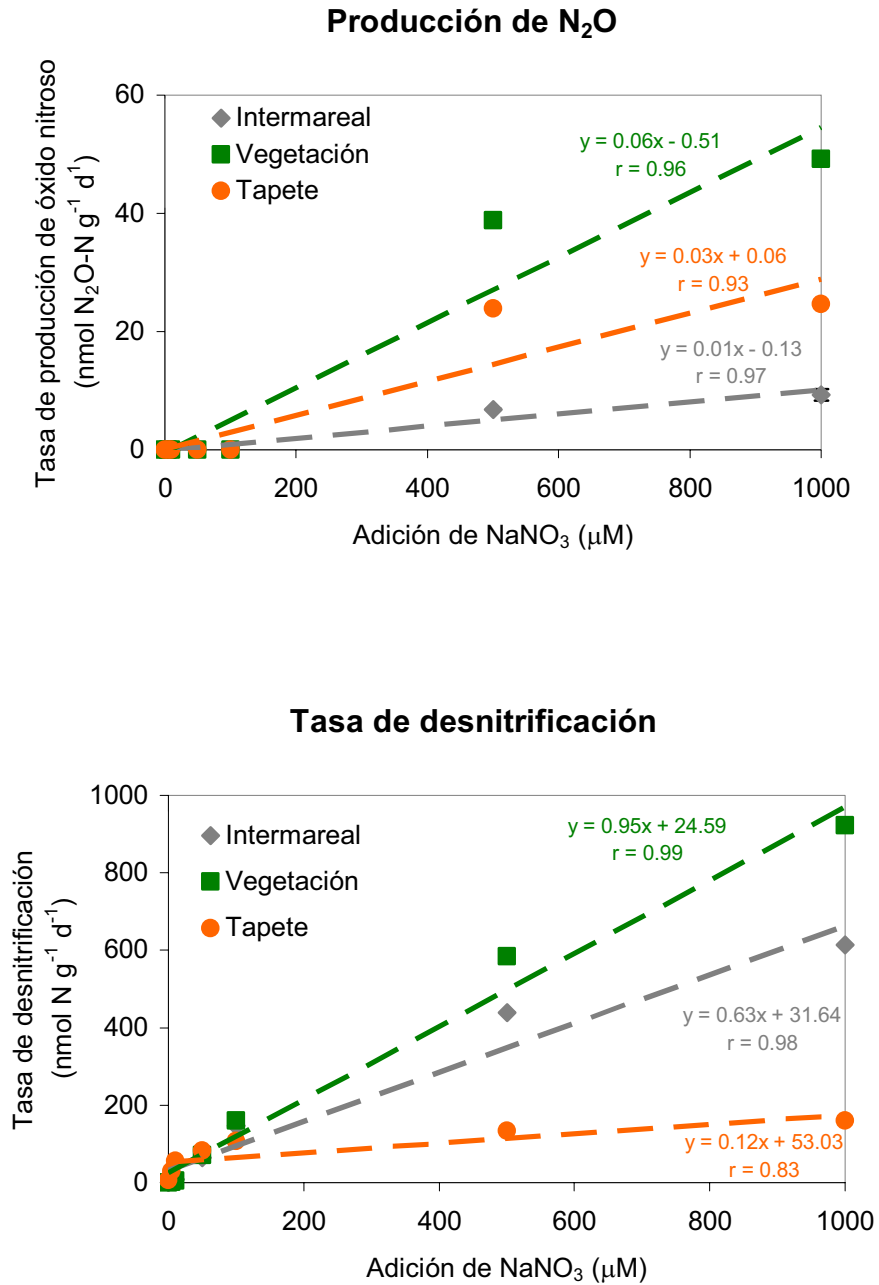


Figura 4.22.- Ajuste de regresión lineal de la producción de N₂O y tasa de desnitrificación (N₂) frente a la adición de concentraciones crecientes de NaNO₃ en el sedimento del intermareal y de la marisma (zona de vegetación y tapete) a 35° C.

| <i>Sedimento intermareal</i> (nitrato inicial: $2.21 \pm 0.07 \mu\text{M}$) | | |
|--|---|---|
| Adición de [NaNO ₃] μM | Producción N ₂ O (nmol N ₂ O-N g ⁻¹ d ⁻¹) | Tasa de desnitrificación (nmol N g ⁻¹ d ⁻¹) |
| 0 | - | - |
| 5 | - | 2.88 ± 0.77 |
| 10 | - | 7.82 ± 4.56 |
| 50 | - | 64.45 ± 3.94 |
| 100 | - | 146.29 ± 1.80 |
| 500 | 6.84 ± 0.14 | 439.64 ± 1.52 |
| 1000 | 9.33 ± 0.99 | 613.58 ± 5.67 |

| <i>Sedimento de la marisma con vegetación</i> (nitrato inicial: $7.93 \pm 0.01 \mu\text{M}$) | | |
|---|---|---|
| Adición de [NaNO ₃] μM | Producción N ₂ O (nmol N ₂ O-N g ⁻¹ d ⁻¹) | Tasa de desnitrificación (nmol N g ⁻¹ d ⁻¹) |
| 0 | - | - |
| 5 | - | 1.98 ± 0.55 |
| 10 | - | 5.71 ± 0.49 |
| 50 | - | 71.61 ± 2.74 |
| 100 | - | 159.95 ± 14.53 |
| 500 | 38.82 ± 1.25 | 583.48 ± 5.83 |
| 1000 | 49.23 ± 2.75 | 922.50 ± 2.25 |

| <i>Sedimento de la marisma con tapete</i> (nitrato inicial: $10.10 \pm 0.05 \mu\text{M}$) | | |
|--|---|---|
| Adición de [NaNO ₃] μM | Producción N ₂ O (nmol N ₂ O-N g ⁻¹ d ⁻¹) | Tasa de desnitrificación (nmol N g ⁻¹ d ⁻¹) |
| 0 | - | 6.18 ± 0.50 |
| 5 | - | 29.41 ± 4.62 |
| 10 | - | 55.55 ± 4.62 |
| 50 | - | 81.70 ± 4.62 |
| 100 | - | 107.84 ± 4.62 |
| 500 | 23.86 ± 0.97 | 133.98 ± 4.62 |
| 1000 | 24.60 ± 0.21 | 160.13 ± 4.62 |

Tabla 4.4.- Producción de N₂O y tasa de desnitrificación (N₂) frente a la adición de concentraciones crecientes de NaNO₃ en el sedimento del intermareal y la marisma (zona de vegetación y tapete) a 35° C.

2.4.3. Fuente de carbono orgánico

La fuente de carbono orgánica utilizada en la **producción de óxido nítrico** depende de la zona del estuario. En la marisma baja cubierta con vegetación se utiliza la glucosa, aumentando la producción 2.5 veces respecto al control. En la zona alta con tapete las bacterias prefieren el metanol, que aumenta la tasa 1.4 veces con respecto al control. Sin embargo, en el intermareal no se detecta producción en ningún caso (Figura 4.23). El análisis de la varianza y el test de Tukey ($P < 0.05$) confirman las diferencias observadas en la producción debido a los sustratos en las distintas zonas son significativas.

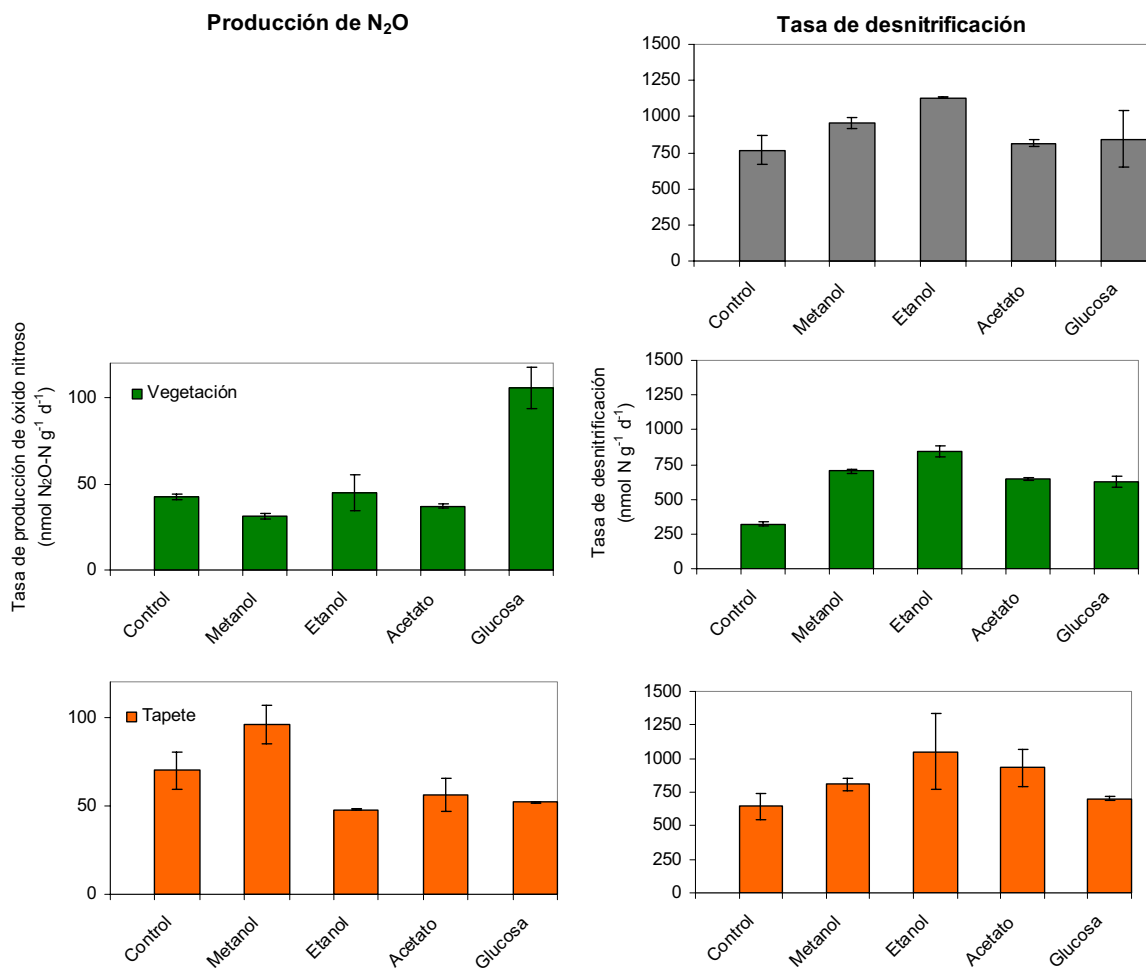


Figura 4.23.- Efecto de distintas fuentes de carbono orgánico (10 mM de metanol, etanol, acetato y glucosa) en la producción de N₂O y en la tasa de desnitrificación (N₂) en sedimento del intermareal y de la marisma (zona de vegetación y tapete) a 35° C.

Al igual que en la producción de óxido nitroso, el sustrato que utilizan las bacterias desnitrificantes varía según la procedencia del sedimento. El etanol es el sustrato comúnmente utilizado por las bacterias desnitrificantes en las tres zonas, aumentando la producción de **nitrógeno molecular** respecto al control más del doble (2.62) en la marisma con vegetación, 1.64 veces en la zona que presenta tapetes y casi 1.5 veces en el intermareal. En la marisma con vegetación también aumentan significativamente la tasa de desnitrificación respecto al control el metanol, el acetato y la glucosa, sin que el análisis estadístico encuentre diferencias significativas con el etanol. (ANOVA y Test de Tukey, $P < 0.05$). A diferencia de ésta, en la zona con tapete no se metaboliza la glucosa, y el efecto de los sustratos en la tasa es algo menor.

En general, se percibe un déficit de sustrato para que la desnitrificación tenga lugar en el estuario, que a la vista de los resultados, parece ser mayor en la marisma, y más concretamente, en la parte baja donde se disponen las plantas.

2.5. Metanogénesis y sulfatorreducción

Los resultados indican que la formación de metano en el sedimento del intermareal coexiste con la oxidación anaeróbica de la materia orgánica por reducción del sulfato, detectándose una tasa de $33.13 \pm 5.6 \text{ nmol SO}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$, frente a una producción de metano de $0.20 \pm 0.03 \text{ nmol CH}_4 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figuras 4.24).

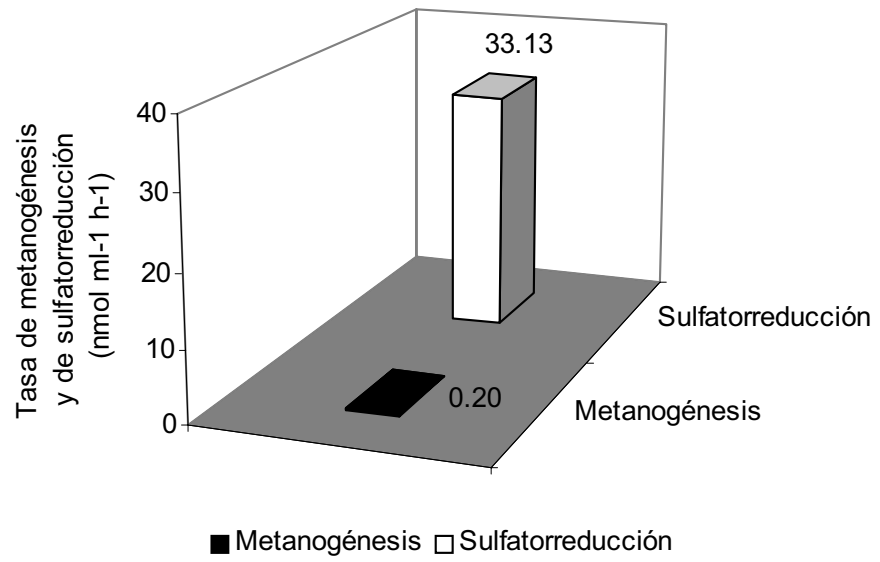


Figura 4.24.- Tasa de producción de CH₄ y de sulfatorreducción (desaparición de sulfato) en el sedimento del intermareal a 35° C.

5. Discusión

1. El Sedimento del Estuario: el Soporte Físico donde tiene lugar la Producción de Gases
2. Producción y Emisión in situ de Gases con Efecto Invernadero: CH₄, N₂O y N₂
3. Producción y Emisión Espacial y Temporal de los Gases en el Estuario
4. Capacidad de Producción y Degasificación del Estuario. Su Importancia en el Reciclado de los Nutrientes y su Incidencia en el Cambio Climático

1. El Sedimento del Estuario: El Soporte Físico donde tiene lugar la Producción de Gases

El sedimento constituye el soporte físico donde tiene lugar la descomposición de la materia orgánica, y sus propiedades fisicoquímicas determinan el uso de los aceptores de electrones en la mineralización, de lo que depende el tipo de compuesto gaseoso formado en el sedimento y emitido a la atmósfera. En el estuario de Palmones, como discutiremos a continuación, se han diferenciado dos ambientes claramente definidos por sus diferentes propiedades fisicoquímicas, **el intermareal** y **la marisma**, que muestran distinto comportamiento en la dinámica de los gases. En la marisma, a menor escala, se establecen diferencias atendiendo a la topografía, cuyas propiedades fisicoquímicas difieren lo suficiente como para influir en la intensidad con la que tienen lugar los procesos de producción y degasificación.

Autores, como Abril y Borges (2004), ya han hecho referencia a la zonación de los estuarios según sus propiedades biogeoquímicas, y por ellas los dividen en dos grandes áreas: la submareal, que incluiría el canal principal y el sedimento intermareal; y la marisma. Para estos autores, el sedimento del intermareal, es aquel que, por acción de la marea, emerge periódicamente quedando expuesto a la atmósfera; las grandes superficies de humedales donde se desarrollan diversas especies de macrófitos y que están influenciadas por la marea, constituyen la marisma.

En el estuario del río Palmones, el sedimento del intermareal ocupa una gran superficie (Clavero et al., 1997). La caracterización que hemos llevado a cabo en este trabajo (Figura 5.1), lo describe como un sedimento arenoso, con pH en torno a la neutralidad o ligeramente alcalino, y anóxico a partir del primer cm, lo que le confiere un fuerte poder reductor. La marisma en cambio, presenta una granulometría más fina, dominando las fracciones limosas y arcillosas, con pH más ácidos, aeróbico al menos en los 10 primeros cm y oxidante. Su contenido en materia orgánica, C, N y sulfato es mayor que en el intermareal, aunque presenta menos S. Las propiedades del sedimento de estas dos zonas son reflejo del efecto

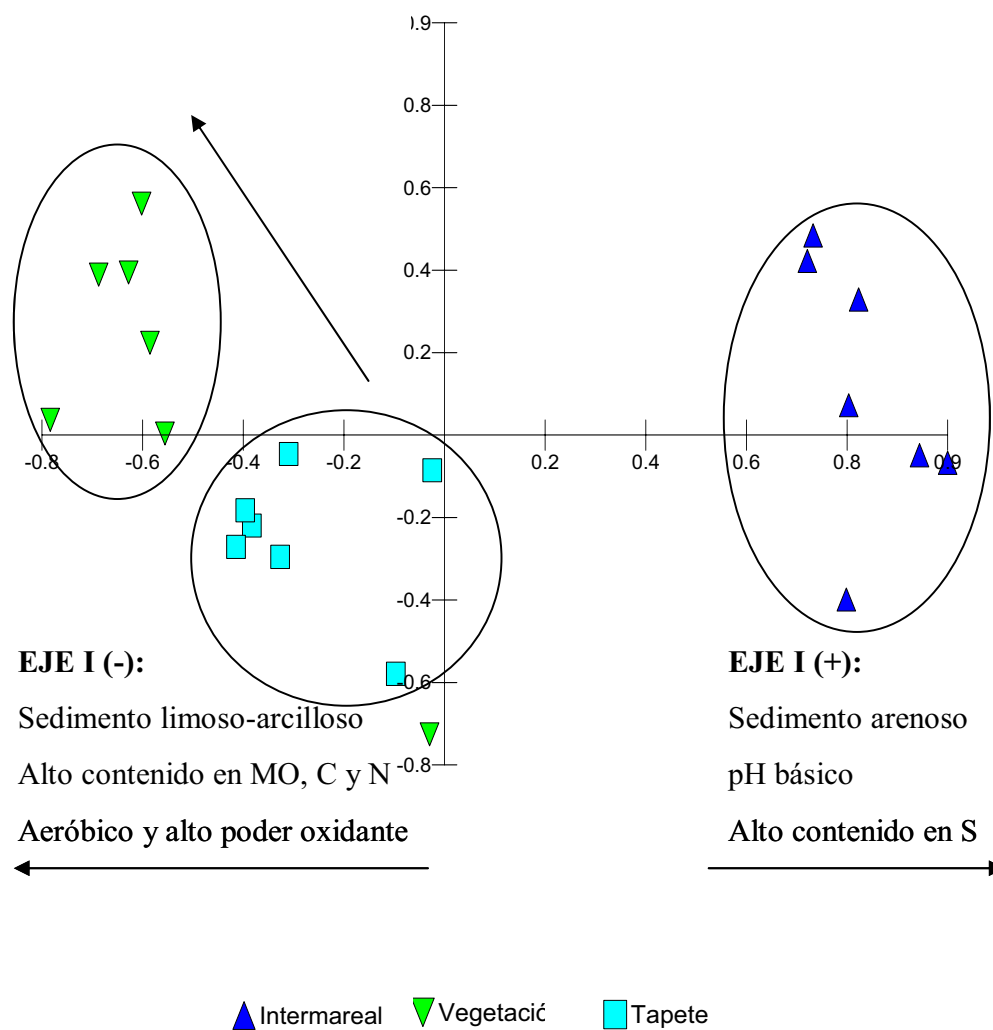


Figura 5.1.- Representación de las zonas del estuario según los resultados del análisis de los componentes principales. Porcentaje de la varianza del eje I: 47.87, y del eje II: 14.68.

que ejerce en ellas la marea y la vegetación, cobrando especial importancia la biomasa radicular respecto a la biomasa aérea (Caçador et al., 1996) (Tabla 5.1).

| Intermareal | Marisma |
|--------------------|-------------------------|
| arenoso | limoso-arcilloso |
| alcalino | ácido |
| anóxico | oxigénico |
| reductor | oxidante |
| rico en S | rico en MO |
| | alto C:N |
| | rico en SO ₄ |

Tabla 5.1.- Características fisicoquímicas de los sedimentos del intermareal y de la marisma.

El potencial redox del sedimento de la marisma de Palmones (entre algo menos de 100 y 200 mV, aproximadamente), entra dentro del rango que presentan los estudios realizados por Armstrong et al. (1985) en sedimentos de la zona de mayor elevación de la marisma del estuario Humber (Inglaterra): 0 y 800 mV. El amplio rango de oscilación que han encontrado estos autores se debe a las variaciones asociadas a la estacionalidad y a los periodos de inundación de la marea. Los resultados de otros autores, como por ejemplo los de Cartaxana y Lloyd (1999) en la marisma del río Tajo (Lisboa, Portugal), contrastan en este sentido, presentando sedimentos anóxicos desde el primer centímetro y medio, más acorde con los que hemos encontrado en este trabajo en el sedimento intermareal. La controversia desaparece cuando se tiene en consideración que nuestros resultados y los de Armstrong et al. (1985) corresponden a la zona media-alta de la marisma, mientras que los de Cartaxana y Lloyd (1999) se refieren a la zona más baja colindante con el caño. De ahí que su similitud con el sedimento del intermareal.

Durante los periodos de inundación de la marea, el oxígeno se agota rápidamente y la oxidación de la materia orgánica tiene lugar a través de otros aceptores de electrones distintos al oxígeno que dan lugar a un conjunto de sustancias orgánicas e inorgánicas en estado reducido, aumentando el carácter reductor del sedimento (Adam, 1990). El grado de anoxia y el poder reductor que alcanza el sedimento dependerá de la frecuencia y el tiempo de inundación. Es evidente que la marisma al sufrir menos episodios de inundación y más cortos que la zona del intermareal, el sedimento sea aeróbico al menos en los 10 primeros cm y oxidante.

Por otro lado, las plantas facilitan la oxigenación del sedimento de la marisma y, por tanto, a aumentar su potencial de oxido-reducción. Gracias a la relación de simbiosis que se establece entre la biomasa radicular de la planta y la rizosfera, se forman microentornos oxigenados alrededor de las raíces (De Bont et al., 1978; Schütz et al., 1991). Además, excretan sustancias orgánicas que acidifican el sedimento de la marisma (Whiting and Chanton, 1993; Thomas et al., 1995; Bubier, 1995).

El sedimento de la marisma del río Palmones se encuentra enriquecido en materia orgánica, con un 15-20% del peso total del sedimento, respecto al intermareal que no supera el 10%. Estos datos son similares a los que presentan estudios realizados en los últimos años en el estuario de Palmones: en el intermareal, se recogen datos entre 13-14% de MO (e.g. Izquierdo, 2001; Avilés, 2002; Moreno y Niell, 2003) y en la marisma un contenido medio con casi el 23% de contenido medio (Palomo, 2004).

El mayor contenido de restos orgánicos en la marisma viene dado por las grandes cantidades de materia orgánica que aportan las plantas al sedimento, las comunidades de los tapetes microbianos, y los exopolímeros que producen, que además, determinan la calidad de la materia orgánica del sedimento. Palomo (2004) concluye que en la marisma de Palmones, el ciclo de biomasa de *Sarcocornia* sp. se produce muy rápido, con una tasa de renovación de 0.8-1 año⁻¹, lo que genera gran

cantidad de detritos anualmente al estuario: 2372 g m⁻² procedentes de la región aérea, y 1022 g m⁻² de la región radicular. Hay que tener en cuenta, que los últimos trabajos sobre los flujos de materia orgánica, por ejemplo los de Haines (1977), Wolff et al., (1989), o Danais y Legendre (1986), han roto con la idea que defendían Odum (1961), Chapman (1960) o Teal (1962) de que las marismas son sistemas muy productivos que exportan gran cantidad de materia orgánica a las zonas costeras. En realidad, sólo una pequeña parte (12-18%) de la producción primaria es exportada por la acción de las mareas, y aunque desplazan y redistribuyen los detritos, la mayoría quedan finalmente en la marisma (Palomo, 2004). El sedimento del intermareal también recibe un aporte orgánico considerable por detritos de origen terrestre, marino y antropogénico, y resto de macroalgas, sin embargo, la renovación del agua, y el desplazamiento de las macroalgas por la marea a causa de la ausencia de un sistema radicular, hacen que el aporte orgánico sea inferior al de las plantas vasculares en la marisma, y que su calidad difiera. De este modo, se entiende el mayor contenido de restos orgánicos en el sedimento de la marisma en comparación con el del intermareal.

El sedimento del intermareal presenta menos C y N que la marisma, de acuerdo con el balance anual calculado en la marisma por Palomo (2004) y en el sedimento intermareal por Clavero (1992). En esto influye la calidad de los detritos que se acumulan en cada uno de los sedimentos. En la marisma, como se comentó con anterioridad, las plantas aportan gran cantidad de materia orgánica. La calidad de los detritos de *Sarcocornia* sp., muy ricos en C, favorece la generación de compuestos húmicos que se acumulan en el sedimento por su alta resistencia a la degradación microbiana (Richards, 1987). Se acumula en la marisma, una cantidad de C muy superior a la del sedimento del intermareal, generalmente compuestos de difícil degradación como celulosa, xylana, lignina, suberina, cutina, fenoles y resinas. En cuanto al nitrógeno, diversos autores señalan que una parte importante del N que se encuentra en el sedimento de la marisma procede de la deposición de la biomasa aérea (Goulding, 1990; Koerselman y Verhoeven, 1992).

Las concentraciones totales de C y N de la marisma registrados en este trabajo (40-60 mg C g⁻¹PS) y de N (4.5 mg N g⁻¹PS,) o anteriormente, por ejemplo por Palomo (2004) (40-76 mg C g⁻¹PS, y 3-6 mg N g⁻¹PS), resultan muy altas comparadas con las que presentan otras marismas. Cartaxana (1999) encuentra concentraciones máximas de C de 38 mg C g⁻¹PS, y 3.6 mg N g⁻¹PS de N en la marisma del estuario del río Tajo (Lisboa, Portugal); y Bouchard et al. (1998) valores que oscilan entre 19 y 31 mg N g⁻¹PS. Estas diferencias son el reflejo, por un lado, del grado de eutrofización a la que está sometida la marisma por la propia dinámica de la vegetación, que con una tasa de renovación muy alta, genera gran cantidad de detritos (Palomo, 2004), como comentaremos más adelante, y por otro, de la eutrofización a la que está sometida la cuenca del río Palmones (Clavero et al., 1999; Hernández et al., 1997), que conducen a que el sedimento se convierta en un gran depósito de nutrientes, tanto a nivel del estuario como de las regiones adyacentes de la marisma.

A pesar de la formación y acumulación de compuestos residuales de la degradación, Palomo (2004) ha demostrado que en la marisma una parte considerable del C detrítico es mineralizado hacia compuestos sencillos de bajo peso molecular. Esta retirada de C junto con la inmovilización de N por la comunidad microbiana asociada (Hicks et al., 1991), da lugar en el sedimento de la marisma a valores del índice C:N por debajo de 20, cuando Palomo (2004) concluye que la biomasa senescente que se encuentra todavía en la planta presenta C:N cercanos a 60. El índice C:N ha sido habitualmente utilizado como un indicador de la degradabilidad de los detritos, de manera que un valor de 20:1 se ha considerado el valor crítico entre los procesos de inmovilización o mineralización (Richards, 1987). Valores por debajo de 20 significan que existe nitrógeno disponible que puede mineralizarse y pasar a estar disponible, mientras que por encima de 20 supone la inmovilización de los restos orgánicos durante largos períodos de tiempo. Resulta sorprendente que partiendo de detritos vegetales con C:N cercano a 60, los detritos que se acumulan en el sedimento de la marisma puedan degradarse con cierta facilidad, lo que indica que los restos orgánicos vegetales son susceptibles de una

degradación considerable e inesperadamente rápida supuestamente por bacterias específicas.

El balance anual de S estimado por Palomo (2004) en la marisma de Palmones señala que se acumula en gran cantidad durante el año. No se dispone de datos del balance en el sedimento intermareal, pero los resultados extraído en este trabajo indican que el contenido total de S es mayor en el intermareal que en la marisma. Aunque su ciclo de mineralización-inmovilización transcurre de forma similar al N (Richards, 1987), el contenido de S en el intermareal y la marisma difiere del N. Howarth (1979) encuentra que en los estuarios el sulfato que entra en gran cantidad a través de la marea, una vez en el sedimento, conduciría a su forma reducida, S^2- , en las capas anaeróbicas más profundas, reaccionando rápidamente con metales (hierro o magnesio) y formando precipitados de azufre inorgánicos e insolubles como los compuestos de pirita (FeS_2). Las condiciones fisicoquímicas del sedimento del intermareal podrían favorecer con respecto a la marisma la oxidación anaeróbica de la materia orgánica utilizando el sulfato como aceptor de electrones y la formación de pirita, y por tanto su mayor contenido en S. La concentración de sulfato más baja en el sedimento del intermareal que en la marisma a pesar de que en ésta se retiran gran cantidades del sedimento al ser incorporado por las raíces y transportado en su mayor parte hasta las hojas, donde es reducido y asimilado, parece apoyar esta idea.

En el estuario no se ha observado que el contenido de nitrato en el intermareal y la marisma difieran significativamente; sin embargo, dada su implicación en los procesos de descomposición anaeróbica de la materia orgánica merece la pena hacer algunas consideraciones al respecto. Su concentración en el estuario está determinada por los flujos de intercambio con el canal principal a través de la marea, que a su vez está condicionado por los aportes del río. Resulta sorprendente que la concentración de nitrato del río Palmones es bastante más baja que en otros ríos, lo que conlleva a que la concentración de nitrato también sea baja en el estuario. Avilés (2002) da valores de nitrato en el río entre 0.25 y 46 μM , registrándose siempre los valores más bajos en la cabecera del río y aumentando tras

el embalse de Charco Redondo en dirección al estuario, hecho que Avilés justifica por interacciones con la litología del fondo del embalse o con los materiales de la presa. En cambio, la mayoría de los sistemas fluviales consultados en bibliografía (e.g. Pfening y McMahon, 1996; García et al., 1998) muestran valores del orden de centenas o millares (150-2000 μM). La concentración de nitrato en el estuario aunque varía entre 4.55-117.64, en muy pocas ocasiones superan los 50 μM , por lo que no difiere mucho de la concentración del río. En otros estuarios la concentración de nitrato suele ser mayor que en el de Palmones, oscilan entre 30 y 600 μM , la mayoría de los casos superior a 100 μM (e.g. Barnes y Owens, 1998; Usui et al., 2001; Wang et al., 2007). Tanto el sedimento del intermareal como el de la marisma se encuentra bastante enriquecido en las formas solubles de N inorgánico de amonio. Éste es siempre la forma inorgánica dominante en las marismas, sin embargo, en la literatura no superan lo 200 μM , lo que queda bastante alejado de los 2000 μM que se llegan a encontrar en la superficie del sedimento de Palmones.

Los procesos hidrodinámicos (la marea, el oleaje y el viento) y la geomorfología del estuario afectan a la sedimentación-resuspensión del sedimento, determinando la granulometría del lugar (Demers et al., 1987; Delgado et al., 1991; De Jonge, 1992). Los procesos hidrodinámicos van perdiendo energía a medida que penetra hacia el interior de la marisma, depositándose primero los sedimentos más gruesos. Se encuentra que la zona del intermareal presenta sedimentos con granulometría más gruesa que la marisma, con un alto porcentaje de gravas y arenas. Conforme aumenta la elevación de la marisma también lo hace el porcentaje de la fracción fina, por lo que en la zona más baja el sedimento es más limoso, mientras que en la más elevada es más arcilloso.

Algunos autores han encontrado que la granulometría condiciona la distribución de los organismos en el sedimento. Sedimentos con granulometría gruesa, al estar formados por granos más o menos esféricos en los que apenas se establecen fuerzas significativas de atracción entre las partículas (Paterson y Hagerthey, 2001), dominan diatomeas pequeñas inmóviles que se encuentran adheridas a los granos de arena, mientras que en los sedimentos más finos, formados

por granos alargados con mayor relación superficie-volumen presentan una mayor distribución de cargas en su superficie y fuerzas de atracción (Van del Waals) entre las partículas, favorecen la presencia de grandes diatomeas móviles y cianobacterias (Barranguet et al., 1997). También influye en la distribución de los distintos vegetales en la marisma, al condicionar las características edáficas, dirigiendo esta relación hacia factores como la concentración y la razón entre los distintos iones en el agua del suelo (e.g. Callaway et al., 1990; Alvarez-Rogel et al., 2000, 2001) o la calidad de la materia orgánica (Lenssen et al., 1999).

Por otro lado, el incremento del tamaño de las partículas supone una menor atenuación de la luz en el sedimento (Davis y McIntire, 1983), mientras que la fracción fina contribuye a un mayor contenido orgánico del sedimento al establecerse una relación positiva entre el contenido en arcillas y la adsorción de partículas orgánicas al sedimento (Estacio et al. 1999).

En definitiva, la granulometría influye en la composición y distribución de microorganismos y la vegetación del sedimento, que repercutirá en las propiedades del sedimento favoreciendo a unos u otros procesos biogeoquímicos relacionados con la formación de gases. La falta de bibliografía no nos permite ir más allá de estas consideraciones generales, y no nos ayuda a la hora de matizar las consecuencias de la composición granulométrica del sedimento en los procesos implicados en la formación de gases en el sedimento.

La marisma del estuario del río Palmones aparenta ser un ecosistema bastante más homogéneo de lo que es en realidad. Está constituida por pocas especies, la mayoría de ellas del género *Sarcocornia* lo que le confiere una imagen de pradera continua y uniforme; sin embargo, las distintas especies se distribuyen de acuerdo a un patrón de distribución (Palomo, 2004).

En las marismas, en general, se diferencian distintos niveles establecido por el gradiente topográfico atendiendo a la frecuencia de inundación por las pleamares (Dijkema et al., 1990), que incluye desde las áreas más bajas, inundadas diariamente,

hasta las más elevadas, que sólo se inundan esporádicamente durante episodios de mareas vivas. Este gradiente repercute en la diversidad, tipo y distribución de la vegetación y en las relaciones que establece la marisma con el resto del estuario, que finalmente determinan las propiedades del sedimento.

Estas fuentes de variación nos han llevado a discriminar en la marisma de Palmones dos áreas con propiedades fisicoquímicas ligeramente distintas: **la zona baja-intermedia** (a la que hacemos referencia en este trabajo como la zona baja de la marisma cubierta de vegetación), de inundación esporádica donde dominan los macrófitos del género *Sarcocornia* (*S. perennis alpini* y *S. fruticosa*), y que presenta un sedimento más limoso, más ácido, oxigenado y oxidado que **la zona más elevada** (zona alta de la marisma cubierta de tapete), ocasionalmente influenciada por la marea, con alternancia de claros y vegetación arbustiva de la especie *Arthrocnemum macrotaschyum* donde se desarrollan los tapetes microbianos (Carrasco, 2006).

Las diferencias entre estas dos zonas también se establecen en cuanto al contenido orgánico y de carbono del sedimento, así como de la relación C:N, siendo mayores en la zona con cobertura vegetal. Lo confirman los datos de Palomo (2004) y Carrasco (2006) correspondientes a la zona baja-intermedia de la marisma con vegetación y zona alta con tapete, respectivamente (Tabla 5.2). Básicamente, estas diferencias radican en que la zona cubierta con tapetes al estar más elevada y tener escasa o nula vegetación, están sometidas a menor influencia de la marea y de las plantas, cuyos efectos ya han sido discutidos ampliamente en este apartado.

| | Intermareal | Marisma (vegetación) | Marisma (tapete) | | |
|--|--------------|----------------------|------------------|-----------------|--------------|
| | Este trabajo | Palomo (2004) | Este trabajo | Carrasco (2006) | Este trabajo |
| C (mg g⁻¹rs) | 15-30 | 39-76 | 50-60 | 25-70 | 40 |
| MO (%) | < 10 | 17-25 | 15-20 | 15 | 10-15 |
| C:N | 10-12.5 | 13-15 | 15-16 | 11-13 | 10-12.5 |

Tabla 5.2.- Datos de C, MO y relación C:N del estuario de Palmones en el sedimento intermareal y de la marisma según otros autores y los obtenidos en este trabajo.

2. Producción y Emisión *in situ* de Gases con Efecto Invernadero: CH₄, N₂O y N₂

El estuario del río Palmones desempeña un papel doble en la dinámica de los gases que sólo manifiesta en los meses más cálidos del año. Por un lado, podríamos considerarlo **acumulador de metano**, no en el sentido de captación de metano de la atmósfera al sedimento, si no desde el punto de vista de que el metano producido en el sedimento no se emite a la atmósfera, y por otro, como **fuentes de nitrógeno molecular**. Esto significa que el estuario es un sistema que acumula parte del C que recibe, mientras que pierde N en forma gaseosa, como apuntaban trabajos previos realizados en el estuario (Clavero 1992; Palomo, 2004; Niell et al., 2005). La pérdida de N a la atmósfera tiene lugar como nitrógeno molecular, y no de óxido nítrico, lo que indica que el estuario de Palmones no contribuye al cambio climático con emisiones de gases de N con efecto invernadero. Tampoco lo hace a través del metano, pues como discutiremos más adelante, la más probable oxidación de éste en el sedimento impide su liberación a la atmósfera. Nada certero podemos decir sobre la dinámica del sulfhídrico, ya que por limitaciones metodológicas sólo se estudió la tasa de sulfatorreducción, aunque hay indicios que apuntan a una posible acumulación de S en el sedimento.

Resulta complicado encontrar trabajos sobre la dinámica del metano en sistemas costeros como los estuarios, ya que durante muchos años se ha considerado que los sistemas marinos desempeñan un papel relativamente modesto en la emisión global de metano a la atmósfera, y los pocos que se encuentran se centran en la emisión de metano, por su incidencia en el cambio climático. Las investigaciones más recientes (e.g. Bane et al., 1994, 1998; Hovland et al., 1993) han tenido en cuenta que los estuarios son altamente productivos por los grandes aportes terrestres que reciben, y más aún en la actualidad por la fuerte presión antropogénica a la que están sometidos. La gran cantidad de materia orgánica que acumulan ha de ser mineralizada en el sedimento y la metanogénesis es uno de los procesos terminales de la mineralización de la materia orgánica. Desde este nuevo punto de vista, se plantea la necesidad de evaluar el papel que los sedimentos marinos ejercen actualmente en el incremento atmosférico de metano (Crill y Martens, 1983; Mountfort et al., 1980). Abarcar la dinámica del metano en un sistema estuario, como es el del río Palmones, es uno de los puntos de originalidad de esta tesis.

La escasez de trabajos a los que antes hacíamos referencia y el método desarrollado para determinar la producción de gases (incubaciones en slurry), ha dificultado, en general, la interpretación de los datos obtenidos en el estuario de Palmones, y su comparación con otros estuarios. La producción de gases se puede determinar bien incubando una mezcla homogénea de sedimento y agua (incubaciones en slurry), o bien incubando cores de sedimento en el interior de tanques que permiten mantener la estructura del sedimento intacta durante la experimentación. En el primer caso, los resultados se expresan en cantidad del gas por capacidad o masa de sedimento y tiempo ($\text{mol del gas ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ o $\text{mol del gas g}^{-1} \text{ h}^{-1}$); en el segundo, la cantidad del gas se expresa por superficie de intercambio del sedimento con la atmósfera ($\text{mol del gas m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). En nuestro trabajo, por la infraestructura disponible, hemos optamos por el primer método; sin embargo, la mayoría de los trabajos consultados emplean el segundo. Para hacer posible la comparación, hemos recalculado nuestros datos considerando la equivalencia entre la superficie de intercambio del core con el que se toma la muestra de sedimento y la

mezcla homogénea de sedimento-agua incubada, aunque somos conscientes de que esto no es más que una aproximación.

En la tabla 5.3 se presentan los únicos datos de producción de metano expresados por ml de sedimento disponibles en la bibliografía consultada, y los obtenidos en este trabajo. Corresponden a un lago eutrófico de Alemania y a unas turberas de Escocia e Inglaterra, ya que no se han encontrado datos de producción de metano en otros sistemas estuarios expresados en estas unidades. Los datos del estuario (0.29-0.79 nmol ml⁻¹ h⁻¹) están muy alejados de los que presentan Furtado y Casper (2000) en el lago Dagow (Brandenburg, Alemania) y Watson y Nedwell (1998) en las zonas más deprimidas de la turbera de Great Dun Fell (Cumbria, Inglaterra), y sin embargo, parecen mantenerse dentro del rango de las zonas húmedas. Cabe señalar a este respecto, las diferencias de temperatura entre estos sistemas y el estuario. Los datos del estuario de Palmones se corresponden con sedimentos con una temperatura que varía entre 30 y 40° C, mientras que en la turbera de Great Dun Fell la temperatura no supera los 15° C. Varios autores, como Wagner and Pfeiffer (1997), y Van der Nat et al. (1998), consideran que la temperatura es un factor ecológico importante que influye positivamente en la producción de metano en sedimentos, como veremos más adelante. Resulta, pues evidente, que el estuario de Palmones es un sistema que produce poco metano en comparación con sistemas de aguas salinas.

Los resultados de producción y emisión por superficie de intercambio se comparan con otros sistemas acuáticos de distintos lugares del mundo en la tabla 5.4. El rango de variación es muy elevado, por tratarse de ecosistemas distintos con diferentes propiedades fisicoquímicas, generalmente de sedimentos más fríos y menos salinos que los del estuario del río Palmones. De cualquier forma, se observa la baja producción de metano del sedimento del estuario de Palmones, principalmente en la zona más baja de la marisma dominada por macrófitos, y la ausencia de emisión en todo el estuario.

| Localización | Sistema | Observaciones | Producción (nmol ml ⁻¹ h ⁻¹) |
|--|-------------------------|---|--|
| Watson y Nedwell (1998) Ellergrower Moss (New Galloway, Escocia) Great Dun Fell (Cumbria, Inglaterra) | Turbera | Zona de depresión Temperatura <i>in situ</i> : 14.9° C | 1-6.8 |
| | | Zona húmeda | 0.25-0.43 |
| Furtado y Casper (2000) Lago Dagow (Brandenburg, Alemania) | Lago eutrófico | Temperatura <i>in situ</i> : 12° C | 1.25 |
| | | Temperatura: 22° C | 6 |
| Este trabajo (2008) Estuario río Palmones (Bahía de Algeciras, España) | Intermareal | Temperatura <i>in situ</i> : 30° C | 0.58 |
| | Marisma (vegetación) | Temperatura <i>in situ</i> : 35° C | 0.29 |
| | Marisma (tapete) | Temperatura <i>in situ</i> : 40° C | 0.79 |

Tabla 5.3.- Datos de producción de CH₄ por ml de sedimento del estuario del río Palmones, de un lago eutrófico y una turbera.

Son varios los estudios que han encontrado que la producción de metano suele ser baja en sistemas marinos como los estuarios, por la alta salinidad y elevada concentración de sulfato (e.g. Oremland, 1988).

La salinidad del sedimento de los estuarios está sujeta a una gran variabilidad espacial y temporal por la influencia de los periodos de inundación de la marea y el clima, y todo ello condicionado por la elevación del terreno (Beefink, 1977). En el sedimento del intermareal del estuario de Palmones, al estar directamente en

| Lugar | Sistema | Observaciones | Producción (mmol m ⁻² d ⁻¹) | Emisión (mmol m ⁻² d ⁻¹) |
|--|-------------------------|------------------------------|---|--|
| Barlett et al. (1987) York River (EEUU-Virginia) | Marisma | Salinidad 2.6 | -- | 3 |
| | | Salinidad 5.5 | -- | 3.8 |
| | | Salinidad 8.8 | -- | 0.9 |
| Middelburg et al. (1996) Choptank river estuary Scheldt (Bélgica) | Intermareal | Salinidad 0 | -- | 500 |
| | | Salinidad 1-10 | -- | 2.4 |
| | | Salinidad 25 | -- | 0.1 |
| Magenheimer et al. (1996) Dipper Harbour (Canadá-New Brunswick) | Marisma | Salinidad 20.6- 23.5 | -- | 0.13 |
| | | Salinidad 31-35 | -- | 0.03 |
| Watson y Nedwell (1998) Ellergrower Moss (New Galloway, Escocia) Great Dun Fell (Cumbria, Inglaterra) | Turbera | Depresión 14.9° C | 66.4 | 2.3 |
| | | Elevación 14.8° C | 5.73 | 0.34 |
| | | Húmeda | 0.14 | -8.48 |
| | | Seca | 0.002 | -12.06 |
| Abril y Iversen (2002) Randers Fjord estuary (Dinamarca) | Estuario no mareal | Salinidad 3-7 (18.2° C) | -- | 0.015 |
| | | Salinidad 17-23 (17.8° C) | -- | 0.40 |
| Este trabajo (2008) Estuario río Palmones (Bahía de Algeciras, España) | Intermareal | 30° C | 0.58 | nd |
| | Marisma (vegetación) | 35° C | 0.29 | nd |
| | Marisma (tapete) | 40° C | 0.79 | nd |

Tabla 5.4.- Datos de producción y emisión de CH₄ en distintos ecosistemas acuáticos del mundo expresados por superficie de intercambio.
(nd, no detectado. -, sin dato, signo – indica flujo desde la atmósfera al sedimento).

contacto con el caño principal y sufrir inundaciones periódicas, el contenido en sales es más o menos constante y en raras ocasiones supera la del agua de inundación, lo que le confiere al sedimento una salinidad de 33-35. En la marisma, se observa una mayor heterogeneidad. Palomo (2004) ha registrado valores que oscilan anualmente en un amplio rango, entre 30 y 90, relacionado con la incorporación de sales por las plantas, la frecuencia de la inundación de la marea y el clima. Durante los períodos de inundación, la lluvia disminuye la salinidad del sedimento, mientras que en los periodos en los que el sedimento no está inundado, la tasa de evaporación aumenta la salinidad, superando al contenido en sales del agua, y llegando incluso a observarse precipitados de sales sobre el sedimento.

La concentración de metano en los estuarios se distribuye, entre otros factores, atendiendo a la salinidad. La mezcla del agua de mar entrante con la marea y la de agua dulce que aportan los ríos, determinan un gradiente de salinidad que aumenta hacia la desembocadura. Se observa pues, que la concentración de metano disminuye a medida que la salinidad aumenta (e.g. De Angelis y Lilley, 1987). En el estuario del río Palmones no se da esta distribución. Al tratarse de un estuario pequeño, poco profundo y bien mezclado, la salinidad es prácticamente constante a lo largo de sus 5.5 Km de longitud, estando sometida tan sólo a variaciones temporales asociadas a la entrada y salida del agua durante la marea. Por esta razón, se evaluó la formación y desprendimiento del metano con relación a la salinidad en otro escenario, como es el estuario del río Tajo (Lisboa, Portugal). En este estuario, la actividad de las bacterias metanogénicas disminuye drásticamente con el aumento de sales del sedimento. Ya en zonas de baja salinidad (10) la producción de metano disminuye un 75%, aproximadamente, respecto a la producción que tiene lugar en sedimento del río (salinidad 0), llegando a disminuir entre el 80 y el 90% en las zonas de mayor salinidad (30 y 35).

El experimento realizado con sedimento del río de Palmones (0 de salinidad) para comprobar el efecto de la salinidad en la producción de metano nos indica que las bacterias metanogénicas que habitan en el sedimento del río se muestran intolerantes a la salinidad, disminuyendo la producción de metano casi un 95% si el

sedimento contiene sales, aún en baja concentración (salinidad de 10). En el estuario del río Tajo, la disminución de la actividad metanogénica por la salinidad *in situ* es ligeramente inferior a la observada experimentalmente en Palmones, entre un 10 y un 30% menor; ya que al estar sometidas a cambios diarios, estacionales y anuales propios de la dinámica del estuario están supuestamente mejor adaptadas a la salinidad.

Por otro lado, el experimento de incubación de sedimento fluvial de Palmones a concentraciones crecientes de sulfato sódico, corrobora que el contenido en sulfato disminuye la actividad de las bacterias metanogénicas del sedimento. En nuestro caso, la disminución de la producción ante el sulfato responde a una curva de tipo michaeliano. Watson y Nedwell (1998) también observaron este tipo de relación en la turbera de Great Dun Fell (Cumbria, Inglaterra), pero a concentraciones de sulfato mucho menores, del orden de μM . Con adicciones de sulfato en el rango de concentración del estuario (15-35 mM, en el intermareal, y 20-90 mM en la marisma) la actividad de las bacterias metanogénicas del sedimento del río disminuye entre el 60 y el 80%. El mismo porcentaje han obtenido estos autores cuando incuban a concentraciones de sulfato *in situ* (500-1000 μM).

Comparando la disminución de la producción de metano del sedimento fluvial a la salinidad y concentración *in situ* de sulfato del estuario, el 95% y entre el 60-80% respectivamente, parece ser que la salinidad es más importante que el sulfato a la hora de regular la metanogénesis.

La relación que se establece entre la salinidad-sulfato y la producción de metano no responde a un proceso de inhibición bacteriana, sino a uno de tipo competitivo. Las bacterias metanogénicas y BSR compiten por el mismo sustrato, el hidrógeno y el acetato (Winfrey y Zeikus, 1977; Schönheit et al., 1982; Zinder, 1993). En sedimentos salinos y ricos en sulfato, las BSR son competidores más eficientes que las metanogénicas (Abram y Nedwell 1978a,b; Bryant et al., 1977; Mountfort and Asher, 1979). Por esta razón, es frecuente observar que la emisión de metano en sistemas marinos puede ser dos órdenes de magnitud inferior a los epicontinentales

(Abril y Borges, 2004), y su producción está limitada a las capas más profundas del sedimento, donde la concentración de sulfato es baja.

A pesar de la mayor eficiencia de las BSR, hay trabajos como el de Holmer y Kristensen (1994), que demuestran que la formación de metano puede tener lugar en sedimentos con concentraciones elevadas de sulfato (5-60 mM), similares a las que se encuentran en el estuario de Palmones. Esto sería posible, según dichos autores, gracias a que algunas bacterias metanogénicas son capaces de utilizar sustratos por el que no compiten con las BSR.

Se han descrito 5 grupos de bacterias metanogénicas atendiendo a su requerimiento trófico (Tabla 5.5). En suelos y sedimentos fluviales (lagos, cultivos de arroz y depuradoras), las bacterias acetotróficas son responsables de las 2/3 partes del metano producido (Smith y Mah, 1966; Koyama, 1963; Cappenberg, 1974; Cappenberg y Prins, 1974). En sedimentos marinos ricos en sulfato, dominan las bacterias metilotróficas que utilizan compuestos metilados como el metanol, las metilaminas y el dimetil sulfato (Le Mer y Roger, 2001). Estos compuestos se

| Grupo trófico | Sustrato | Ambiente |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Hidrogenotrofos | H ₂ + CO ₂ | Cultivos de arroz |
| Formatotrofos* | Formato | Cultivos de arroz |
| Acetotrofos | Acetato | Suelos y sedimentos aeróbicos |
| Metilotrofos | Compuestos metilados | Sedimentos marinos |
| Alcoholotrofos | Alcoholes 1º y 2º | |

*Todos los formatotrofos son hidrogenotrofos

Tabla 5.5.- Grupos de bacterias metanogénicas en función de sus características tróficas (Tomado de Le Mer y Roger, 2001).

encuentra en algas, animales bénticos, organismos halófitos y bacterias, y se liberan al sedimento durante su descomposición (Postgate, 1979; Oremland y Polcin, 1982; Wang y Lee, 1994). Nuestros resultados están en consonancia con las apreciaciones hechas por estos autores, e indican que en el sedimento del estuario de Palmones, aunque las bacterias acetotróficas también estén presentes, el principal precursor de la producción de metano es el metanol. De este modo, la formación de metano en el sedimento del estuario ocurre principalmente gracias a las bacterias metilotróficas, mientras que la contribución de las bacterias acetotróficas a la producción de metano en el sedimento es muy inferior. En cambio, en el río ésta se debe a las bacterias acetotróficas, siendo el acetato el principal precursor.

Las bacterias sulfatorreductoras compiten con las metanogénicas por el acetato, pero no por los compuestos metilados en sedimentos marinos, según señalan diversos autores como Oremland y Pociñ (1982) y van der Maarel y Hansen (1997). Lo confirman también, los resultados que hemos obtenidos en nuestros experimentos. Sin embargo, la baja producción de metano en el estuario en relación con los sistemas con los que se ha comparado anteriormente, no se debe a este tipo de relación. El metanol es el principal sustrato de la metanogénesis en el estuario, y los resultados han demostrado de acuerdo con la bibliografía, que no es sustrato competitivo para bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras. Aunque la existencia de bacterias acetotróficas en el sedimento del estuario evidencian competencia por el sustrato, su repercusión en la cantidad de metano producido finalmente en el sedimento debe ser irrelevante. Entonces, ¿a qué se atribuye la baja producción de metano en el estuario?

En realidad, la producción de metano en el estuario de Palmones está limitada por la disponibilidad en el sedimento del precursor de la metanogénesis: el metanol. En las incubaciones realizadas a concentración saturante de sustrato, la producción de metano aumentó significativamente. Este efecto se observó para los dos sustratos, acetato y metanol, en las tres zonas del estuario estudiadas; aunque cabe señalar, que el metanol aumentó la producción de metano hasta 15 veces más que el acetato en el sedimento del intermareal, y 7 veces más en la marisma, al menos

en la zona con tapete. Si bien, ambos sustratos son limitantes, la disponibilidad del metanol en el sedimento es el que determina la producción de metano en el estuario. Si en el sedimento hubiera un excedente de metanol, el sedimento del intermareal podría producir 20 veces más metano de lo que ocurre actualmente, y la marisma aproximadamente, 10 veces más. No hemos encontrado trabajos que puedan respaldar estos resultados. Tan sólo algunos trabajos señalan que en sedimentos marinos con elevado contenido en sulfato la formación de metano tiene lugar si sus sedimentos son ricos en carbono orgánico (e.g. Holmer y Kristensen, 1994).

Además de la disponibilidad de metanol en el sedimento, hay otro factor que condiciona la producción de metano en el estuario: la temperatura del sedimento. Las bacterias metanogénicas del estuario han mostrado una fuerte dependencia por la temperatura del sedimento, como en otros estudios realizados por Wagner y Pfeiffer (1997) o Van der Nat et al. (1998). En los experimentos realizados con sedimento tomado en otoño la dependencia es absoluta; no hay indicios de actividad (ni real ni potencial) por debajo de 35° C aún estando el metanol a concentración saturante, lo que sugiere, a priori, que la temperatura es el factor clave que controla la dinámica del metano en el estuario. En cambio, se detectó producción de metano en el experimento llevado a cabo en verano *in situ* a pesar de que el sustrato es limitante y que la temperatura del sedimento es inferior a 35° C.

En cualquier caso, estos resultados entran dentro del rango de temperatura óptimo considerado para las bacterias metanogénicas por Le Mer y Roger (2001), entre 30 y 40° C; aunque la metanogénesis pueda tener lugar en un rango de temperatura muy amplio, para algunos autores entre 9 y 110° C (Stetter, 1992; Huber et al., 1994) y para otros entre 4 y 60° C (Fenchel y Blackburn, 1979).

¿Cómo es posible que se detecte producción de metano *in situ* a 30° C aún cuando el sustrato no es limitante si se ha demostrado experimentalmente que se precisa una temperatura de 35° C y un aporte de sustrato? La respuesta radica en que los experimentos *in situ* y en el laboratorio se han realizado tomando sedimento en distintas épocas del año y la composición de especies de las comunidades bacterias

varían estacionalmente (Harder y Veldkamp, 1971; Nedwell y Floodgate, 1971; Inniss y Mayfield, 1978, 1979; Tison et al., 1980) en función a la capacidad de las especies por capturar y metabolizar los sustratos a diferentes temperaturas ambientales (Nedwell y Rutter, 1994), presentando distintos coeficientes Q_{10} , como demuestran Van Bodegon y Stams (1999) en otros sedimentos. En la mayoría de los ambientes naturales el sustrato es limitante (e.g. Nedwell y Gray, 1987), por lo que la afinidad por el sustrato y su eficiencia metabólica son las que determinan que una especie tenga mayor ventaja competitiva que otra.

La ausencia de emisión de metano a la atmósfera en el estuario de Palmones, como ya habíamos adelantado, significa que no contribuye al cambio climático, en contra de las consideraciones generales de que los estuarios constituyen una importante fuente de emisión de metano dentro de los ecosistemas marinos. Middelburg et al. (2002) estiman que los estuarios emiten metano a la atmósfera en el rango de $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$. En sedimentos del intermareal del estuario del río Choptank (Bélgica) y en la marisma de Dipper Harbour (Canadá), Middelburg et al. (1996) encontraron emisión de metano a la atmósfera en el rango estimado por los otros autores, aunque observaron una fuerte variación atendiendo a la salinidad del lugar. La emisión de metano disminuyó dos órdenes de magnitud en sedimentos salinos respecto a aquellos que no presentaban contenido en sales (Tabla 5.5).

Existen algunos trabajos que muestran dependencia entre la emisión de metano y la salinidad en zonas costeras como los estuarios (De Laune et al., 1983; Barber et al., 1988; Barlett et al., 1987; Scranton et al., 1993; Crozier y De Laune, 1996), observando que la emisión de metano disminuye con el aumento de la concentración de sales en respuesta a la inhibición competitiva de las bacterias metanogénicas por las BSR en ambientes ricos en sulfato (Ward y Winfrey, 1985; Oremland y Polcin, 1982; Senior et al., 1982). Por tanto, aunque no disponemos de datos de producción de metano en los estuarios de Bélgica y Canadá, al ser menos salinos que el estuario de Palmones, podemos pensar que son más productivos. Si zonas más productivas que Palmones muestran tasas de emisión tan bajas, con el poco metano que se forma en el sedimento del estuario resulta evidente que no haya

emisión de metano a la atmósfera. Por otro lado, la turbera de Greal Dun Fell (Inglaterra), con una tasa de producción de metano similar a las observadas en el estuario de Palmones, tampoco emite metano a la atmósfera, si no que presenta un flujo de metano de la atmósfera al sedimento de $8.48 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

¿Por qué razón el metano que se produce en el sedimento del estuario del río Palmones no se emite a la atmósfera? Hay autores que han observado que el 60% del metano producido en el sedimento a nivel global no llega a la atmósfera al sufrir procesos de oxidación aeróbica en su superficie o anaeróbica en las capas más profundas (e.g. Nedwell, 1996).

A menudo se asocia la oxidación aeróbica a suelos no salinos y aeróbicos con concentraciones muy altas de oxígeno en el primer milímetro y medio del sedimento ($200\text{-}1600 \mu\text{M}$) (Conrad et al., 1995) como ocurre en lagos (Frenzel et al., 1990), humedales (King, 1990), humedales inundables (Kelly et al., 1995) y plantaciones de arroz (Joabsson et al., 1999). De este modo, el metano formado en las capas más profundas es oxidado en la superficie de los suelos o sedimentos en su ascenso a la atmósfera. No se descarta que en los estuarios pueda haber oxidación aeróbica del metano aunque condicionada por la salinidad. Por ejemplo, De Angelis y Scranton (1993) observaron que la oxidación aeróbica del metano producida en aguas del estuario Hudson (Mar Báltico) a una salinidad de 6, disminuye en uno o dos órdenes de magnitud al aumentar la salinidad.

La salinidad del sedimento del estuario, en torno a 35, y el poco oxígeno disponible, sugieren que el metano no sufre oxidación aeróbica en el estuario del río Palmones. Lo confirma el experimento de oxidación aeróbica llevado a cabo con sedimento del intermareal y de la marisma. En el intermareal, el oxígeno se agota en el primer cm, y en superficie apenas supera los $200 \mu\text{M}$; en la marisma, aunque es cierto que hay oxígeno en los 10 primeros cm, su concentración entre 150 y $250 \mu\text{M}$ en superficie, y 50 y $150 \mu\text{M}$, no es suficiente para garantizar este proceso. No podemos concluir que las bacterias metanotróficas responsables de la oxidación

aeróbica no estén en el sedimento, tan sólo que el alto contenido en sales del sedimento y el poco oxígeno disponible son factores que limitan la oxidación aeróbica del metano. Conrad et al. (1995) tampoco encontraron evidencias de oxidación aeróbica del metano en tapices microbianos hipersalinos (salinidad > 90) a pesar de las altas concentraciones de oxígeno y de metano.

En sedimentos marinos predomina la oxidación anaeróbica (De Angelis et al., 1993), responsable de la oxidación del 90% del metano producido en el sedimento (Kotelnikova, 2002). Poco se conoce acerca de este proceso (Hoehler and Alperin, 1996), salvo que es dependiente de la sulfatorreducción (e.g. Barnes y Goldberg, 1976; Zehnder y Brock, 1980). Algunos autores mantienen que la oxidación tiene lugar en la capa inferior a la sulfatorreducción (Martens y Berner, 1977; Reeburgh 1976; Reeburgh y Heggie 1977; Barnes y Goldberg 1976). Otros, como Valentine y Reeburgh (2000), piensan que parte del metano producido difunde hacia arriba y es oxidado en la zona de sulfatorreducción. En cualquier caso, la hipótesis actual plantea que el metano es oxidado por un grupo de bacterias metanotróficas pertenecientes al dominio *Archaea* en un proceso inverso a la metanogénesis (Valentine y Reeburgh, 2000), mientras que las BSR oxidan a un intermediario, por ahora sin identificar, al mismo tiempo que reducen sulfato, obteniéndose la energía necesaria para la oxidación de metano. La ecuación neta que refleja este proceso es la siguiente: $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$. Hasta el momento no se ha aislado ningún grupo de bacterias capaces de llevar a cabo esta reacción, por lo que la oxidación sólo puede tener lugar por una cooperación entre *Archaea* y BSR (Martens and Berner, 1977; Reeburgh, 1980; Alperin and Reeburgh, 1985; Treude et al., 2003)). La oxidación conlleva la formación de sulfhídrico, lo que supone un aporte adicional para las comunidades quimiosintéticas (Martens y Berner, 1977; Reeburgh 1976; Reeburgh y Heggie, 1977; Barnes y Goldberg, 1976; Iversen y Jørgensen, 1985; Treude et al., 2003).

El sedimento del estuario de Palmones, con alto contenido en sulfato, anóxico en el intermareal y concentraciones de oxígeno no demasiado altas en la

marisma, presenta las condiciones óptimas para que en él tenga lugar la oxidación anaeróbica del metano. Aunque no tengamos certeza absoluta, pues no ha sido confirmado experimentalmente, es muy probable que la ausencia de emisión de metano a la atmósfera en el sedimento del estuario de Palmones se deba a que el poco metano que se produce es oxidado en las capas más profundas donde o bien no hay oxígeno (sedimento del intermareal) o la concentración es baja (marisma).

No hay que olvidar la importancia que a nivel global tiene la oxidación anaeróbica en los sedimentos marinos en el cambio climático, ya que se ha llegado a estimar que evita que a la atmósfera llegue entre el 5 y el 20% del metano producido (Reeburgh y Alperin, 1988). Además, numerosos estudios han demostrado la importancia de la oxidación anaeróbica en la formación de compuestos oxidados de azufre al estar acoplada con la reducción de sulfato, explicando entre el 23 y el 100% de la tasa de sulfatorreducción (Reeburgh y Alperin, 1988; Devol et al., 1984; Iversen y Jørgensen, 1985; Nierwöhner et al., 1988).

En el estuario del río Palmones, el 100% la mineralización anaeróbica de la materia orgánica a través del nitrato es completa, formándose nitrógeno molecular como producto final. Parte de este nitrógeno se pierde al ser emitido a la atmósfera, lo que pone de manifiesto la importancia de los estuarios en el reciclado del N. Nixon et al. (1996) sugiere que la mitad del nitrógeno que reciben actualmente los estuarios por la fuerte carga de nutrientes antropogénica se elimina a la atmósfera gracias a la desnitrificación en forma de nitrógeno molecular (desnitrificación completa) o de óxido nitroso (desnitrificación incompleta), por lo que también se les consideran una fuente importante de producción y emisión de gases con efecto invernadero (Bange et al., 1996; Sitzinger y Kroeze, 1998). El estuario, ya que el 100% de la emisión a la atmósfera ocurre en forma de nitrógeno molecular, no contribuiría al cambio climático con la emisión de gases de N con efecto invernadero.

La mineralización completa o incompleta de la materia orgánica depende de algunas de condiciones del sedimento (Painter, 1977, Barnes y Owens, 1998, Fenchel y Blackburn, 1979), entre ellas el pH y la disponibilidad de oxígeno (Fenchel y Blackburn, 1979; Focht, 1974). La relación de dependencia que Focht (1974) encuentra con la disponibilidad de oxígeno más bien está relacionada con la formación de óxido nitroso durante la oxidación anaeróbica del amonio que con la desnitrificación, aunque ésta sea posible en ambientes oxigenados. También observa que la relación $N_2O:N_2$ es muy baja a pH neutro, y aumenta a medida que el sedimento se acidifica, siendo el 100 % de la producción en forma de óxido nitroso a pH 5. En verano, único momento en el que se detecta formación de gases en el estuario, el pH del sedimento de la marisma de Palmones en raras ocasiones es inferior a 6, por lo que de acuerdo con Focht, sería esperable que en el estuario se formara óxido nitroso, siempre a una tasa muy inferior a la producción de nitrógeno molecular. Lo confirman los experimentos en slurry, donde la producción potencial de óxido nitroso es uno o dos ordenes de magnitud inferior a la formación de nitrógeno molecular. Esto sólo ocurre cuando la concentración de nitrato es superior a 500 μM , lo que indica que la disponibilidad de nitrato del estuario limita la formación de óxido nitroso y la desnitrificación, como detallaremos a continuación.

En otros sistemas también se ha encontrado que la mayor parte de la reducción de nitrato es completa; por ejemplo, García et al. (1998) encuentra en el río Wiske (NE de Inglaterra) que la formación de nitrógeno molecular supone entre el 75 y el 100% de la desnitrificación. Seitzinger (1988) realiza una amplia revisión de la que concluye que la producción neta de óxido nitroso generalmente es inferior a 2 $\mu mol N m^{-2} h^{-1}$, incluso observa que en algunos casos no llega ni siquiera a producirse. Estos resultados no son sorprendentes si se tiene en cuenta que la mayoría de las bacterias desnitrificantes aisladas de sedimentos pertenecen al género *Pseudomonas*, que producen nitrógeno molecular como producto final de la desnitrificación (Dunn et al., 1980; Macfarlane et al., 1982); sin embargo, Pattinson et al. (1998) apuntan que la ausencia de óxido nitroso en estuarios debe ser interpretada con cautela, pues en ocasiones su ausencia se debe a problemas de

detección asociados a la metodología o al límite de detección del cromatógrafo de gases, y no a la inactividad del sedimento. Algunas bacterias desnitrificantes producen óxido nitroso como producto final de la desnitrificación (Renner y Becker, 1970; Firestone et al., 1979; Knowles, 1982), por lo que es posible que en ocasiones la producción neta de óxido nitroso pueda representar más de la mitad del N formado durante la reducción del nitrato.

La tasa de desnitrificación del estuario ($0-22.29 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), resulta de las más bajas entre las mostradas en otros sistemas marinos y terrestres ($0-2586 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) (Tabla 5.6). El rango de variación tan alto que muestran estos sistemas es reflejo de las características de los propios sistemas (salinidad, temperatura, etc.) y del distinto grado de eutrofización al que están sometidos que repercute sobre todo en la disponibilidad de carbono orgánico y de nitrato. El poco nitrato que hay en el estuario en comparación con la de estos sistemas, casi siempre menos de $50 \mu\text{M}$, justifica que su actividad desnitrificante sea menor. Seitzinger (1988) siempre encuentra las tasas de desnitrificación más altas en aquellos lugares que reciben una fuerte carga antropogénica de nutrientes, donde la concentración de nitrato puede alcanzar valores máximos de $1000-2000 \mu\text{M}$, de acuerdo con Seitzinger et al. (1983) o Pattinson et al. (1998) que sostienen que la concentración de nitrato puede ser un factor limitante de la desnitrificación, y una mayor carga de nutrientes al agua incrementa la producción de óxido nitroso en sedimentos marinos.

Como ya habíamos adelantado, los resultados experimentales han constatado que la producción de óxido nitroso y la desnitrificación completa *in situ* se encuentra limitada por la concentración de nitrato del estuario. La formación de óxido nitroso en el laboratorio sólo tiene lugar cuando la concentración de nitrato es superior a $500 \mu\text{M}$, unas 100 veces superior a la concentración real del estuario, aunque las condiciones de pH del sedimento sean favorables; mientras que la desnitrificación completa experimenta un aumento lineal en el rango ensayado. La nitrificación, aunque puede contribuir a la producción de óxido nitroso al ser un producto intermediario en la oxidación de amonio a nitrato (Goreau et al., 1980),

| Localización | [NO ₃] (μM) | Tasa de desnitrificación (μmol N m ⁻² h ⁻¹) |
|---|----------------------------|---|
| Cooper y Cooke (1984) Cuenca agrícola (Nueva Zelanda) | | 634-2121 |
| Fuente: Seitzinger (1988) | | |
| Ríos | | 0-345 |
| Lagos | | 2-171 |
| Sistemas costeros | | 0-1067 |
| Christensen y Sørensen (1986) Arroyo (Dinamarca) | | 41-375 |
| Turve et al. (1992) Río Charante (Francia) | | 458 |
| Barnes and Owens (1998) Estuario Humber (UK) | 33-600 | 50-417 |
| García et al. (1998) Río Wiske (NE Inglaterra) | 390-2000 | 99-2586 |
| Usui et al. (2001) Estuario Tama (Japón) | | 214-1260 |
| Wang et al. (2007) Estuario Yangtze (China) | 30-400 | 27.42 |
| Este estudio (2008) Estuario del río Palmones | | |
| Intermareal | 4.55-117.64 | nd |
| Marisma | 6.05-55.70 | 2.43-19.86 |

Tabla 5.6- Concentración de nitrato en el agua y tasas de desnitrificación en diversos ecosistemas del mundo.

principalmente aporta nitrato a las capas anóxicas más profundas del sedimento que junto con el nitrato que procede de la columna de agua será reducido por bacterias desnitrificantes. De este modo, los procesos de nitrificación y desnitrificación en el estuario están acoplados, y la desnitrificación, al ser la concentración de nitrato baja, depende en gran medida del nitrato generado en la oxidación del amonio. Teniendo

en cuenta que el sedimento del intermareal es anóxico desde el primer cm, la nitrificación, proceso ligado exclusivamente a ambientes aeróbicos, no puede sustentar a la desnitrificación, cuya ausencia también se ha observado en otros sistemas marinos (e.g Seitzinger, 1988). En el caso de la marisma, la nitrificación parece estar garantizada. El oxígeno está presente en el sedimento y hay suficiente amonio para ser oxidado a nitrato, lo que permite la oxidación de la materia orgánica por desnitrificación que puede tener lugar en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. La desnitrificación está limitada a ambientes con poco oxígeno, ya que las enzimas que intervienen en el proceso son sensibles al oxígeno. En sistemas naturales como en suelos y sedimentos, la desnitrificación está garantizada, ya que la demanda de oxígeno para llevarse a cabo la oxidación de amonio a óxidos de nitrógeno (nitrificación) garantiza baja tensión de oxígeno.

La tasa de desnitrificación en los estuarios no sólo está en relación directa con la disponibilidad del nitrato, sino también de la disponibilidad y naturaleza de los compuestos reducidos de carbono y de la temperatura (e.g. Tiedje, 1988; Smith y Duff, 1988; Morris et al., 1988; Fujikawa y Hendry, 1991; Pfenning y McMahon 1996). En algunos trabajos se concluye que es necesario una aporte de carbono orgánico lábil, por ejemplo de acetato, para que la desnitrificación tenga lugar (e.g. Knowles, 1982; Pfenning y McMahon, 1996), ya que según Nedwell y Gray (1987), en la mayoría de los sistemas naturales los compuestos orgánicos de mineralización lábil se encuentran en concentraciones limitantes. Las incubaciones en slurry realizadas en este trabajo con distintas fuentes de carbono orgánico lo contrastan, aumentando la desnitrificación entre 1.5 y 2.6 veces respecto al control. No hemos encontrado trabajos realizados en estuarios que avalen nuestros resultados, pero sí en sistemas fluviales. Pfenning y McMahon (1996) encuentran en el río Platte (Colorado, EEUU) que la desnitrificación está limitada por la disponibilidad de carbono orgánico, y que la presencia de compuestos orgánicos lábiles, como el acetato, ejerce un estímulo mayor en la tasa que compuestos más difíciles de degradar, por ejemplo el ácido fúlvico. Aunque lo más frecuente es que en los sistemas naturales la desnitrificación esté limitada por la disponibilidad de C orgánico

in situ, en algunos casos, como en el río Wiske (Norte de Irlanda, Reino Unido), no se tiene constancia de tal dependencia (García et al., 1998).

Además de existir un déficit de sustrato desnitrificante en el estuario, el tipo de sustrato metabolizado varía según la zona: en el sedimento intermareal la desnitrificación está ligada a la oxidación del etanol, mientras que en la marisma también participan compuestos más complejos como el acetato y la glucosa. Estos resultados nos sugieren que la composición de bacterias desnitrificantes cambian en el estuario con relación a las características del sedimento, lo que no resulta extraño si se tiene en cuenta que las bacterias desnitrificantes pertenecen a un grupo muy heterogéneo (Knowles, 1982). De hecho, a menudo la composición de las poblaciones de desnitrificantes sufre cambios espaciales y estacionales, sobre todo como consecuencia de la competencia entre las especies por los recursos limitantes (Oglivie et al., 1997).

Por otro lado, la relación de dependencia de la desnitrificación con la temperatura es clara (e.g. Harder y Veldkamp, 1971; Nedwell y Floodgate, 1971; Inniss y Mayfield, 1978), aunque se han observado diferentes respuestas a causa de que en los sedimentos pueden coexistir diferentes poblaciones de bacterias desnitrificantes (King y Nedwell (1984). García et al. (1998) encuentran en el río Wiske (Norte de Irlanda, Reino Unido) que la desnitrificación puede aumentar lineal o exponencialmente. Cuando la respuesta es lineal, observan un aumento de 1.5-3.5 veces entre 6 y 15 ° C, mientras que entre 15 y 24° C tan sólo se duplica. En cambio, Hill (1983) obtiene que las tasas de desnitrificación en el arroyo Duffin (Ontario) se cuadruplican entre 0 y 20° C. El aumento exponencial también ha sido observado en el lago Okeechobee (Sureste de EEUU) entre 14 y 35.3° C por Messer y Brezonik (1983), y en la bahía de Narragansett entre 5 y 18° C por Seitzinger et al. (1983) (5-18° C). En nuestro caso, la tasa no se ajusta estadísticamente a ninguno de estos modelos, sin embargo se aprecia que se duplica cada vez que la temperatura aumenta en 10° C entre los 15 y 35° C, de acuerdo con el valor de Q_{10} estimado por Stanford et al. (1975), quienes además predicen una la tasa disminuye por encima de 45° C.

En cualquier caso, la dependencia de la desnitrificación y la temperatura se atribuye al aumento de la actividad enzimática, así como a la disponibilidad de oxígeno, sustratos de carbono en el sedimento y al nitrato (Holtan-Hartwig et al., 2002), éste último asociado al aumento de la nitrificación en respuesta al aumento de amonio liberado en los procesos de descomposición de la materia orgánica (Livingstone et al., 2000). Por tanto, es frecuente encontrar que la tasa de desnitrificación en los estuarios varíe según los patrones estacionales de temperatura (Hanson et al., 1994), dándose las tasas más elevadas generalmente en verano coincidiendo con los meses más cálidos (e.g Barnes y Owens, 1998) como se analizará en detalle en el siguiente apartado.

3. Producción y Emisión Espacial y Temporal de los Gases en el Estuario

La dinámica de los gases en el estuario del río Palmones responde a una distribución espacial y temporal, que según algunos autores como Crill y Martens (1983) es consecuencia de los procesos tan complejos que acontecen dentro de los estuarios y a las interacciones que se establecen con los sistemas colindantes: el río y el mar. Se han observado en el estuario de Palmones dos zonas en función a la producción de gases: el intermareal, que se revela como acumulador de metano y probablemente también de sulfhídrico; y la marisma, que además de acumular metano, supone una fuente de emisión de nitrógeno molecular a la atmósfera. En la propia marisma, se establecen diferencias atendiendo a la topografía, cuyas propiedades fisicoquímicas difieren lo suficiente como para influir, si no cualitativamente, si al menos cuantitativamente en la producción de metano, y en la producción y emisión de nitrógeno. En cualquier caso, la formación de gases está asociada a una estación concreta, la estival.

En el sedimento intermareal del estuario se ha demostrado que la sulfatorreducción y la metanogénesis son posibles al mismo tiempo, sin embargo, el proceso de metanificación representa el último eslabón en la mineralización anaeróbica de la materia orgánica, y sólo es responsable de una pequeña parte de la

anaeróbica de la materia orgánica, y sólo es responsable de una pequeña parte de la mineralización de los compuestos orgánicos del sedimento del estuario. La principal vía de descomposición de la materia orgánica en el sedimento es la sulfatorreducción, como lo indican la ausencia de desnitrificación, y la elevada tasa de sulfatorreducción respecto a la metanificación (165 veces superior); resultados acorde con los obtenidos en otros trabajos como el de Nedwell et al., (2004) en el estuario del río Colne, Essex (Inglaterra) o Crill y Martens (1983) en Cape Lookout Bight, Carolina Norte (EEUU) (Tabla 5.6). Las tasas de sulfatorreducción ($38.35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y metanogénesis ($0.23 \text{ mmol CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) del estuario no siempre se encuentran en el mismo orden de magnitud que las obtenidas por estos autores, señal de que el estuario del río Palmones es menos productivo o al menos presenta distinta producción de gases.

| Lugar | Sistema | Metanogénesis ($\text{mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) | | Sulfatorreducción ($\text{mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) | |
|--|---------------------|--|------------------|--|------------------|
| | | invierno | verano | invierno | verano |
| Crill y Martens (1983) Cape Lookout Bight, Carolina Norte (EEUU) | Sedimento marino | 0.96 (11° C) | 18.96 (26° C) | 24 (11° C) | 105.6 (26° C) |
| Nedwell et al., (2004) Estuario del río Colen, Essex (Inglaterra) | Intermareal | ≈ 0.03 | 1.67 | 16.67 | 66.67 |
| | Marisma | < 0.1 | 1.17 | 16.67- 66.67 | 66.67 |
| Este trabajo Estuario del río Palmones, Algeciras (España) | Intermareal | nd | 0.23 (35° C) | nd | 38.55 (35° C) |

Tabla 5.6.- Variación estacional de las tasas de producción de CH_4 y sulfatorreducción en distintos sistemas marinos. (nd, no detectado; () se indica la temperatura).

El sulfato es el principal aceptor de electrones de la mineralización de la materia orgánica en sedimentos marinos (e.g. Murray et al., 1978; Reeburgh, 1980), a pesar de que el uso de nitrato como aceptor de electrones es más favorable termodinámicamente. La causa radica en la elevada concentración de sulfato del agua de mar en comparación con la de nitrato (Ward y Winfrey, 1985), así algunos autores consideran que entre el 50 y el 99% de la mineralización en sedimentos marinos ocurre vía sulfatorreducción (e.g. Lovely y Klug, 1983; Takii y Fukui, 1991), mientras que la desnitrificación contribuye muy poco a la mineralización de la materia orgánica, salvo que sean sistemas que reciban un gran aporte de nutrientes antropogénico, como los lagos y los ríos (Murray et al., 1978; Reeburgh, 1980). En las capas más profundas de los sedimentos marinos, el sulfato comienza a agotarse, y es posible la reducción de compuestos de carbono que implican la formación de metano (metanogénesis) (e.g. Martens y Klump, 1984).

En la figura 5.2 (redibujada de Alperin et al., 1992) se representan los tantos por ciento de los procesos de mineralización de la materia orgánica obtenidos en el sedimento de la Bahía Skan en Alaska. Entre el 82 y el 100% del C orgánico particulado es mineralizado, el resto queda enterrado en el sedimento. La sulfatorreducción supone el 79% de la mineralización total, mientras que la metanogénesis y la desnitrificación constituyen cada una el 3% aproximadamente. El 15% de la materia orgánica se respira en presencia de oxígeno.

El éxito de la sulfatorreducción frente a la desnitrificación en el sedimento intermareal del estuario no se debe sólo al contenido de sulfato y nitrato. Varios autores, de acuerdo con los resultados que también hemos obtenido en este trabajo, han encontrado que tanto la concentración de nitrato, como la disponibilidad y naturaleza de los compuestos orgánicos, ejercen un control directo sobre la desnitrificación (e.g. Tiedje, 1988; Smith y Duff, 1988; Morris et al., 1988; Fujikawa y Hendry, 1991); además, Knowles (1982) precisa que es necesario un aporte de carbono orgánico lábil para que la desnitrificación tenga lugar. En el estuario, como en la mayoría de los sistemas naturales según Nedwell y Gray (1987), los compuestos orgánicos de mineralización lábil se encuentran en concentraciones limitantes; por

tanto, que la mineralización de la materia orgánica ocurra a través de una u otra vía dependerá de la capacidad competitiva de las especies bacterianas por el sustrato limitante. En el sedimento intermareal, donde la concentración de sulfato es elevada y el nitrato es escaso, las BSR compiten más eficientemente que las acetilotrófas por el acetato, y que las desnitrificantes por el etanol, la única fuente de carbono orgánico metabolizable por estas bacterias en el intermareal, según indicaron los resultados obtenidos en este trabajo.

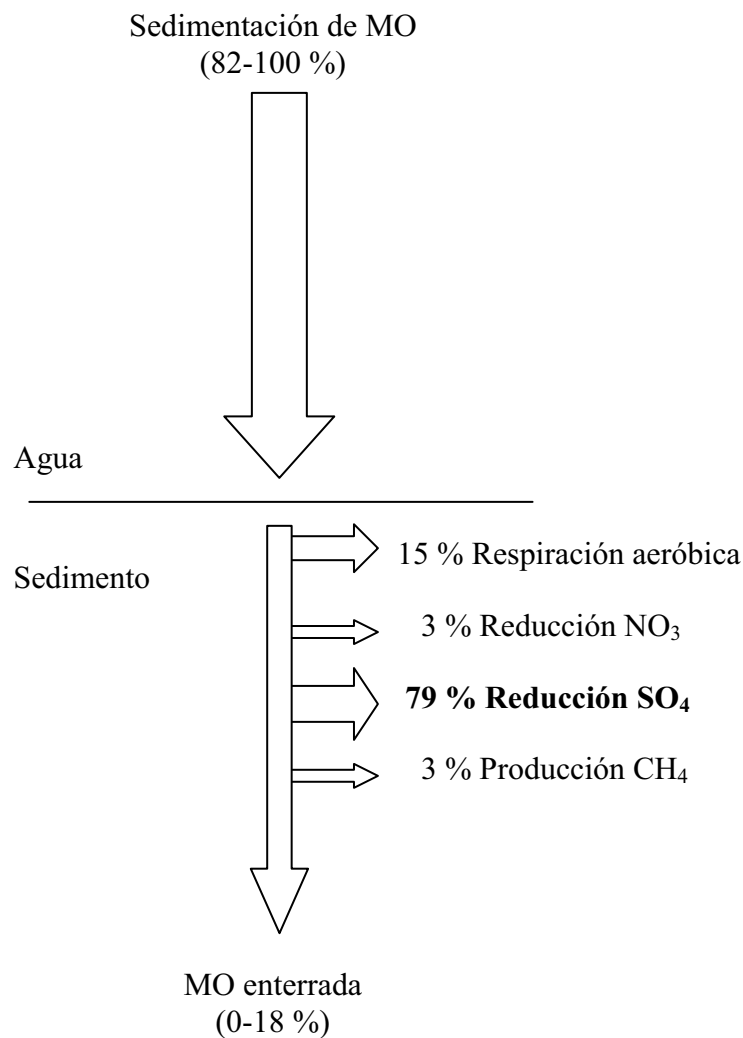


Figura 5.2.- Procesos de mineralización de la materia orgánica en el sedimento de la Bahía Skan en Alaska expresados en tanto por ciento (redibujada de Alperin et al., 1992)

Por otro lado, las BSR además de ser competidoras más eficientes, pueden utilizar otros compuestos no competitivos de carbono orgánico como han observado varios autores: las bacterias de género *Desulfobacter* se encuentran en casi todos los sistemas marinos y pueden explicar el 60% de la sulfatorreducción a través del acetato, como ocurre en el estuario del río Colne en Essex, Inglaterra (Nedwell et al., 2004). Otros géneros, como *Desulfobulbus* y *Desulfovibrio* están presentes en sedimentos fluviales y marinos, y metabolizan lactato (Devereux et al., 1996; Trimmer et al., 1997; Li et al, 1999; Minz et al., 1999). La sulfatorreducción se convierte en el principal proceso de mineralización anaeróbica de la materia orgánica del sedimento intermareal, la desnitrificación se encuentra “inhibida” por competencia con las bacterias sulfatorreductoras en condiciones limitantes de sustrato, y la producción de metano está limitada por el sustrato, dependiendo exclusivamente de la incorporación y metabolización del metanol por parte de las bacterias metilotróficas. En la figura 5.3 se representa a modo de esquema los procesos de mineralización implicados en la dinámica de gases en el sedimento del intermareal.

El metano producido en esta zona, probablemente sufre oxidación anaeróbica en el sedimento, como ya se ha argumentado en otro apartado, evitándose la pérdida gaseosa a la atmósfera, y actuando el sedimento del intermareal como acumulador de metano. No hemos podido evaluar, por limitaciones metodológicas, si el estuario emite sulfhídrico, aunque por las altas tasas de sulfatorreducción obtenidas, es muy probable que sí. Hay indicios que nos llevan a considerar que el sedimento del intermareal puede tener un doble papel en la dinámica del S. El alto contenido de S total del sedimento, a la vez que el bajo de sulfato, nos hace pensar que el sedimento del intermareal también podría acumular S mediante la formación de compuestos de inorgánicos e insolubles, como los de pirita (FeS_2), al reaccionar una buena parte del sulfhídrico con metales de hierro o magnesio. Esta hipótesis se apoya en las observaciones de Howarth (1979), que defiende que la concentración de sulfato en los sedimentos marinos es tan abundante que permite la formación de pirita, al mismo tiempo que se encuentran formas solubles de S (HS^- ó H_2S) a elevadas concentraciones.

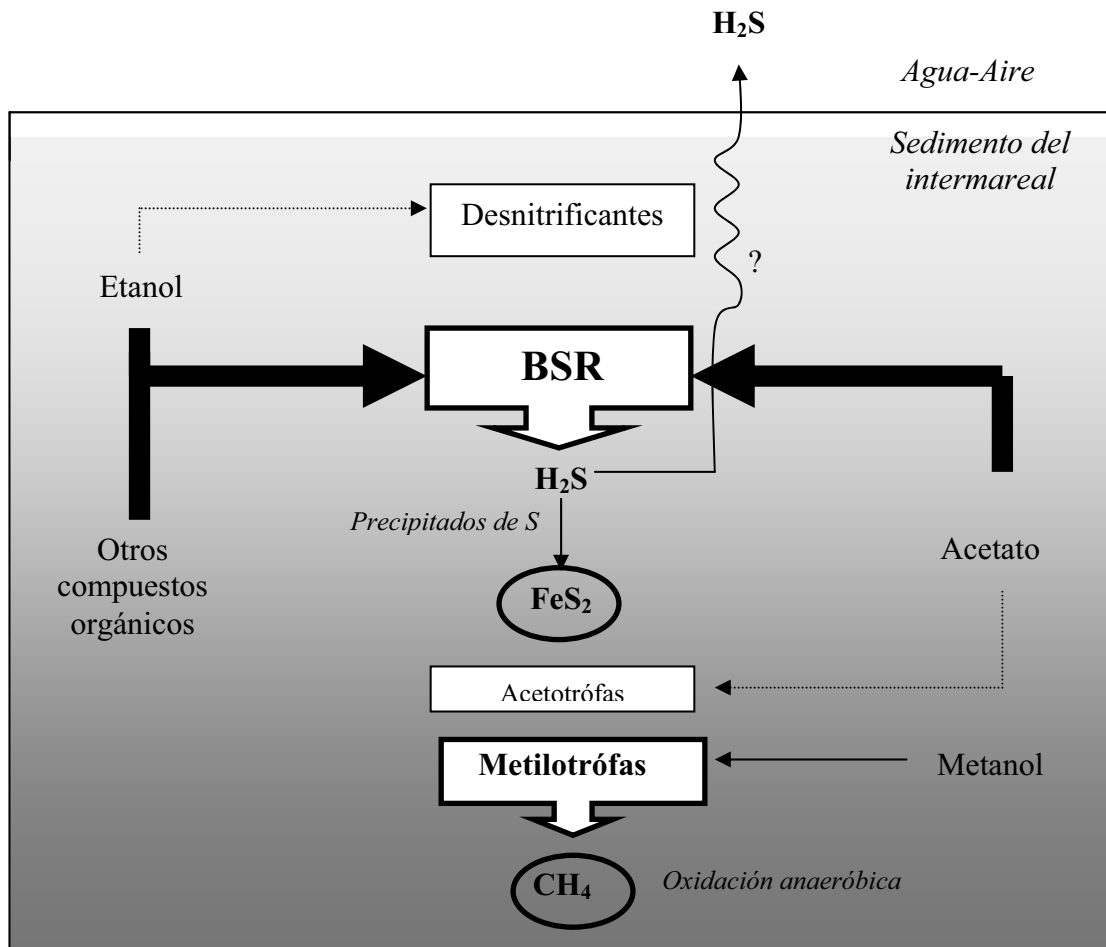


Figura 5.3.- Esquema los procesos de mineralización implicados en la dinámica de gases en el sedimento del intermareal del estuario del río Palmones. El grosor de la flecha indica la intensidad del proceso.

Los resultados obtenidos en este trabajo y nuestras observaciones, nos sugieren que en la marisma la desnitrificación es el proceso dominante en la mineralización anaeróbica de los compuestos orgánicos del sedimento. La metanificación, al igual que en el sedimento intermareal, es responsable de una pequeña parte de la mineralización de los compuestos orgánicos, mientras que la sulfatorreducción, posiblemente, no tenga ninguna relevancia. La marisma como el intermareal, es un ambiente rico en sulfato y pobre en nitrato, por lo que sería esperable que la sulfatorreducción fuera la principal vía de mineralización, más aún si

nos basamos en los argumentos de algunos autores (e.g. Nedwell et al., 2004) de que en las marismas aumentan las tasas de sulfatorreducción y de metanogénesis por ser las zonas del estuario con mayor contenido orgánico gracias a las aportaciones de las partes aéreas de las plantas (Hussey y Long, 1982; Long y Mason, 1983) y a las excreciones de sustancias orgánicas desde las raíces (Skyring et al., 1979; Nedwell et al., 1994). ¿Por qué entonces la desnitrificación supera a la sulfatorreducción? La razón puede estar en la composición de las especies de bacterias responsables de la mineralización de la materia orgánica. Las diferentes características del sedimento del intermareal y de la marisma (propiedades fisicoquímicas, naturaleza de compuestos orgánicos acumulados, etc) ampliamente discutidas en el apartado 5.1, influyen en la composición de especies de bacterias del sedimento. Los resultados han demostrado que la composición de bacterias desnitrificantes de la marisma y del intermareal no es la misma; mientras que las bacterias desnitrificantes que habitan en el intermareal sólo pueden metabolizar el etanol, las de la marisma también metabolizan otras fuentes de carbono orgánico, como el acetato y la glucosa. A pesar de que en el sedimento de la marisma los compuestos orgánicos son abundantes (próximos al 20 %), su composición química viene determinada por los aportes que principalmente recibe de las plantas, donde predominan compuestos de difícil degradación como celulosa, xilana, lignina, suberina, cutina, fenoles y resinas, más los exudados procedentes de la parte radicular de la planta. Teniendo en cuenta que el contenido de carbono orgánico lábil es limitante, es probable que las bacterias desnitrificantes al no depender exclusivamente de un único sustrato sean competidoras más eficientes que las BSR.

La granulométrica limoarcillosa del sedimento de la marisma también podría favorecer a las bacterias desnitrificantes, como sugieren Pinay et al. (2000) cuando encuentran tasas de desnitrificación mayores en suelos limosos y arcillosos que en suelos arenosos. Es muy probable que existan otras causas por las que las bacterias desnitrificantes resultan más eficientes que las sulfatorreductoras en la marisma, sin embargo, ni los resultados obtenidos ni la bibliografía disponible nos permiten dar más hipótesis de la que ya hemos planteado.

Hay que ser cautos a la hora de interpretar los resultados. Se ha argumentado porqué la mineralización anaeróbica de la materia orgánica tiene lugar preferentemente por desnitrificación, pero esto no quiere decir que sea la principal vía de descomposición de los compuestos orgánicos del sedimento de la marisma. Hay indicios, como la oxigenación del sedimento y su alto poder de oxidación que nos sugieren que la respiración aeróbica de la materia orgánica es el principal proceso por el que se degradan los detritos de la marisma y se reciclan los nutrientes. Además de las propiedades fisicoquímicas del sedimento de la marisma, también lo sugiere la escasa eficiencia de la desnitrificación en el reciclado del N, como se discutirá en el siguiente apartado. A partir de todas estas consideraciones, en la figura 5.4 se presenta el modelo propuesto de mineralización de la materia orgánica en la marisma.

En la propia marisma se establecen diferencias, no cualitativas pero sí cuantitativas, en los procesos de metanogénesis y desnitrificación. En la zona más baja de la marisma cubierta de vegetación, la actividad desnitrificante es más intensa (8 veces más) que en la zona colonizada de tapetes microbianos, a pesar de que en ésta última la temperatura es 5° C mayor, lo que indica la temperatura no es responsable de estas diferencias. Algunos autores como Kelly et al., (1995) o Van der Nat y Middelburg (2000), justifican este hecho por los aportes de materia orgánica que recibe el sedimento a profundidades anóxicas de las raíces. El mayor contenido orgánico del sedimento de la marisma cubierta de plantas con respecto a la de tapete lo corrobora. Por otro lado, en la marisma se establece una relación inversa entre la desnitrificación y la metanificación: la zona baja produce más nitrógeno molecular, pero menos metano. Fenchel y Blackburn, 1979, explican esta relación por la inhibición de la producción de metano a causa del óxido nítrico, el óxido nitroso, el nitrito y el nitrato asociados a la actividad desnitrificante.

Resulta sorprendente que la zona cubierta de plantas siendo más productiva, pierda menos nitrógeno, aún cuando las plantas favorecen la emisión de gases a través de conductos dispuestos en las raíces llamados pneumatóforos (Bauza et al., 2002). La diferencia de 5° C entre ambas zonas, si bien no afecta a la producción, si

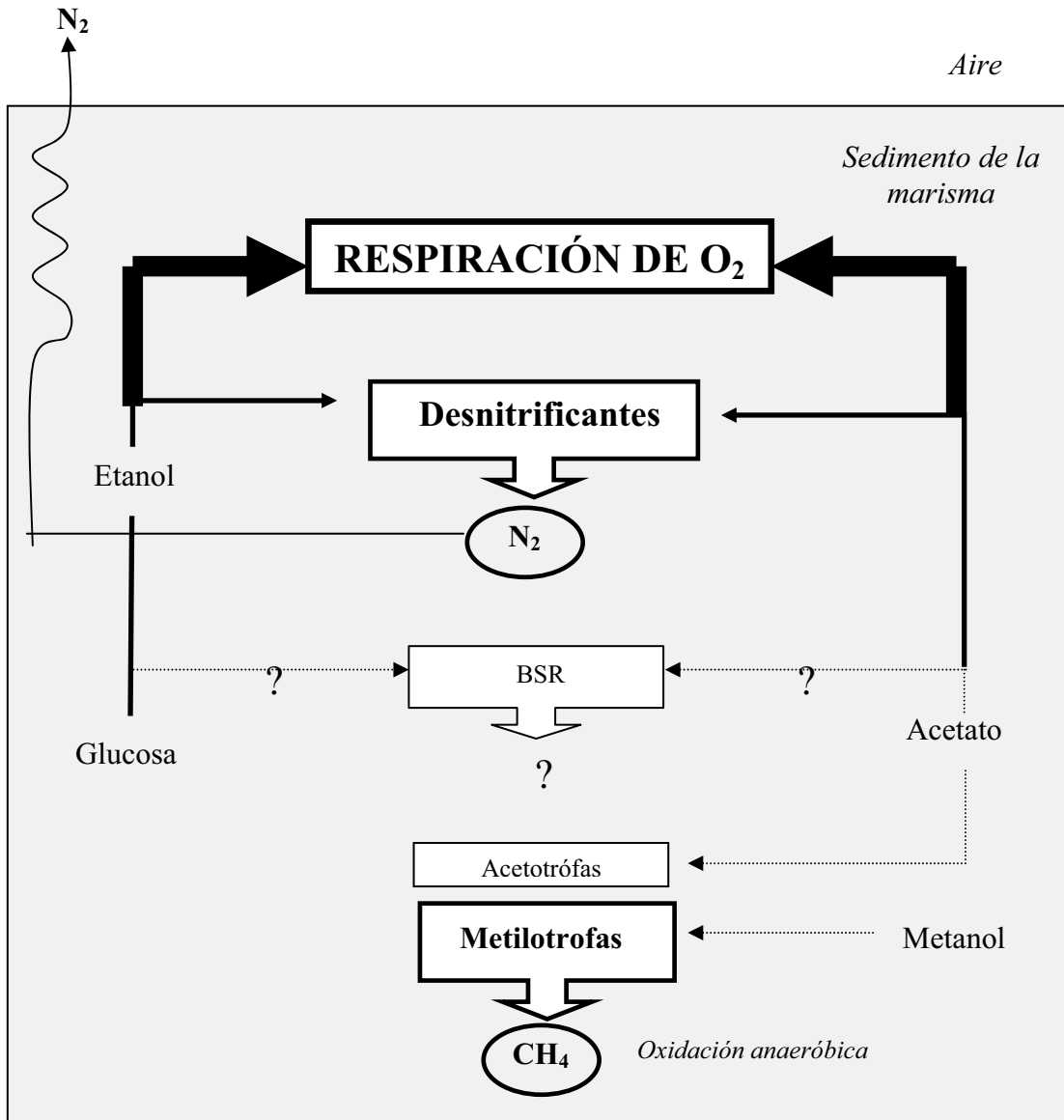


Figura 5.4.- Esquema los procesos de mineralización implicados en la dinámica de gases en el sedimento de la marisma del estuario del río Palmones. El grosor de la flecha indica la intensidad del proceso.

repercute en la emisión. Al aumentar la temperatura, también lo hace la presión parcial de los gases en el sedimento, favoreciendo su liberación a la atmósfera. El sedimento con tapete es capaz de liberar casi el 80% del nitrógeno molecular que produce, a diferencia del sedimento con vegetación que emite algo más del 30%.

En cualquier caso, el metano producido en la marisma queda retenido en el sedimento. Como en el sedimento del intermareal, la oxidación anaeróbica del

metano impide su liberación a la atmósfera, actuando la marisma como un acumulador de metano y “secuestrando” parte del C que entra en el sistema. Por otro lado, la marisma pierde N en forma de nitrógeno molecular. La desnitrificación es completa, por razones que ya han sido debatidas, por lo que el estuario no contribuye a la emisión de formas de nitrógeno con efecto invernadero, como sería en el caso de producir y emitir óxido nitroso.

La producción y emisión de gases en los ecosistemas marinos varía temporalmente a causa de las condiciones ecológicas (e.g. Martens y Klump, 1980; Barlett, 1981; Heyer y Berger, 2000; Allen et al., 2007). Se observa que la metanogénesis, la desnitrificación y la sulfatorreducción están sujetas a variaciones diarias, estacionales e interanuales. En el estuario del río Palmones no se han contemplado las variaciones diarias e interanuales, pero se ha observado que la formación de gases y su emisión a la atmósfera muestra una **variación estacional asociada al verano**, mientras que en invierno y primavera, los experimentos realizados *in situ* no revelan producción ni degasificación.

El comportamiento estacional del estuario de Palmones no difiere tanto de otros sistemas costeros, en los que la formación de gases aumenta considerablemente en verano (e.g. Barnes y Owen, 1998). En la tabla 5.6 se muestran valores de otros sistemas marinos que están en la misma línea, tasas que aumentan considerablemente en verano. Por ejemplo, Martens y Klump (1980) observaron en sedimentos marinos de Cape Lookout Bight, North Carolina (USA) tasas de producción y emisión de metano muy altas desde finales de mayo a principios de noviembre; mientras que la tasa de sulfatorreducción es tan elevada que el sulfato se consume rápidamente en los 10 primeros cm del sedimento (Barlett, 1981). En cambio, en invierno observan que la actividad de las bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras disminuye tanto que no hay emisión de metano, y el sulfato, ahora en exceso, puede encontrarse en capas más profundas del sedimento.

Son muchos y muy diversos los factores que determinan esta variabilidad estacional, pero la mayoría de los trabajos (e.g. Smith y Duff, 1988; Morris et al.,

1988; Fuijckawa y Hendry, 1991; Bauza et al., 2000; Whalen, 2005) coinciden en que la cantidad y calidad de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes, en particular de nitrato, y las propiedades fisicoquímicas del sedimento (pH, disponibilidad de oxígeno, potencial redox, salinidad, y temperatura), son los que condicionan la actividad de los microorganismos implicados en los procesos metabólicos responsables de la formación de gases en el sedimento.

En el estuario de Palmones, los datos *in situ*, avalados por los resultados experimentales, indican que la variación estacional de gases está determinada, principalmente, por la temperatura del sedimento; de acuerdo con las observaciones realizadas por varios autores en otros sistemas marinos como Wagner y Pfeiffer (1997) o Van der Nnat et al. (1998) en metanogénesis, Stanford et al. (1975) o Hanson et al., (1994) en desnitrificación, o Vosjan (1974) en la sulfatorreducción. Todos coinciden en un aumento en las tasas de producción con la temperatura, y por tanto, también la emisión.

Probablemente, la producción de gases en el sedimento del estuario y su emisión a la atmósfera sólo ocurra de mayo a septiembre, meses en los que la temperatura del sedimento del estuario iguala o supera los 30° C. Esta conjetura está basada en la fuerte dependencia que mostraron las bacterias metanogénicas y desnitrificantes por la temperatura experimentalmente a 35° C y la producción *in situ* observada en este trabajo a 30° C. También se ha teniendo en cuenta la temperatura óptima de las bacterias metanogénicas según la bibliografía (30-40° C), (Le Mer y Roger, 2001), los valores de Q_{10} de las bacterias desnitrificantes (la actividad aumentan el doble entre 15 y 35° C) (Stanford et al., 1975) y la temperatura anual registrada en Palmones: inviernos con valores por debajo de 10° C, y con máximos que apenas superan los 15-20° C durante unas pocas horas al día, y períodos entre mayo y septiembre que se alcanzan los 30° C, pudiendo llegar a temperaturas extremas de 47° C coincidiendo con las horas de mayor irradiancia en la marisma, entre las 14:00 y las 17:00 h, en el mes de julio.

Holtan-Hartwig et al. (2002), sugieren que la dependencia de la desnitrificación y la temperatura se debe al efecto directo que ésta ejerce sobre la actividad enzimática, e indirectamente sobre la disponibilidad de oxígeno, nitrato y sustratos de carbono en el sedimento. Pattinson et al. (1998) y García et al. (1998) encuentran en el río Wiske (Irlanda del Norte, Reino Unido) las tasas de desnitrificación más elevadas al final de primavera coincidiendo con el aumento de la temperatura y de la concentración de nitrato; en cambio, en invierno observan que las tasas son más bajas al disminuir la temperatura y al aumentar el flujo del río que perturba la superficie del sedimento y favorece la penetración del oxígeno.

Los experimentos de laboratorio realizados en este trabajo han revelado la importancia de la concentración de nitrato en la desnitrificación. En el estuario de Palmones la concentración de nitrato *in situ* experimenta un ligero aumento en verano, aunque el análisis estadístico mostró que no es significativo, de ahí que se considere que el aumento de la temperatura sea la principal causa de la producción estacional de gases en el sedimento. La estacionalidad del nitrato se da en relación con los procesos de nitrificación-desnitrificación: en invierno, la tasa de nitrificación es relativamente más alta que en verano, traduciéndose en un aumento de nitrato en el agua que difunde en verano hacia el sedimento para ser desnitrificado. La disponibilidad de nitrato en el sedimento en verano, propicia el aumento de la desnitrificación, observándose la disminución del contenido en nitrato del sedimento a principios del otoño (Vanderborgh et al., 1977). Oglivie et al. (1997) corroboran que las poblaciones de bacterias que reducen nitrato en el estuario Colne (Essex, UK) son distintas en verano e invierno.

Es posible encontrar otros patrones de distribución estacional atendiendo a la concentración de nitrato. Por ejemplo, Sørensen et al. (1979) encuentran en otros sistemas marinos las tasas más elevadas en enero, coincidiendo con concentraciones de nitrato más elevadas en invierno ($> 100 \mu\text{M}$) que en verano ($< 25 \mu\text{M}$). Este mismo patrón observa Koch et al. (1992) en el estuario del río Torridge (Inglaterra).

La disminución en verano del contenido orgánico del sedimento del estuario que se había acumulado en primavera, sugiere un aumento de la degradación de los compuestos orgánicos, hecho que también favorece la producción de gases en el sedimento, y su emisión a la atmósfera. Lo corroboran las conclusiones obtenidas en varios trabajos sobre metanogénesis (e.g. Heyer y Berger, 2000; Purvaja y Ramesh, 2001; Allen et al., 2007), desnitrificación (e.g. Sirivedhin y Gray, 2006), y sulfatorreducción (Vosjan, 1974).

4. Capacidad de Producción y Degasificación del Estuario. Su Importancia en el Reciclado de los Nutrientes y su Incidencia en el Cambio Climático.

La marisma de Palmones puede considerarse un eficaz bioacumulador. Los balances anuales de nutrientes en el sedimento de la marisma del Palmones estimados por Palomo (2004) indican que se acumulan grandes cantidades de carbono, nitrógeno y azufre. Estima en la marisma una entrada y salida de C al año de 7872 y -7312 g C m⁻² año⁻¹, respectivamente; resultando un balance neto de 560 g C m⁻² año⁻¹. Para el N estima una entrada y salida al año de 500 y -445 g N m⁻² año⁻¹, respectivamente; resultando un balance neto de 55 g N m⁻² año⁻¹. Parte del N que se acumula en el sedimento de una marisma procede de la deposición de biomasa aérea (Goulding, 1990; Koesterlman y Verhoeven, 1992), aunque Palomo (2004) plantea los flujos de nitrato durante las pleamares como una entrada esencial de N que renueva la marisma de Palmones. Estos balances se han calculado sin tener en cuenta las formas gaseosas de C y N. La marisma produce metano y nitrógeno molecular tras la mineralización de los compuestos orgánicos por metanogénesis y desnitrificación (0.28 g C m⁻² año⁻¹ y 2.74 g N m⁻² año⁻¹). El metano se oxida a formas inorgánicas de C, así el balance de C estimado por Palomo incluye el C producido durante la metanificación, mientras que una parte de N se emite a la atmósfera (1.03 g N m⁻² año⁻¹), resultando un balance neto de N de 56.71 g N m⁻² año⁻¹.

En la tabla 5.7 se comparan las pérdidas de N por desnitrificación en diferentes estuarios y sistemas marinos del Golfo de México según Zimmerman y Benner (1994) con la del estuario de Palmones. Como puede observarse, las pérdidas varían mucho de un estuario a otro, pero en cualquier caso, son siempre muy superiores a la estimada en la marisma; como mínimo pierden 4 veces más N. En estos estuarios, la desnitrificación moviliza entre el 14 y el 136% del N total; Seitzinger (1988), estimó porcentajes menores que los de Zimmerman y Benner en el Golfo de México, pero también en un rango muy amplio, entre el 15 y el 70%. Estos resultados ponen de manifiesto que los estuarios, sometidos a una fuerte carga de nutrientes antropogénica a través de los ríos, pueden eliminar a la atmósfera gran parte del nitrógeno que reciben gracias a la desnitrificación (Nixon et al., 1996). En cambio en el estuario de Palmones, la desnitrificación supone tan sólo el 0.23% del reciclado del N, a pesar de que según Palomo (2004) la marisma pierde el 88.72% del N que recibe, lo que indica la poca repercusión que tiene la desnitrificación en el reciclado del N en el estuario de Palmones. Se piensa que la mayor parte del N es exportado fuera de la marisma a través de los flujos de intercambio con la marea o es incorporado por la vegetación. Teniendo en cuenta que Palomo (2004) ha estimado que sólo el 12% de los detritos producidos por la comunidad de *Sarcocornia perennis*

| Localización | Pérdidas de N por desnitrificación (g N m ⁻² año ⁻¹) | % del N total |
|-------------------------------------|--|---------------|
| Estuario Nueces* | 6.4 | 136 |
| Estuario Guadalupe* | 4.9 | 23 |
| Trinity-San Jacinto* | 4.5 | 14 |
| Bahía Ochlockonee* | 9.0 | 52 |
| Marisma de Palmones Este trabajo | 1.03 | 0.23 |

Tabla 5.7- Eficiencia de la desnitrificación en diversos estuarios (* estuarios del Golfo de México (Zimmerman y Benner, 1994))

alpini se exportan fuera y que el resto se degrada con gran eficacia y rapidez, la pérdida de N a través de la marea debe ocurrir en forma de amonio. Según estos valores, la desnitrificación por sí sola no puede explicar la degradación de los detritos del sedimento acumulados en la marisma. Si como ya hemos discutido, la sulfatorreducción y la metanogénesis tampoco pueden explicarla, ¿por qué vía se degradan los detritos de la marisma con tanta eficiencia? Las condiciones fisicoquímicas del sedimento de la marisma, con un alto poder de oxidación y concentraciones de oxígeno altas al menos en los 10 primeros cm del sedimento, propician las condiciones óptimas para que la degradación de los compuestos orgánicos del sedimento de la marisma tenga lugar mayoritariamente por respiración aeróbica. De este modo se comprende que las tasas de mineralización anaeróbica (desnitrificación y metanogénesis) de los detritos del sedimento de la marisma resultan tan bajas en comparación con otros estuarios y sistemas marinos como hemos comentado con anterioridad en este trabajo.

El estuario podría producir 16 veces más nitrógeno molecular y emitir 23 veces más según la tasa de producción potencial obtenida a 35° C y 1 mM de NO_3Na (Figura 5.5). En la Bahía de Belfast Lough (Irlanda del Norte, Reino Unido) se encuentran tasas de desnitrificación potencial en torno a $200\text{-}430 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$, lo que indica que la capacidad de desnitrificación del estuario de Palmones (aproximadamente $16 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$) es muy inferior a otros sistemas costeros. En cuanto al óxido nitroso, pasaría de no detectarse a producir $1.28 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$, tasa similar a la que tiene lugar de forma natural en algunos sedimentos de estuarios como el estuario Yangtze en China (Wang et al., 1997). Asumiendo la tasa de emisión del nitrógeno molecular, se emitiría a la atmósfera $0.69 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$, valor que también está dentro del rango de emisión natural de este estuario: $0.01\text{-}1.62 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ (e.g. Wang et al., 2007). Esto supone que el estuario del río Palmones puede considerarse como un sistema en el que potencialmente reciclaría N y emitiría gas de N con efecto invernadero.

Resulta dudoso establecer el origen del óxido nitroso que el estuario produce potencialmente. Se atribuye a la nitrificación cuando la concentración de amonio del

sedimento es elevada y el Eh positivo (Corredor et al., 1999; Bauza et al., 2002, Muñoz-Hincapie et al., 2002), caso de la marisma, o a la desnitrificación a elevadas concentraciones de nitrato y Eh negativo (Kreuzwieser et al., 2003), como ocurre en el sedimento del intermareal.

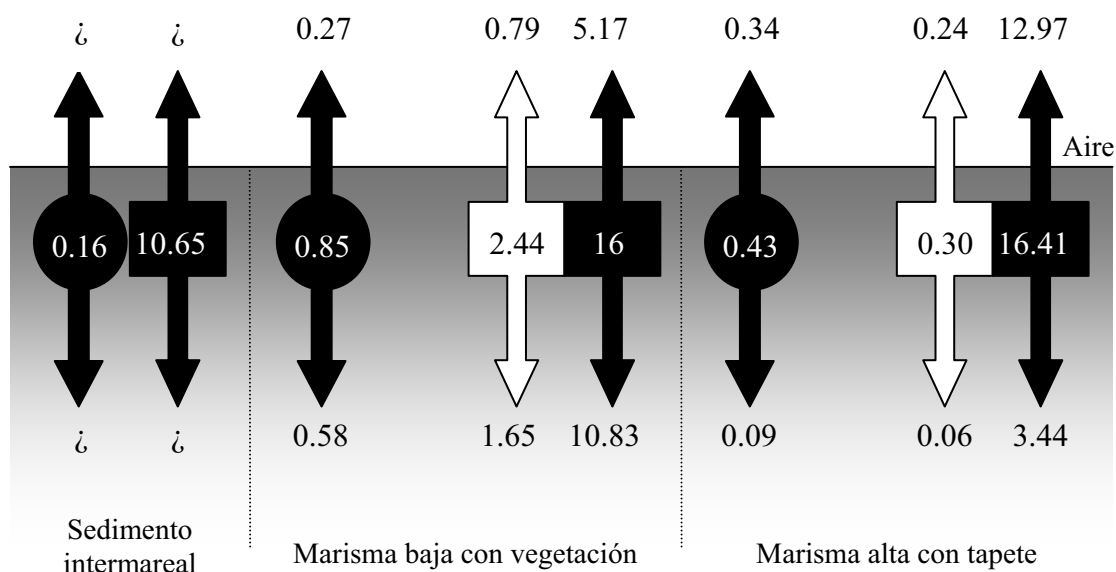


Figura 5.5.- Producción y emisión *in situ* y potencial de N₂O y N₂ (g N m⁻² año⁻¹) en el estuario del río Palmones. (círculo: N₂O, cuadrado: N₂, blanco: *in situ*; negro: potencial).

Considerando el número de horas al año que el sedimento de la marisma iguala o supera los 30° C (210 en la zona de vegetación y 299 en la de tapete), la tasa de metanogénesis y desnitrificación *in situ* en cada zona y el área que ocupa cada una (98 y 2 Ha, respectivamente) se calcula que la marisma produce un total de 32.30 Kg al año que probablemente es oxidado en su totalidad en su ascenso hacia la superficie del sedimento impidiéndose su emisión a la atmósfera, y 46 Kg de N en

forma de nitrógeno molecular al año, de los cuales 31 Kg quedarían retenidos en el sedimento, y 15 Kg pasarían a la atmósfera (Tabla 5.8).

| | Producción anual (Kg) | | Retención anual (Kg) | | Emisión anual (Kg) | |
|------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| | <i>in situ</i> | potencial | <i>in situ</i> | potencial | <i>in situ</i> | potencial |
| | | | | 21.04 | | |
| CH ₄ | 1.18 | 25.04 | 1.18 | | nd | -- |
| Marisma | | | | | | |
| N ₂ O | nd | 16.24 | nd | 10.88 | nd | 5.36 |
| N ₂ | 46 | 387.2 | 31 | 256.75 | 15 | 130.45 |

Tabla 5.8.- Producción y retención y emisión *in situ* y potencial de CH₄, N₂O y N₂ en la marisma de Palmones al año. (nd, no detectado)

Potencialmente (35° C y a concentración saturante de metanol y de nitrato) la marisma es capaz de producir 21 veces más metano del que se forma de manera natural y 8 veces más nitrógeno molecular. La marisma podría aumentar la emisión de nitrógeno molecular a la atmósfera 9 veces. En el caso del óxido nitroso, ausente en condiciones naturales, podría llegar a producirse 16.24 Kg, emitiéndose a la atmósfera 5.36 Kg al año. Los cálculos se han realizado sólo en la marisma, al desconocerse el área total que ocupa el sedimento intermareal, por lo que en de considerarse la totalidad del estuario los valores serían mayores.

Podemos concluir que el estuario de Palmones al presentar tasas de desnitrificación tan bajas su relevancia es escasa en el reciclado de N de la marisma. Por otro lado, al no producir ni emitir óxido nitroso, no contribuye al cambio climático con la emisión de gases de N con efecto invernadero. Tampoco lo hace a través del metano, pues como ya hemos discutido ampliamente, su posible oxidación en el sedimento impide su liberación a la atmósfera.

6. Conclusiones

1. La producción y emisión de gases en el estuario del río Palmones muestra una distribución espacial y estacional atendiendo las propiedades fisicoquímicas del sedimento y a diversos factores ecológicos que a su vez están determinados por la influencia de la marea y la presencia de macrófitos. Se pueden diferenciar dos zonas: el intermareal, donde predomina la sulfatorreducción, y la marisma donde predomina la desnitrificación. En ambos, la metanogénesis tiene un papel muy modesto. En cualquier caso, la formación de gases sólo tiene lugar en verano.
2. La formación de gases en el estuario de Palmones es muy inferior a la de otros estuarios. La temperatura, el oxígeno, la disponibilidad de nitrato y la naturaleza de los compuestos orgánicos del sedimento son los principales factores fisicoquímicos y ecológicos que determinan su formación y distribución espacial y estacional. En el caso del metano, también influye el contenido en sales del sedimento.
3. El estuario de Palmones no contribuiría al cambio climático. Gracias a la oxidación anaeróbica del metano en el sedimento y a la desnitrificación completa a nitrógeno molecular el estuario no emitiría gases con efecto invernadero.
4. El estuario podría contribuir potencialmente al cambio climático al emitir óxido nítrico. Su emisión sería similar a la que tiene lugar en otros estuarios naturalmente.
5. El papel de la desnitrificación en el reciclado del N en el estuario es irrelevante; la descomposición de los detritus del estuario ocurre vía sulfatorreducción en el intermareal y por respiración aeróbica en la marisma, por lo que la mayor parte del N se pierde en forma de amonio a través de los flujos de la marea.

7. Summary

1. Introduction
2. Sampling, Analytical Methods and Results
3. Discussion
4. Conclusions

1. Introduction

The Earth's climate has changed throughout history. From glacial periods or "ice ages" where ice covered significant portions of the Earth to interglacial periods where ice retreated to the poles or melted entirely, the climate has continuously changed. During the last 2000 years, the climate has been relatively stable. Scientists have identified three departures from this stability, known as the Medieval Climate Anomaly, the Little Ice Age and the Industrial Era. An additional warm period has emerged in the last 100 years, coinciding with substantially increasing emissions of greenhouse gases from human activities. Prior to the Industrial Era, the Medieval Climate Anomaly and Little Ice Ages, had defined the upper and the lower boundaries of the climate's recent natural variability and are a reflection of changes in climate drivers (the sun's variability and volcanic activity) and the climate's internal variability (referring to random changes in the circulation of the atmosphere and oceans). The issue of whether the temperature rise of last 100 years crossed over the warm limit to the boundary defined by the Medieval Climate Anomaly has been a controversial topic in the science community.

Greenhouse gas concentrations in the atmosphere have historically varied as a result of many natural processes (e.g. volcanic activity, changes in temperature, etc). However, since the Industrial Revolution, humans have added a significant amount of greenhouse gases in the atmosphere by burning fossil fuels, cutting down forests and other activities. As greenhouse gases absorb and emit heat, an increase in their concentrations in the atmosphere will tend to have a warming effect. But the rate and amount of temperature increase is not known with absolute certainty.

Methane (CH₄), a minor constituent of the atmosphere, plays an important role as a greenhouse gas. It is considered to be the third greenhouse gas after CO₂ and CFC_s (Lelieveld J., et al., 1993; Milich, 1999) and contributes to approximately 15% of the present greenhouse warming (Christiansen and Cox, 1995). Its concentration in the atmosphere is increasing at the alarming rate of about 1% year⁻¹, much faster than CO₂ (Cicerone and Oremland, 1988). Consequently, scientists have

extended a lot of effort in identifying and quantifying source and sink terms in the global methane budget. Nitrous oxide (N₂O) is another important greenhouse gas due to its long atmospheric lifetime (approximately 120 years) and heat trapping effects (about 310 times more powerful than carbon dioxide on a per molecule basis). It has increased approximately 18 percent in the past 200 years and continues to increase. For about 11500 years before the industrial period, the concentration of nitrous oxide varied only slightly. It increased relatively rapidly towards the end of the 20th century (IPCC, 2007).

The estimated methane and nitrous oxide emission to the atmosphere is rather uncertain due to high spatial and temporal variability and the limited data available. However, there is consensus in the literature that the wetlands represent the largest natural methane source with an estimated emission of 100-200 Tg year⁻¹ (about 30% of total methane emission). Marine ecosystems are presently estimated to play only a modest role in the global methane budget; their contribution representing between 1 and 10% of the total emission (Cicerone and Oremland, 1988; Bange et al., 1994). Although estuaries represent only 0.4% of the global ocean area, they contribute to about 7-10% of the total oceanic emission (Bange et al., 1994; Upstill-Goddard et al., 2000; Middelburg et al., 2001). About 70% of nitrous oxide entering the atmosphere originates from soils (Conrad, 1996). However, estuarine and coastal zones could account for about one half of the total ocean nitrous oxide emissions (Bange et al., 1996). Estuarine sediment can eliminate 10-60 % of the land generated nitrogen load (e.g. Nixon et al., 1995). About one half of the total nitrogen load received by estuarine areas globally is removed by denitrification (Nixon et al., 1996).

Several studies have been carried out in the estuary of Palmones River since the 1980s in order to characterize the nutrient concentration in water column and sediments (especially phosphorus) and the progressive eutrophication considering the tidal influence (e.g. Clavero et al., 1997, 1999; Izquierdo, 2001), the role of the salt marsh (Palomo, 2004) and the seasonal inputs from the river and the role of the dam (Avilés and Niell, 2007). Some studies have been made about the fauna (e.g.

López-Figueroa and Niell, 1987; Guevara and Niell, 1990; Clavero et al., 1991), and the ecophysiology of macrophytes (e.g. Pérez-Llorens et al., 1989, 1993, Palomo et al., 2004) and microbial mats (Carrasco, 2006). However, studies related with the role of the sediment in the gas production and emission have never been made.

The main objectives of this study are:

1. To develop the analytical method (Gas chromatography) and to optimize the experimental design for studying the methane, nitrous oxide and molecular nitrogen production and emission.
2. To study the production and emission of those gases *in situ*.
3. To identify and evaluate the main factors affecting the gases dynamic.
4. To evaluate the relationship between methanogenesis and the other degradation processes of the organic matter in the sediment.
5. To evaluate the potential gas production and emission in the Palmones Estuary and its implication in the climate change.

2. Sampling, Analytical Methods and Results

The study sites

The Palmones River Estuary is located in southern Spain (Algeciras Bay) at the end of a small catchment area (3.75 Km²). It is a narrow, shallow and eutrophic system with small tidal movements (maximum amplitude of 2 m) and a daily range of salinity from 29 to 35. The estuary is under the influence of important anthropogenic activities contributing to the progressive eutrophication from the last decade to nowadays (Clavero et al., 1997). This fact leads to a continuous increase in nutrient load, reflected in the sediment and in the water (Niell et al., 1996; Clavero et al., 1999a, b).

Two different areas can be observed in the Palmones Estuary: an intertidal zone free of higher plants and a salt marsh. The saltmarsh is mainly composed of

shrub species of the genus *Sarcocornia* (*S. perennis*, *S. alpini* (Lag) Castroviejo and *S. fruticosa* (L.) A.J. Scott) with a few shoots of *Juncus maritimus* L. and *Arthrocnemum macrostachyum* (Moric.) Moris, and other species less important in biomass. Microbial mats are frequent in the upper part of the marsh, occupying the sediment zones around occasional lagoons and little plant coverage (Carrasco, 2006).

Sampling and analytical methods

Samples were taken in three sites of Palmones River estuary: one on the **intertidal bare sediment** (intermareal) and two on the saltmarsh: one on the **flat vegetated surface of the marsh** dominated by *S. alpini* (Miller) Moss, (Vegetación), and one in the settling zone for the **microbial mats**, around the lagoon, (Tapete). One additional point was sampled in the river at 3 km from the estuarine stations (Río) (Figure 2.1 and 2.2).

PVC cores (4.5 cm i.d., 20 cm long) were taken from each site to carry out the experiments, to measure the pH, Eh and oxygen profiles in the sediment and to determine the content of organic matter, total particulate carbon, nitrogen and sulphur in the sediment, and nutrients (nitrate, nitrite and ammonium) and sulphate in the interstitial water. A unique section from the surface to 10 cm of depth was considered. This slide was chosen taking into account the maximum bacterial concentration at 6 cm in the estuary as reported by Clavero et al. (1999), and the maximum methanogenic activities in marine sediments at 0-10 cm in depth (Oremland et al. 1982, King et al., 1983, Heyer et al., 1990). Sediment temperatures in the field were measured with the temperature sensor HOB0 Water Temp Pro logger inserted into the surface sediment layer.

The sediment characterization results are shown in section 3 (pages 31-45).

Methane and denitrification rates were determined using the slurry technique described by Smith et al (1978). Anaerobic slurries were made by incubating a homogeneous mixture of sediment-water (50% w/v) into the glass serum vials

previously gassed with N₂ to ensure strict anaerobiosis. Methane and nitrous oxide concentrations were determined by headspace accumulation of gases into the serum bottles. Gas samples were injected into a gas chromatograph (HP 6890) equipped with a flame ionisation detector (FID) and an electron capture detector (ECD). Denitrification was measured by the acetylene blockage technique (Sørensen, 1978). Acetylene (C₂H₂) inhibits the final reduction of nitrous oxide to molecular nitrogen, the rate of nitrous oxide accumulation being used as a measure of denitrification.

An experimental study was performed in winter, spring and summer to determine the gas production and emission *in situ* (Figure 4.12)

Several experiments were carried out to investigate the influence of the following factors on methane formation rate (Figure 4.6):

- the temperature
- the substrate
- the relationship between sulphate-reducing and methanogenic bacteria
- the sulphate concentration
- the salinity

Other experiments were carried out in order to estimate the methane formation and sulphate-reducing rate in the intertidal sediment, and the possible methane aerobic oxidation in the sediment (Figure 4.9 and 4.13).

Another set of experiments were done to assess the effects of the following factors on denitrification rate (Figure 4.8):

- the temperature
- the addition of different nitrate concentrations
- the addition of different organic carbon concentrations

The results of all the experiments described above are shown from page 69 to 92.

3. Discussion

Sediments are the physical support for organic matter decomposition. Their biochemical properties determine the use of electron acceptors during mineralization, which in turn affects the type of gas formed within the sediment and released into the atmosphere.

According to biochemical properties, as well as environmental and ecological factors, the Palmones estuary comprises two different environments, i.e. **intertidal and saltmarsh**. On a smaller scale, the salt marsh shows topographical changes, with biochemical properties differing enough to have an impact on production and degasification processes.

The intertidal sediment occupies a wide area in the Palmones Estuary (Clavero et al., 1997). The sediment is sandy, has an around neutral or slightly alkaline pH, and is anoxic from the first cm, which gives it a strong reduction power. The saltmarsh shows finer granulometry (silt and clay fractions predominating), a more acidic pH, and an aerobic (at least in the first 10 cm) and oxidative environment (Figure 5.1). Organic matter, C, N, and sulphate contents are higher than in the intertidal zone; however, it shows lower S concentrations.

Sediment properties in these two areas are a reflection of the effect of tide and vegetation, radicular biomass being of higher importance than aerial biomass (Caçador et al., 1998) (Table 5.1). Tidal flooding frequency and duration determine sediment oxygenation and oxidative power. Tidal floods also bring sulphate to the sediment, contributing to S accumulation in the shape of inorganic and insoluble precipitates of pyrite (FeS_2). Oxygenated microenvironments form around the roots of plants due to the symbiotic relationship between the radicular biomass and the rhizosphere (De Bont et al., 1978; Schütz et al., 1991), which contribute to sediment oxygenation in the saltmarsh, increasing its redox potential. Moreover, they excrete organic substances which acidify marsh sediment (Whiting and Chanton, 1993; Thomas et al., 1995; Bubier, 1995).

They also bring organic detritus, generally difficult to degrade, such as cellulose, xylan, lignine, suberine, cutine, phenols, and resins, and high C:N indexes as a result of *Sarcocornia* detritus.

A significant difference in nitrate concentrations was not found between intertidal and saltmarsh zones. The nitrate concentration is significantly lower than in other estuaries: Palmones very rarely exceeds 50 μM , whereas other estuaries range between 30 and 600 μM , most of them being above 100 μM (e.g. Barnes and Owens, 1998; Usui et al., 2001; Wang et al., 2007). Intertidal and saltmarsh sediments are rich in the soluble forms of ammonia's inorganic N, being one order of magnitude higher than in other systems.

The sediments in the intertidal zone show coarser granulometry than the saltmarsh, gravel and sand being in high percentage due to sedimentation-resuspension processes (Demers et al., 1987; Delgado et al., 1991; De Jonge, 1992). The finer fraction increases with the elevation of the saltmarsh; thus, the sediment comprises more lime where there is vegetation, and more clay in the mat zone.

The topographic gradient in the saltmarsh determines high tide flooding frequency (Dijkema et al., 1990), which in turn conditions vegetation diversity, type, and distribution, and establishes spatial-temporal salinity and humidity gradients which influence sediment physicochemical and ecological properties. These variability sources have led us to differentiate between two areas in the saltmarsh zone, i.e. **the low-intermediate zone**, which suffers sporadic flooding, where macrophytes of the *Sarcocornia* genus are dominant (*S. perennis alpini* and *S. fruticosa*), and whose sediment comprises more lime and is more acidic, oxygenated, and oxidated than **the higher zone**, which is occasionally influenced by the tide, where clearings and bushy vegetation of the *Arthrocnemum macrotaschyum* species alternate, and microbial mats develop (Carrasco, 2006).

These two zones are also differentiated by organic and carbon content in the sediment, as well as by the C:N relationship (higher in the zone covered by

vegetation). The zone that is covered in mats is not so influenced by tide and vegetation, whose effects have been mentioned before, since it is higher and has little or no vegetation.

Estuaries are regarded as very productive systems with high levels of eutrophication (Nixon et al., 1986), which receive big quantities of dissolved and particulated material from rivers, and are often subject to strong anthropogenic pressure. As a result, these environments display a high production and atmospheric emission potential of N and C gases, some of which are greenhouse gases and have an effect on climate change (e.g. nitrous oxide and methane).

The Palmones estuary plays a double role in gas dynamics, which only shows in the warmer months of the year. On one hand, it may be considered a **methane sink**, not by capturing methane in the sediment from the atmosphere, but by not releasing the methane produced within the sediment itself. On the other hand, it can be considered a **molecular nitrogen source**. As a result, the estuary is a system which accumulates part of the C received, while it loses gas N, as described in previous work in the estuary (Clavero 1992; Palomo, 2004; Niell et al., 2005). N is released into the atmosphere in its molecular form, and not as nitrous oxide, which indicates that the Palmones estuary does not contribute to climate change through N greenhouse gas emissions. The methane produced in the estuary does not contribute to climate change, either, since, as we shall see below, its very likely oxidation in the sediment impedes its liberation into the atmosphere. We cannot say anything certain about sulphidric dynamics, since, due to methodological limitations, we only studied the sulphate reduction rates; however, there are indications for a possible accumulation of S in the sediment.

Tables 5.3 and 5.4 show methane production data obtained in Palmones and other world systems. The Palmones estuary is a system that produces little methane in comparison with others. Generally speaking, methane production is lower in marine systems such as estuaries than in non-saline terrestrial systems (rivers, lakes, etc.), due to their high salinity and high sulphate concentrations (e.g. Oremland,

1988). We have proved experimentally that, in the salinity and sulphate concentration conditions of the estuary, methane production decreases by almost 95% and 60-80%, respectively.

Estuary methane concentration is spatially distributed according to salinity, decreasing when salinity increases (e.g., De Angelis y Lilley, 1987). This effect has not been observed in the Palmones estuary due to its small size, since the salinity is practically constant along its 5.5 km. However, this effect has been observed in the Tagus Estuary (Lisbon, Portugal): methane production in high salinity zones (30 and 35) decreased between 80 and 90% with respect to river sediment (0 salinity).

The relationship between salinity-sulphate and methane production does not follow a bacterial inhibition process, but a competitive one. Sulphate-reducing bacteria compete more efficiently for the same substrate, hydrogen and acetate, than methanogenic bacteria (Winfrey and Zeikus, 1977; Schönheit et al., 1982; Zinder, 1993) in saline and sulphate-rich sediments (Abram and Nedwell 1978a,b; Bryant et al., 1977; Mountfort and Asher, 1979). Methane formation in sediments with high concentrations of sulphate (5-60 mM), similar to those found in the Palmones estuary, is possible due to the capacity of some methanogenic bacteria to use substrates which sulphate-reducing bacteria do not compete for (Table 5.5). The results have shown that, in the Palmones Estuary, although acetotrophic bacteria are also present, the main precursor for methane production is methanol, a non-competitive substrate (e.g. Oremland and Pociu, 1982; van der Maarel and Hansen; 1997), as it has been demonstrated experimentally.

Estuarine methane production in the Palmones River is inferior to other estuaries' due to the availability of the methanogenesis precursor (methanol) and sediment temperature. Other authors (e.g. Holmer and Kristensen, 1994; Wagner and Pfeiffer, 1997; Vandernat et al., 1998) have pointed out that methanogenesis depends on these factors. Experimental results have shown that methanol concentration in the sediment is limiting, and that estuarine methanogenic bacteria strongly depend on sediment temperature: there is no trace of activity (not potential,

nor real) below 35° C, even in methanol saturated conditions, which suggests that temperature is the key factor in controlling estuarine methane dynamics.

The methane produced in the estuary is not released into the atmosphere; hence, it does not contribute to global climate change by emissions of this greenhouse gas. The absence of atmospheric emissions of this gas could be attributed to anaerobic oxidation in the sediment while rising to the surface, as has been observed by other authors in other marine systems (e.g. Nedwell, 1996; Kotelnikova, 2002). The experimental results have ruled out the possibility of aerobic oxidation of methane in the estuary, more common in non-saline and well oxygenated soils and sediments (e.g. Conrad et al., 1995). Various authors highlight the importance of anaerobic oxidation processes in climate change, since they prevent between 5 and 20% of the methane produced in marine systems from reaching the atmosphere (Reeburgh and Alperin, 1988).

100% of estuarine anaerobic mineralization of organic matter through nitrate is complete, giving rise to molecular nitrogen as a final product. Therefore, this process does not contribute to climate change by the emission of nitrogen-derived greenhouse gases.

García et al. (1998) or Seitzinger (1988) found that molecular nitrogen formation accounts for 75 to 100% of denitrification, since the majority of denitrifying bacteria isolated from sediment belong to the *Pseudomonas* genus, and they produce molecular nitrogen.

The denitrification rate in the estuary ($0-22.29 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$), is lower than what is found in other marine and terrestrial systems ($0-2586 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{h}^{-1}$), (Table 5.6). The experiments reveal that the nitrate concentration, the availability and nature of reduced carbon compounds, and the estuarine temperature in the Palmones have a strong control over denitrification, in accordance with what other authors have observed (e.g. Tiedje, 1988; Smith and Duff, 1988; Morris et al., 1988; Fuijikawa and

Hendry, 1991; Pfenning and McMahon 1996). In the Palmones, nitrate concentration, rarely over 50 μM , is limiting, while it may reach maximum values between 1000 and 2000 μM in other systems. The concentration of organic compounds of labile mineralization in the estuary is also limiting, as it is in the majority of natural systems (e.g. Nedwell and Gray, 1987). Denitrification in the intertidal zone is linked to ethanol oxidation, while more complex compounds, such as acetate and glucose, also play a role in the marsh area. Denitrification in the estuary increases with temperature, as has been described in previous work (e.g. Harder and Veldkamp, 1971; Nedwell and Floodgate, 1971; Inniss and Mayfield, 1978); hence, estuarine denitrification may vary according to seasonal temperature patterns (Hanson et al., 1994), with the highest rates generally found in the warmest months –i.e. summer (e.g Barnes and Owens, 1998).

Gas dynamics in the Palmones estuary follow a spatial and temporal distribution due to physicochemical, ecological and environmental factors.

The two estuarine zones which we have differentiated according to sediment properties show different behaviours in terms of gas production and emission: **the intertidal zone** is a methane and, possibly, a sulphydic sink; **the saltmarsh zone**, which, apart from accumulating methane, represents a source of molecular nitrogen emission into the atmosphere. The intensity of production and degasification processes varies in the saltmarsh. Anyhow, **gas formation** is associated with a concrete season, i.e. **summer**.

The main organic matter decomposition route in the estuarine intertidal sediment is sulphate-reduction; methanogenesis is only accountable for a small proportion of organic compound mineralization in the estuary's sediment. The experiments indicate an absence of denitrification in this zone. The success of sulphate-reduction over denitrification stems from marine sediments having much higher sulphate than nitrate contents (e.g. Murray et al., 1978; Reeburgh, 1980, Ward and Winfrey, 1985). Moreover, the experimental results indicate that estuarine denitrification is limited by the availability and nature of organic compounds, as

mentioned above. Figure 5.3 schematically shows the mineralization processes implicated in gas dynamics in the intertidal sediment.

Due to methodological limitations, we have not been able to evaluate whether the estuary releases sulphidric or not; however, taking into account the high sulphate-reduction rates obtained, it is very likely that this is so. There are indications that lead us to consider that the intertidal sediment may have a double role in S dynamics. The high total S content in the sediment, as well as the low sulphate concentrations, make us believe that the intertidal sediment could also accumulate S by the formation of inorganic and insoluble compounds, such as pyrite (FeS_2), through the reaction of a high proportion of sulphidric with iron or magnesium metals. This hypothesis is based on the observations made by Howarth (1979), who defends that sulphate concentration in marine sediments is so abundant, that it allows the formation of pyrite while there are high concentrations of soluble forms of S (HS^- ó H_2S).

Both saltmarsh and intertidal zones are sulphate-rich and nitrate-poor environments. However, the results obtained through our experiments and observations suggest that the majority of organic matter decomposition is carried out by aerobic respiration (Figure 5.4). It is possible that sulphate-reduction is not relevant, since denitrification is the dominant process in aerobic mineralization of organic compounds in the sediment. Methanogenesis, like in the intertidal zone, plays a very modest role in organic matter mineralization.

Methanification in the saltmarsh is lower when denitrification is higher. This relationship is explained by Fenchel and Blackburn (1979) by the inhibition of methane production by products associated with denitrifying activity: nitric oxide, nitrous oxide, nitrite, and nitrate. The lower area of the saltmarsh zone, covered by vegetation, shows higher denitrification than the higher area, even when its temperature is 5°C lower. Organic matter supplied by the roots at anoxic depths, rather than temperature, explain this increase, as suggested by Kelly et al., (1995) or Vandernat and Middelburg (2000).

The lower saltmarsh, even though is more productive and plants favour gas emission through root canals (Bauza et al., 2002), loses less N than the higher marsh. The higher temperature found in the higher marsh zone allows the release of almost 80 % of the molecular nitrogen it produces, in contrast with the vegetated sediment, which releases slightly over 30%. Anyhow, the marsh zone loses N in the form of molecular nitrogen, and for this reason it does not contribute to the emission of nitrogen forms with greenhouse effect.

Gas production and emission in marine ecosystems are subject to daily, seasonal, and yearly variations, due to ecological conditions (e.g. Martens and Klump, 1980; Barlett, 1981; Heyer and Berger, 2000; Allen et al., 2007). The Palmones estuary has not shown daily and yearly variations; however, gas formation and atmospheric emission show **seasonal variations associated with the summer months**, while *in situ* experiments carried out in winter and spring do not show production or degasification. In other coastal systems, gas formation has also been observed to increase considerably during the summer (e.g. Barnes and Owen, 1998), as shown in Table 5.6.

Organic matter quantity and quality, nutrient availability (nitrate in particular), and the physicochemical properties of the sediment (pH, oxygen availability, redox potential, salinity, and temperature) are responsible for the seasonal formation of gas (e.g. Smith and Duff, 1988; Morris et al., 1988; Fujikawa and Hendry, 1991; Bauza et al., 2000; Whalen, 2005). *In situ* data from the Palmones estuary, supported by experimental data, indicate that seasonal gas variability is mainly determined by sediment temperature. Holtan-Hartwig et al. (2002) suggest that the dependency of denitrification on temperature is the result of the direct effect which the latter has on enzymatic activity, and, indirectly, on oxygen, nitrate, and carbon substrates availability in the sediment.

The production of gas in the estuarine sediment and its emission into the atmosphere probably take place from May to September only; in this period, the temperature of the sediment is equal or above 30° C. This hypothesis is based on the

strong dependency on temperature that methanogenic and denitrifying bacteria showed experimentally at 35°C, and the *in situ* production at 30°C observed in this work.

Optimum temperatures for methanogenic bacteria according to previous research have also been taken into consideration (30-40° C), as well as Q₁₀ values for denitrifying bacteria (activity doubles between 15 and 35°C), and the recorded annual temperature in the Palmones: winters with values below 10°C and maximum temperatures of barely above 15-20° C for a few hours a day, and periods between May and September that go up to 30° C, sometimes reaching extreme temperatures, such as 47° C, coinciding with the hours of the day with higher radiation in the marsh, between 2 and 5 pm in July.

The Palmones saltmarsh zone can be regarded as an efficient bioaccumulator. Annual nutrient balance in the marsh sediment as estimated by Palomo (2004) indicates that great quantities of carbon, nitrogen, and sulphur are accumulated. These calculations were made without considering C and N gas forms. The saltmarsh produces methane and molecular nitrogen after mineralization of organic compounds by methanogenesis and denitrification (0.28 g C m⁻² year⁻¹ and 2.74 g N m⁻² year⁻¹). Methane oxidates inorganic forms of C, so the C balance estimated by Palomo (560 g C m⁻² year⁻¹) includes the C produced during methanification, while a fraction of N is released into the atmosphere (1.03 g N m⁻² year⁻¹), resulting in a net balance of N of 56.71 g N m⁻² year⁻¹.

In the Palmones estuary, denitrification only mobilises 0.23 % of the total N, while other estuaries or marine systems can release between 14 and 36 % of the total N into the atmosphere (Table 5.7). Palomo (2004) has estimated that the saltmarsh loses 88.72 % of the N it receives, which shows the small repercussion of denitrification on N recycling in the Palmones estuary. Most of the N is incorporated in the saltmarsh sequestered by vegetation, or exported out of the marsh zone by the tidal flow as ammonia.

The estuary could produce 16 times more molecular nitrogen, and emit 23 times more, according to the potential production rate obtained at 35°C and NO_3Na 1 mM (Figure 5.5), although its production capacity is very inferior to other coastal systems'. Nitrous oxide would range from undetectable to $1.28 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$, a similar rate to that found naturally in some estuarine sediments, such as the Yangtze estuary in China (Wang et al., 1997). Assuming the molecular nitrogen emission rate, $0.69 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ would be released into the atmosphere; this value is also within the natural emission range for this estuary: $0.01\text{-}1.62 \text{ g N}_2\text{O-N m}^{-2} \text{ year}^{-1}$ (e.g. Wang et al., 2007). This means that the Palmones estuary can be considered a system that would potentially recycle N and release N greenhouse gases.

Considering the number of hours a year in which the marsh sediment equals or goes over 30° C in the lower saltmarsh zone covered in vegetation, and the higher mat zone (210 and 299 in the lower and higher zones, respectively), the methanogenesis and *in situ* denitrification rates, and the area occupied by each zone (98 and 2 Ha, respectively), the saltmarsh produces a total of 32.30 Kg of methane per year, which is probably completely oxidized as it rises to the sediment surface, impeding its atmospheric emission. 46 Kg of N in the form of molecular nitrogen are produced a year, out of which 31 Kg will be retained in the sediment, and 15 Kg will be released into the atmosphere (Table 5.8). Potentially (at 35°C and saturated concentrations of methanol and nitrate), the saltmarsh is able to produce 21 times more methane than naturally formed, and 8 times more molecular nitrogen. The saltmarsh could increase 9 times its molecular nitrogen emissions into the atmosphere. Nitrous oxide, absent in natural conditions, could be produced to a limit of 16.24 Kg, with an emission of 5.36 Kg per year. Calculations have been carried out for the saltmarsh only, since the total area occupied by the intertidal sediment is unknown; hence, if the total estuary were considered, the values would be higher.

As a conclusion, the Palmones estuary is poorly relevant in N recycling, due to its low denitrification rates. On the other hand, since it does not produce or

release nitrous oxide, it does not contribute to climate change with the emission of N greenhouse gases. The production of methane in the estuary does not contribute to climate change, either, since, as it has been widely discussed, its possible oxidation within the sediment hinders its release into the atmosphere.

4. Conclusions

1. The dynamics of gases in the Palmones River Estuary shows a spatial and seasonal distribution according to the physicochemical properties of the sediment and to several ecological factors that are determined themselves by the influence of the tide and the presence of macrophytes. Thus, two zones are different: the intertidal, where the sulphate-reduction predominates, and the saltmarsh where the denitrification prevails. In both of them the methanogenesis has a very modest role. In any case, the gas formation and emission only takes place in summer.

2. The gas formation of Palmones Estuary is far below the one of other estuaries. The temperature, oxygen, nitrate availability and the organic compound nature of the sediment are the main physicochemical and ecological factors that determine gas formation and its spatial and seasonal distribution. Another factor, the salt concentration in the sediment, also affects the methane formation.

3. Because of the anaerobic oxidation of the methane in the sediment and the complete denitrification to molecular nitrogen the estuary does not emit greenhouse gases, and therefore does not contribute to the climatic change.

4. The estuary could contribute potentially to the climatic change by means of the nitrous oxide emission with a similar value as happens naturally in other estuaries.

5. The role of the denitrification in the loss of the N in the estuary is irrelevant; the detritus decomposition occurs by sulphate-reducing in the interstitial sediment and by aerobic respiration in the saltmarsh. In this area most of the N is lost as ammonium through the tide flow.

8. Bibliografía

- Abram JW** and Nedwell DB (1978a) Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Archives of Microbiology* 117: 89-92
- Abram JW** and Nedwell, DB (1978b) Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulphate reduction in anaerobic salt marsh sediment. *Archives of Microbiology* 117: 93-97
- Abril F** and Borges A (2004) pp 187-207 Carbon dioxide and methane emissions from estuaries. In: Tremblay A, Varfalvy L, Roehm C and Garneau M (Eds.) *Greenhouse gas emissions: Fluxes and processes, hydroelectric reservoirs and natural environments*. Environmental science series, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp: 730
- Abril G** and Iversen N (2002) Methane dynamics in a shallow non-tidal estuary (Randers Fjord, Denmark). *Marine Ecology progress series* 230:171-181
- Adam P** (1990) *Saltmarsh ecology*. Cambridge University Press. pp: 461
- Allen DE**, Dalal RC, Rennenberg H, Meyer RL, Reeves S and Schmidt S (2007) Spatial and temporal variation of nitrous oxide and methane flux between subtropical mangrove sediments and the atmosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 622-631
- Alperin MJ**, Roxburgh WS and Devol AH (1992) In *organic Matter: Productivity, accumulation, and preservation in recent and ancient sediments*, Whelan J and Farrington JW (Eds) Columbia University Press, New York
- Álvarez-Rogel J**, Alcaraz F and Ortiz R (2000) Soil salinity and moisture gradients and plant zonation in Mediterranean salt marshes of southeast Spain. *Wetlands*. 20 (2): 357-372
- Alvarez-Rogel J**, Ortiz R, and Alcaraz F (2001) Edaphic characterization and soil ionic composition influencing plant zonation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma*. 99: 81-98
- Alperin MC** and Reeburgh WS (1984) Geochemical observations growth on C1 compounds. In: Crawford RL and Hanson RS (Eds). *American society for microbiology* Washington D.C
- Armstrong RB**, Leach EE, Whitman G, Harber LC and Poh-Fitzpatrick MB (1985) Quinidine photosensitivity 121:522-528

- Avilés A** (2002) El papel del sector fluvial en la biogeoquímica del río Palmones (los Barrios, Cádiz). Tesis doctoral. Universidad de Málaga
- Azni b Abd. Aziz S**, Nedwell DB (1986) The nitrogen cycle of an east coast, U.K. saltmarsh. II. Nitrogen fixation, nitrification, denitrification, tidal exchange. *Estuarine Coastal Shelf Science* 22: 689
- Balch WE**, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Reviews*. 43: 246-273
- Bange HS**, Rapsomanikis S and Andreae MO (1996) Nitrous oxide in coastal waters. *Global Biogeochemical Cycles* 10: 197-207.
- Bange HW**, Bartell UH, Rapsomanikis S, Andrea MO (1994) Methane in the Baltic and North Seas and a reassessment of the marine emissions of methane. *Global Biogeochemical. Cycles* 8: 465-480
- Barber TR**, Burke RA and Sackett WM (1988) Diffusive flux of methane from warm wetlands. *Global Biogeochemical Cycles* 2: 411-425
- Barlett KB**, Barlett DS, Harris RC, Sebacher DI (1987) Methane emissions along a salt marsh salinity gradient. *Biogeochemistry* 4: 183-202
- Barnes J** and Owens UP (1998) Denitrification and nitrous oxide concentrations in the Humber Estuary, UK, and adjacent coastal zones. *Marine Pollution Bulletin* 37: 247-260 In: Elsevier Science Ltd (eds) (1999) Great Britain
- Barnes RO** and Goldberd ED (1976) Methane production and consumption in anoxic marine sediments. *Geology* 4: 297-300
- Bauza JF**, Morell JM, Corredor JE (2002) Biogeochemistry of nitrous oxide production in the Red Mangrove (*Rhizophora mangle*) Forest Sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55: 697-704
- Bazhin NM** (2004) Influence of plants on the methane emission from sediments. *Chemosphere* 54: 209-215
- Bender M**, Martin W, Hess J, Sayles F, Ball L and Lambert C (1987) A whole-core squeezer for interfacial pore-water sampling. *Limnology and Oceanography*. 32 (6): 1214-1225
- Blunier T** and Brook EJ (2001) Timing of millennial-scale climate change in Antarctica and Greenland during the last glacial period. *Science* 291:109-112

- Bouchard V**, Creach V, Lefeuvre JC, Bertru G and Mariotti A (1998). Fate of plant detritus in a European salt marsh dominated by *Atriplex portulacoides* (L.) Aellen. *Hydrobiologia*. 373/374: 75-87
- Bouwman AF**, Van der Huek KW and Oliver JGJ (1995) Uncertainties in the global source distribution of nitrous oxide. *Journal of Geophysical Research* 100: 2785-2800
- Bryant MP**, Campbell LL, Reddy CA and Crabill MR (1977) Growth of desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulphate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 1162-1169
- Bubier JL** (1995) The relationship of vegetation to methane emission and hydrochemical gradients in northern peatlands. *Journal of Ecology*. 83: 403-420
- Butman CA** (1986) Sediment traps biases in turbulent flows: results from a laboratory flume studies. *Journal of Marine Research*. 44: 601-644
- Caçador I**, Vale C, Catarino F (1996). The influence of plants on concentration and fractionation of Zn, Pb and Cu in salt marsh sediments (Tagus estuary, Portugal). *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. 5: 193-198
- Caçador I**, Costa AL and Vale C (2004) Carbon storage in Tagus saltmarsh sediments. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* 4: 701-714
- Callaway RM**, Jones S, Ferren WR and Parikh A (1990) Ecology of a Mediterranean climate estuarine wetland at Carpintería, California: plant distribution and soil salinity in the upper marsh. *Canadian Journal of Botany*. 68: 1139-1145
- Cappenberg TE** (1974) Interrelations between sulphate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh water lake. Field observations. *Antonie van Leeuwenhoek* . *Journal of Serology and Microbiology* 40: 285-295
- Cappenberg TE** and Prins (1974) Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a freshwater lake. III. Experiments with ¹⁴C-labelled substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 40: 457-469

- Carrasco MA** (2006) Caracterización estructural y ecofisiológica de los tapetes microbianos de la marisma del Río Palmones (Cádiz). Tesis Doctoral. Universidad de Málaga
- Cartaxana P** (1999) Static and dynamic aspects of nitrogen cycling in a Tagus Estuary salt marsh. Ph.D. Universidade de Lisboa. Pp. 123.
- Cartaxana P** and Lloyd D (1999) N₂, N₂O and O₂ profiles in a Tagus Estuary Salt Marsh. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48: 751-756
- Cicerone RJ**, Oremland RS (1988) Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2: 299-327.
- Christiensen PB** and Sørensen J (1986) Temporal variation of denitrification activity in plant-covered littoral sediment from Lake Hampen, Denmark. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 1174-1179
- Christiansen TR**, Cox P (1995) Response of methane emission from arctic tundra to climatic change: results from a model stimulation. *Tellus, Ser. B.* 47 (B): 301-309
- Clavero V** (1992) Estudio experimental y modelo de intercambio de fosfato en la interface sedimento-agua en el Estuario del Río Palmones (Algeciras, Cádiz). Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. 206 pp
- Clavero V**, Fernández JA and Niell FX (1997) Intercambio de fosfato y adsorción por el sedimento del estuario del río Palmones. VII Seminario de Química Marina
- Clavero V**, Izquierdo JJ, Palomo L, Fernández JA and Niell FX (1999) Water management and climate changes increases the phosphorus accumulation in the small shallow estuary of the Palmones River (southern Spain). *The Science of the Total Environment* 228: 193-202
- Clavero V**, Niell FX and Fernández JA (1991) Effects of *Nereis diversicolor* O.F. Müller abundance on the dissolved phosphate exchange between sediment and overlying water in Palmones River Estuary (Southern Spain). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 33: 193-202
- Conrad R**, Frenzel P and Cohen (1995) Methane emission from hypersaline microbial mats: lack of aerobic methane oxidation activity. *FEMS Microbiology Ecology* 16: 297-306

- Cooper AB** and Cooke JG (1984) Nitrate loss and transformations in two vegetated headwater streams. *NZ J Marine and Freshwater Research* 19: 441-450
- Corredor JE**, Morell JM and Bauza J (1999) Atmospheric nitrous oxide fluxes from mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin* 38: 473-478
- Crill PM** and Martens CS (1983) Spatial and temporal fluctuations of methane production in anoxic coastal marine sediments. *Limnology and Oceanography* 28: 1117-1130
- Crozier CR** and DeLaune RD (1996) Methane production by soils from different Louisiana marsh vegetation types. *Wetlands* 16: 121-126
- Crutzen PJ** (1995) The role of methane in atmospheric chemistry and climate: In: *Rumiant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the Eighth International Symposium on Rumiant Physiology* (Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek, S., Breves, S. and Giesecke, D., Eds.) pp. 291-315. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Crutzen PJ** and Schmailzl U (1983) Chemical budgets of the stratosphere. *Planet Space Science* 31: 1099-1032
- Danais, M** and Legendre C (1986) La Baie de Mont Saint Michel. Premier bilan de Fonctionnement des systèmes écologique de la Baie de Mont Sant Michel. CEE environment et IRIEC
- Davis MW** and McIntire CD (1983) Effects of physical gradients on the production dynamics of sediments-associated algae. *Marine Ecology Progress Series* 13: 103-114
- De Angelis MA** and Lilley MD (1987) Methane in surface waters of Oregon estuaries and rivers. *Limnol Oceanogr* 32: 716-722
- De Angelis MA** and Scranton MI (1993) Fate of methane in the Hudson River and Estuary. *Global Biogeochemical Cycles* 7: 509-523
- De Beer D**, Sweets J, PRA (1989) Measurement of nitrate gradients with an ion-selective micro-electrode. *Analytica Chimica Acta* 219:351-356
- De Bont UA**, Lee KK and Bouldin DF (1978) Bacterial oxidation of methane in a rice paddy. *Ecological Bulletin* 26: 91-96
- De Jonge VN** (1992) Physical processes and dynamics of microphytobenthos in the Ems estuary (The Netherlands). Ph. D. thesis, University of Groningen.

- De Laune RD**, Smith CJ and Patrick JR (1983) Methane release from Gulf coast wetlands. *Tellus* 35B: 8-15
- Delgado M.**, De Jonge VN and Peletier H. (1991) Experiments on resuspension of natural microphytobenthos populations. *Marine Biology* 108: 321-328
- Demers S**, Therriault JC, Bourget E and Bah A (1987) Resuspension in the shallow sublittoral zone of a macrotidal estuarine environment: wind influence. *Limnology Oceanography* 32: 327-339
- Devereux R**, Winfrey MR, Winfrey J and Stahl DA (1996) Depth profile of sulphate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 23-31
- Devol AH**, Anderson JJ, Kuivila KM and Murray JW (1984) A model for coupled sulfate reduction and methane oxidation in the sediments of Saanich Inlet. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 993-1004
- Devol AH** (1991) Direct measurement of nitrogen gas fluxes from continental shelf sediments. *Nature* 349: 319-321
- Dijkema KS**, Bossinade JH, Bouwsema P and De Glopper RJ (1990) Salt marshes in the Netherlands Wadden Sea: Rising high-tide levels and accretion enhancement. In: Expected effects of climatic change of marine coastal ecosystems. Bukema JJ (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Holanda. Pp. 173-188
- Dong LF**, Thornton DCO, Nedwell DB and Underwood GJC (2000) Denitrification in sediments of the River Colne estuary, England. *Marine Ecology Progress Series* 203:109-122
- Dunn GM**, Herbert RA and Brown CM (1980) Enrichment, enumeration and characterisation of nitrate reducing bacteria present in sediments of the River Tay estuary. *Proc Royal Society Edinburgh* 78B: 47-56
- Elkins JW**, Butler JH, Thompson TM, Dutton GS, Montzka SA, Hall BD (2005) Halocarbons and Other Atmosphere Trace Species Group
- Estacio FJ**, García-Adiego EM, Carballo JE, Sánchez-Moyano, JE, Izquierdo JJ and García-Gómez JC (1999) Interpreting temporal disturbances in an estuarine benthic community under combined anthropogenic and climatic effects. *Journal of Coastal Research* 15: 155-167

- Etheridge DM**, Steele LP, Francey RJ, and Langenfelds RL (2002) Historical CH₄ Records Since About 1000 AD. From Ice Core Data. In Trends: A Compendium of Data on Global Change. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn., U.S.A.
- Fenchel T** and Blackburn TH (1979) Bacteria and mineral cycling. Academic.
- Firestone MK** (1982) Biological denitrification: factors controlling its biological production. In: F.J. Stevenson (Ed.). Nitrogen in agricultural soils. American Society of Agronomy, Madison, WI, 289-296
- Firestone MK**, Firestone RB, Tiedje JM (1979) Nitric oxide as an intermediate in denitrification: evidence from nitrogen-13 isotope exchange. Biochemical and Biophysical Research Communications 91: 10-16
- Flückiger, J**, Monnin E, Stauffer B, Schwander J, Stocker TF, Chappellaz J, Raynaud D and Barnola JM (2002) High resolution Holocene N₂O ice core record and its relationship with CH₄ and CO₂. Global Biogeochemical Cycles 16
- Fotch DD** (1974) The effects of temperature, pH and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen a zero-order kinetic model. Soil Science 118: 173-179
- Frenzel P**, Thebrath B and Conrad R (1990). Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). FEMS Microbiology Ecology 73: 149-158
- Fujikawa JI** and Hendry MJ (1991) Denitrification in clayey till. Journal of Hydrology 127: 337-348
- Furtado ALS** and Casper P (2000) Factors influencing methane production in an oligotrophic and in a eutrophic German lake. Verh. International Verein. Limnology 27:1441-1445
- García R**, Pattinson SN and Whitton BA (1998) Denitrification and nitrous oxide production in sediments of the Wiske, a lowland eutrophic river. The Sciences of the Total Environment 210/211: 307-320
- Goreau TJ**, Kaplan WA, Wofsy SC, McElroy MB, Valois FW and Watson SW (1980) Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced

- concentrations of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 526-532
- Goulding KWT** (1990) Nitrogen deposition to land from the atmosphere. *Soil Use and Management*. 6: 61-66
- Guevara JM** and Niell FX (1990) Growth rates in a continuously immersed population of *Cesratodema edule* L. *Scientia Marina* 53:483-489
- Haines, EB** (1977) The origin of detritus in Georgia salt marshes estuaries. *Oikos*. 29:254-260
- Hanson GC**, Groffman PM and Gold AJ (1994) Denitrification in riparian wetlands receiving high and low groundwater nitrate inputs. *J Environ Qual* 25: 917-922
- Harder W** and Veldkamp H (1971) Competition of marine psychrophilic bacteria at low temperatures. *Antonie van Leeuwenhoek* 37: 51-63
- Hernández I**, Peralta G, Pérez-Llorens JL, Vergara JJ and Niell FX (1997) Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones river estuary. *Journal of Applied Phycology* 33: 764-772
- Heyer J** and Berger U (2000) Methane emission from the coastal area in the Southern Baltic Sea. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 51: 13-30
- Heyer J**, Berger U, Sucknow R, (1990) Methanogenesis in different parts of a brackish water ecosystem. *Limnologica* 20: 135-139
- Hicks RE**, Lee C and Marinucci AC (1991). Loss and recycling of amino acids and protein from smooth cord grass (*Spartina alterniflora*) litter. *Estuaries*. 14: 430-439
- Hill AR** (1983) Denitrification its importance in a river draining an intensively cropped watershed. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 10: 47-62
- Holmer M** and Kristensen E (1994) Coexistence of sulphate reduction and methane -production in organic-rich sediment. *Marine Ecology Progress Serie* 107: 177-184
- Holtan-Hartwig L**, Dörsch P and Bakken LR (2002) Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N₂O production and reduction. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1797-1806

- Houghton P**, Woldemariam TZ, Candau M, Barnardo A, Khen-Alafun O and Shangxiao Li (1996) *Phytochemistry* 42(2): 485-488
- Hovland M**, Judd AG and Burke RA Jr (1993) The global flux of methane from shallow submarine sediments. *Chemosphere* 26: 559–578
- Howarth RW** (1979) Pyrite: its rapid formation in a saltmarsh and its importance in ecosystem metabolism. *Science* 203: 49-51
- Hubber H.**, Hubber R., Lödermann H.D., Stetter O.K., 1994. Search of hypermophilic microorganisms in fluids obtained from the KTB pump test. *Sci. Drill.* 4: 127-129
- Hussey A** and Long SP (1982) Seasonal changes in weight of above- and below-ground material in a salt marsh at Colne Point, Essex. *Journal of Ecology.* 70: 757-771
- Innis WE** and Mayfield CI (1979) Seasonal variation of psychrotrophic bacteria in sediment from Lake Ontario. *Water Research* 13: 481-484
- Intergovernmental Panel of Climate Change (IPCC)** (2007): *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning (eds.)].
- Inventario de Gases de Efecto Invernadero de España** (1990-2005). Comunicación a la comisión europea. Decisiones 280/2004/CE y 2005/166/CE. Ministerio de Medio Ambiente. Secretaría General para la Prevención de la Contaminación y del Cambio Climático. Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental. Subdirección General de Calidad del Aire y Prevención de Riesgos. Madrid, Marzo 2007
- Iversen N** and Jørgensen BB (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from the Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnology and Oceanography* 30: 944-955
- Izquierdo JJ** (2001) Aspectos del ciclo de los nutrientes no conservativos en el estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga, 233 pp
- Kana TM**, Sullivan MB, Cornwall JC, Groszkowski KM (1998) Denitrification in estuarine sediments determined by membrane inlet mass spectroscopy. *Limnology and Oceanography* 43: 334-339

- Joabsson A**, Christensen TR and Wallen B (1999) Vascular plant controls on methane emissions from northern peatforming wetlands. *Tree* 14 (10): 385-388
- Kelly CA**, Martens CS and Ussler W III, (1995) Methane dynamics across a tidally flooded riverbank margin. *Limnology and Oceanography* 40: 1112-1129
- Kemp WM**, Sampou P, Caffrey J, Mayer M (1990) Ammonium recycling versus denitrification in Chesapeake Bay sediments *Limnology and Oceanography* 35: 1545-1563
- King D** and Nedwell DB (1984) Changes in the nitrate-reducing community of an anaerobic saltmarsh sediment in response to seasonal selection by temperature. *Journal of General Microbiology* 130: 2935-2941
- King GM** (1990) Dynamics and controls of methane oxidation in a Danish wetland sediment. *FEMS Microbiology and Ecology* 74: 309-324
- King GM**, Klug MJ, Lovley DR, (1983) Metabolism of acetate, methanol and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1848-1853
- Knowles R** (1982) Denitrification. *Microbiol Rev* 46: 43-70
- Koerselman W** and Verhoeven JTA (1992) Nutrient dynamics in mires of various trophic status: nutrient inputs and outputs and the internal nutrient cycle. In: *Fens and Bogs in the Netherlands: Vegetation, History, Nutrient Dynamics and Conservation*. Verhoeven, JTA (Ed.). Kluwer, Dordrecht. Pp.: 397-342
- Koike I** and Hattori A (1977) Simultaneous determination of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a 15 N dilution technique. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 853-857
- Koike I** and Sørensen J (1988) Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. In: Blackburn TH, Sørensen J (eds) *Nitrogen cycling in coastal marine environments*. Wiley, Chichester, UK, pp 251-273
- Kotelnikova S** (2002). Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Reviews* 58: 367-395
- Koyama T** (1963) Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. *Journal of Geophysical Research* 68: 3971-3973

- Kreuzwieser J**, Buchholz J, Rennenberg H (2003) Emission of methane and nitrous oxide by Australian mangrove ecosystems. *Plant Biology* 5(4): 423-431
- Laurenson AE** and Seitzinger SP (2002) The role of denitrification in nitrogen removal and carbon mineralization in Mid-Atlantic Bight sediments. *Continental shelf research* 22: 1397-1416
- Le Mer J** and Roger P. (2001) Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil. Biology.* 37: 25-50
- Lelieveld J**, Crutzen PJ, Bruhl C (1993) Climate effects of atmospheric methane. *Chemosphere* 26: 739-768
- Lenssen JPM**, Meeting FBJ, van der Putten, WH and Blom CWPM (1999) Effects of sediment type and water level on biomass production of wetland plant species. *Aquatic Botany* 64: 151-165
- Li J-H**, Purdy KJ, Takii S and Hayashi H (1999) Seasonal changes in ribosomal RNA of sulphate-reducing bacteria and sulphate reducing activity in freshwater lake sediment. *FEMS Microbiology and Ecology* 28: 31-39
- Limmer AW** and Steele KW (1982) Denitrification potentials: measurement of seasonal variation using a short-term anaerobic incubation technique. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 179-184
- Livingstone MW**, Smith RV and Laughlin RJ (2000) A spatial study of denitrification potential of sediments in Belfast and Strangford Loughs and its significance. Agricultural and Environmental Science Division, The Department of Agriculture for Northern Ireland, Newforge Lane, Belfast BT9 5PX, UK
- Long SP** and Mason CF (1983) *Saltmarsh Ecology*. Glasgow, Blackie
- López-Figueroa F** and Niell FX (1987) Feeding behaviour of *Hydrobia ulvae* (Pennat) in microcosm. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 114: 153-167
- Lovely DR** and Klug MJ (1983) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulphate concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 187-192
- Macfarlane GT** and Herbert RA (1982) Nitrate dissimilation by *Vibrio* ssp isolated from estuarine sediments. *Journal of General Microbiology* 128: 2463-3468

- Magenheimer JF**, Moore TR, Chumura GL, Daoust RJ (1996) Methane and carbon dioxide flux from a macrotidal saltmarsh, Bay of Fundy, New Brunswick. *Estuaries* 19: 139-145
- Martens CS** and Berner RA (1977) Interstitial water chemistry of anoxic Long Island Sound sediments. I. Dissolved gases. *Limnology and Oceanography* 22: 10-25
- Martens CS** and Klump JV (1984) Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin 4. An organic carbon budget for sediments dominated by sulphate reduction and methanogenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 471-490
- Messer J** and Brezonik PL (1983) Comparison of denitrification rate estimation techniques in a large, shallow lake. *Water Research* 17: 631-640
- Middelburg JJ**, Klaver G, Nieuwenhuize J, Wielemaker A, Hass W, Vlut T, Vandernat FJWA (1996) Organic matter mineralization in intertidal sediments along an estuarine gradient. *Marine Ecology Progress Serie* 132: 157-168
- Middelburg JJ**, Nieuwenhuize J, Iversen N, Høegh N, de Wilde H, Helder W, Seifert R, Christof O (2002) Methane distribution in European tidal estuaries. *Biogeochemistry* 59:95-119
- Milich L** (1999) The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused? *Global Environmental Change* 9: 179-201
- Minz D**, Fishbain S, Green SJ, Muyzer G, Cohen Y, Rittmann BE, Stahl DA (1999) Unexpected population distribution in a microbial mat community: Sulfate-reducing bacteria localized to the highly oxic chemocline in contrast to a eukaryotic preference for anoxia. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4659-4665
- Moreno S** and Niell FX (2004) Scale of variability in the sediment chlorophyll content of the shallow Palmones River Estuary, Spain. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (60): 49-57
- Morris JT**, Whiting GJ and Chapelle FH (1988) Potential denitrification rates in deep sediments from the southeastern Coastal Plain *Technology* 22: 832-835

- Mountfort DA** and Asher RA (1979) Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of *Methanosarcina barkeri* strain DM. Applied and Environmental Microbiology 37: 670-675.
- Mountford DO**, Asher RA, Mays EL and Tiedje JM (1980) Carbon and electron flow in mud and sandflat intertidal sediments at Delaware Inlet, Nelson, New Zealand. Applied and Environmental Microbiology 39: 686-694
- Munoz-Hincapie M**, Morell JM and Corredor JE (2002) Increase of nitrous oxide flux to the atmosphere upon nitrogen addition to red mangroves sediments. Marine Pollution Bulletin 44: 992-996
- Murray GA**, Auld DL, Benson JA, Van Slyke CG, Studer BW, and Owens EW (1978) Potential sunflower production in Idaho. University of Idaho Current Inf. Ser. 434
- Nedwell DB** (1975) Inorganic nitrogen metabolism in a eutrophicated tropical mangrove estuary. Water Research 9: 221-231
- Nedwell DB** (1986) Methane production and oxidation in soils and sediments. In: J Colin Murrell and Donovan P. Kelly (Eds). Microbiology of atmospheric trace gases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. NATO ASI Series, 139: 33-49
- Nedwell DB**, Blackburn TH and Wiebe WJ (1994) Dynamic nature of the turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. Marine Ecology Progress Series 110: 223-231
- Nedwell DB**, Embley TM and Purdy KJ (2004) Sulphate reduction, methanogenesis and phylogenetics of the sulphate reducing bacterial communities along an estuarine gradient. Aquatic Microbial Ecology 37:209-217
- Nedwell DB** and Floodgate GD (1972) Temperature-induced changes in the formation of sulphide in a marine sediment. Marine Biology 14: 18-24
- Nedwell DB** and Gray TRG (1987) Soils and sediments as matrices for microbial growth. In: Fletcher M, Gray TRG and Jones JG (Eds) Ecology of microbial communities. Society for General Microbiology 41st symposium. Cambridge University Press, Cambridge, p 21-54
- Nedwell DB** and Rutter M (1984) Influence of temperature upon growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low

- temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1984-1992
- Nevison CD**, Weiss RF and Erickson III DJ (1995) Global oceanic emissions of nitrous oxide. *Journal of Geophysical Research* 100: 15089-15820
- Niell FX**, Avilés A and Clavero V (2005) The concept of eutrophication. In : Russo RC and Lekevicius R. Modeling nutrients loads and response in river and estuary systems. *NATO/CCMS Pilot Study* 271: 9-11
- Nielsen LP** (1992) Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbiology and Ecology* 86: 357-362
- Niewöhner C**, Hensen C, Zabel M and Schulz HD (1998) Deep sulfate reduction completely mediated by anaerobic methane oxidation in sediments of the upwelling area off Namibia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63: 455-464
- Nixon SW**, Ammerman JW, Atkinson LP, Berounsky VM, Billen G, Boicourt WC, Boynton WR, Church TM, DiToro DM, Elmgren R, Garber JH, Giblin AE, Jahnke RA, Owens NJP, Pilson MEQ and Seitzinger SP (1996) The fate of nitrogen and phosphorus at the land-sea margin of the North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry* 35: 141-180
- Oglive BG**, Nedwell DB, Harrison RM, Robinson AD, Sage AS (1997) High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: the nitrogen budget of the River Colne estuary. *Marine Ecology Progress Series* 150: 217-228
- Oremland RS** (1988) Biochemistry of methanogenic bacteria. In: Zehnder AJB (ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley, New York, pp. 641-707.
- Oremland RS** and Polcin S (1982) Methanogenesis and sulphate reduction: Competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1270-1276
- Palomo L** (2004). La influencia de *Sarcocornia perennis alpine* en el flujo de nutrientes del estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga, 225 pp
- Paterson DM** and Hagerthey SE (2001) Microphytobenthos in Contrasting Coastal Ecosystems: Biology and Dynamics. In Reise K. (Eds) *Ecological comparisons of sedimentary shores*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Pattinson SN**, García-Ruíz R and Whitton BA (1998) Spatial and seasonal variation in denitrification in the Swale-Ouse system, a river continuum. *The Science of the Total Environment* 210/211: 289-305
- Peters V**, Conrad R (1995) Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soil. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1673-1676
- Petit J.R.**, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis J, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov V, Lorius C, Pépin L, Ritz C, Saltzman E, and Stievenard M (2001) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok Ice Core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436
- Pfenning KS** and McMachon PB (1996) Effect of nitrate, organic carbon, and temperature on potential denitrification rates in nitrate-rich riverbed sediments. *Journal of Hydrology* 187: 283-295
- Pinay G**, Black VJ, Planty-Tabacchi AM, Gumiero B, Décamps H (2000) Geomorphic control of denitrification in large river floodplain soils. *Biogeochemistry* 50: 163-182
- Postgate JR** (1979) *The sulphate-reducing bacteria*, 151 pp. Cambridge: Cambridge University Press
- Purvaja R** and R. Ramesh (2001) Natural and anthropogenic methane emission from coastal wetlands of South India, *Environmental Management* 27 (2001), pp. 547-557
- Reeburgh WS** (1980) Anaerobic methane oxidation: rate depth distributions in Skan Bay sediments. *Earth and Planetary Science Letters* 47: 345-352
- Reeburgh WS** and Alperin MJ (1988) Studies on anaerobic methane oxidation. *Scientific American* 66: 367-375
- Rejmankova E** and Post RA (1996). Methane in sulphate-rich and sulphate-poor wetland sediments. *Biogeochemistry* 34: 57-70
- Renner ED** and Becker GE (1970) Production of nitric oxide and nitrous oxide during denitrification in the Swale-Ouse system, a river continuum. *Science of Total Environment* 210/211: 289-305

- Revsbech NP** (1994) Analysis of microbial mats by use of electrochemical microsensors: recent advances. In: Stal LJ, Caumette P (eds) *Microbial mats, structure, development and environmental significance*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 135-147
- Richards, BN** (1987) *The microbiology of terrestrial ecosystems*. Longman Ed. New York. Pp.: 399
- Robinson AD**, Nedwell DB, Harrinson RM and Ogilvie BG (1998) Hypernutrified estuaries as sources of N₂O emission to the atmosphere: the estuary of the River Colne, Essex, UK. *Marine Ecology Progress Series* 164: 59-71
- Schönheit P**, Kristjansson JK and Thauer RK (1982) Kinetic mechanism for the ability of sulphate-reducers to out-compete methanogens for acetate. *Archives of Microbiology* 132: 285-288
- Schütz H**, Schröder P and Rennenberg H (1991) Role of plants in regulating the methane flux to the atmosphere. In: *Trace gas emissions by plants* (Sharkey TD, Holland EA and Mooney HA, Eds) pp 29-63. Academic Press, San Diego
- Scranton MI**, Crill P, De Angelis M, Donaghay PL and Sieburth JM (1993) The importance of episodic events in controlling the flux of methane from an anoxic basin. *Global Biogeochemical Cycles* 7: 491-507
- Seitzinger SP** (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography* 33: 702-724
- Seitzinger SP** and Kroeze C (1998) Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 12: 93-113
- Seitzinger SP**, Nielsen LP, Caffrey J, Christensen PB (1993) Denitrification measurements in aquatic sediments: a comparison of three methods. *Biogeochemistry* 23: 147-167
- Seitzinger SP**, Nixon SW, Pilson ME, Burke S (1980) Denitrification and N₂O production in near-shore marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44: 1853-1860

- Seitzinger SP**, Nixon SW, Pilson ME, Burke S (1983) Nitrous oxide production in nearshore marine sediments. *Science* 222: 1244-1246
- Senior E**, Lindström B, Banat IM, Nedwell DB (1982) Sulfate reduction and methanogenesis in the sediment of a saltmarsh on the East coast of the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 987-996
- Shinn JA** (1941) *Ind. Eng. Chem. (Annual edition)*, 13:33. In: A practical approach handbook of seawater analysis. Stricklan, JDH and Parson, TR (Eds.). Ottawa. Fisheries Research Board of Canada 310 pp.
- Sirivedhin T** and Gray KA (2006) Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: Field and laboratory studies. *Ecological engineering* 26: 167-181
- Skyring GW**, Oshrain RL and Wiebe WJ (1979) Sulfate reduction rates in Georgia marshland soils. *Geomicrobiology Journal* 1: 389-400
- Smith RL** and Duff JH (1988) Denitrification in a sand and gravel aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1071-1078
- Smith MS**, Firestone MK and Tiedje JM (1978) The acetylene inhibition method for short-term measurements of soil denitrification and its evaluation using nitrogen-13. *Soil Science Society of America Journal* 42: 611-615
- Smith PH** and Mah RA (1966) Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied Microbiology* 14: 368-371
- Sowers T**, Alley RB, and Jubenville J (2003) Ice Core Records of Atmospheric N₂O Covering the Last 106,000 Years. *Science* 301: 945-948
- Sørensen J** (1978) Denitrification rates in marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Applied. Environmental Microbiology* 36: 139-143
- Spahni R**, Chappellaz J, Stocker TF, Loulergue L, Hausammann G, Kawamura K, Flückiger J, Schwander J, Raynaud D, Masson-Delmotte V, and Jouzel J (2005) Atmospheric methane and nitrous oxide of the late Pleistocene from Antarctic ice cores. *Science* 310: 1317-1321
- Stanford G**, Dzienia S and Van der Pol RA (1975) Effect of temperature on denitrification in soils. *Soil Science Society of America Proceeding* 39: 867-870

- Steele LP**, Krummel PB and Langenfelds RL (2002) Atmospheric CH₄ concentrations from sites in the CSIRO Atmospheric Research GASLAB air sampling network (October 2002 version). In Trends: A Compendium of Data on Global Change. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN, U.S.A.
- Stetter KO** (1992) Life at upper temperature border. In: Tran Thanh Van J.K., Mounlou J.C., Schneider C., McKay C. (Eds.). *Frontiers of Life. Colloque Interdisciplinaire comite national de la recherche scientifique*, Gif-sur-Yvette, France, pp. 195-219
- Takii S** and Fukui M (1991) Relative importance of methanogenesis, sulfate reduction and denitrification in sediments of the lower Tama river. *Bulletin of the Japanese Society for Microbial Ecology* 6: 1-8
- Teal, JM** (1962) Energy flow in the salt marsh ecosystem in Georgia. *Ecology* 43: 614-624
- Thomas KL**, Price D and Lloyd D (1995) A comparison of different methods for the measurement of dissolved gas gradients in waterlogged peat cores. *Journal of Microbiological Methods* 24: 191-198
- Tiedje JM** (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder AJB (Eds) 1988. *Biology of anaerobic organisms*. Wiley, New York, pp. 179-244
- Tison DL**, Pope DH and Boylen CW (1980) Influence of seasonal temperature on the temperature optima of bacteria in sediments of Lake George, New York. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 675-677
- Trimmer M**, Nedwell DB and Purdy KJ (1997) Process measurement and phylogenetic analysis of the sulphate reducing bacterial communities of two contrasting benthic sites in the upper estuary of the Great Ouse, Norfolk, UK. *FEMS Microbiology Ecology* 24: 333-342
- Upstill-Goddard RC**, Barnes J, Frost T, Punshon S, Owens NJP (2000) Methane in the southern North Sea: low-salinity inputs, estuarine removal and atmospheric flux. *Global Biogeochemical Cycles* 14: 1205-1217
- United States-Environmental Protection Agency (US EPA)** (2007)

- Usui T**, Koike I and Ogura N (2001) N₂O Production, Nitrification and Denitrification in an Estuarine Sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2001) 52: 769-781
- Valentine DL** and Reeburgh WS (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* 2(5): 477-484
- Van Bodegon PM** and Stams AJM (1999) Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. *Chemosphere* 39: 167-182
- Vanderborght JP**, Wollast R and Billen G (1977) Kinetic models of diagenesis in disturbed sediments. Part 2. Nitrogen diagenesis. *Limnology and Oceanography* 22: 794-803
- Van der Maarel MJEC** and Hansen TA (1997) Dimethylsulfoniopropionate in anoxic intertidal sediment: a precursor of methanogenesis via dimethyl sulphide, methanethiol, and methinolpropionate. *Marine Geology* 137: 5-12
- Van der Nat FJWA**, Middelburg JJ, Vanmeteren D, Wielemakers A (1998) Diel methane emission patterns from *Scirpus lacustris* and *Phragmites australis*. *Biogeochemistry* 41: 1-22
- Van Luijn R**, Boers PCM, Lijklema L (1996) Comparison of denitrification rates in lake sediments obtained by the N₂ flux method, ¹⁵N isotope pairing technique and the mass balance approach. *Water Research* 30: 893-900
- Vosjan JH** (1974) Sulfate in water and sediment of the Dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*. 8: 208-213
- Wagner D** and Pfeiffer EM (1997) Two temperature optima of methane production in a typical soil of the Elbe river marshland. *FEMS Microbiology and Ecology* 22: 145-153
- Wang D**, Chen Z, Wang J, Xu S, Yang H, Chen H, Yang L, Hu L (2007) Summer-time denitrification and nitrous oxide exchange in the intertidal zone of the Yangtze Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73: 43-53
- Wang XC** and Lee C (1994) Sources and distribution of aliphatic amines in saltmarsh sediment. *Organic Geochemistry* 22: 1005-1021
- Ward DM** and Winfrey MR (1985) Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. *Advances in Aquatic Microbiology* 3: 141-179

- Watson A** and Nedwell DB (1998). Methane production and emission from peat: the influence of anions (sulphate, nitrate) from acid rain. *Atmospheric Environment* 32: 3239-3245
- Watson A**, Stephen KD, Nedwell DB, Arah JRM (1997) Oxidation of methane in peat: kinetics of CH₄ and O₂ removal and the role of plants roots. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1257-1267
- Weiss RF** and Price BA (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry* 8: 347-359
- Whalen SC** (2005) Biogeochemistry of methane exchange between natural wetlands and the atmosphere *Environmental Engineering Science* 22: 73–94.
- Whiting GJ** and Chanton JP (1993) Primary production control of methane emission from wetlands. *Nature* 364: 794-795
- Whitman WB**, Bowen TL, Boon DR (1991) The methanogenic bacteria. In: Balows A, Tuper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer LH (eds) *The Procariotes*. Springer-Verlag, New York
- Winfrey MR** and Zeikus JG (1977) Effect of sulphate on carbon and deelectron flow during microbial methanogenesis in freshwater. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 275-281
- Woese CR**, Kandler O, Wheelis M (1990) Towards to a natural system of organisms. Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucaria*. *Proceeding of the National Academy Science U.S.A.* 87: 44576-44579
- Wolff WJ**, van Eeden, MJ and Lammens E (1989) Primary production of particulate organic matter on a salt marsh in The Netherlands. *Netherlands Journal of Sea Research*. 13: 242-255
- Wood ED**, Armstrong, FAJ and Richards F (1967) Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of Marine Biology*. 47: 23-31
- Zehnder AJB** and Brock TD (1978) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 137: 420-432
- Zimmerman AR** and Benner R (1994) Denitrification, nutrient regeneration and carbon mineralization in sediments of Galveston Bay, Texas, U.S. *Marine Ecology Progress Series* 114: 275

Zinder SH (1993) Physiological ecology of methanogens. In: Ferry JG (ed) Methanogenesis. Chapman & Hall, New York

Anexo I

- Caracterización del Sedimento al Inicio de los Experimentos de Producción y Emisión

| Experimentos de producción de N₂O y N₂ | | | | |
|---|---|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | Efecto de la temperatura | Efecto del nitrato | Efecto del C orgánico |
| MO (%) | I | 7.58 ± 1.35 | 6.55 ± 0.07 | 4.49 ± 0.05 |
| | V | 19.38 ± 2.62 | 15.34 ± 0.19 | 16.54 ± 0.20 |
| | T | 14.99 ± 0.38 | 13.84 ± 0.49 | 12.40 ± 0.08 |
| C:N | I | 13.61 ± 0.45 | 12.11 ± 0.20 | 11.90 ± 0.92 |
| | V | 15.82 ± 2.12 | 13.19 ± 0.05 | 15.43 ± 0.06 |
| | T | 12.77 ± 1.01 | 13.01 ± 0.08 | 12.22 ± 0.09 |
| S (mg S g _{PS} ⁻¹) | I | 9.02 ± 2.92 | 9.66 ± 0.98 | 7.59 ± 0.25 |
| | V | 2.94 ± 1.16 | 2.32 ± 0.13 | 2.64 ± 0.04 |
| | T | 2.41 ± 0.82 | 13.01 ± 0.08 | 2.14 ± 0.13 |
| NO ₃ (μM) | I | 1.59 ± 0.41 | 25.64 ± 3.38 | 4.9 ± 0.42 |
| | V | 6.93 ± 1.15 | 2.77 ± 0.01 | 10.9 ± 0.14 |
| | T | 6.96 ± 3.62 | 1.43 ± 0.03 | 8.3 ± 0.14 |
| NO ₂ (μM) | I | 0.65 ± 0.13 | 0.71 ± 0.03 | 2.8 ± 0.17 |
| | V | 4.60 ± 1.25 | 1.43 ± 0.01 | 2.98 ± 0.17 |
| | T | 1.76 ± 0.10 | 1.84 ± 0.08 | 2.15 ± 0.18 |
| NH ₄ (μM) | I | 376.25 ± 114.83 | 44.74 ± 7.78 | 32.47 ± 2.42 |
| | V | 138.60 ± 18.73 | 34.26 ± 7.36 | 16.58 ± 1.47 |
| | T | 123.15 ± 9.84 | 41.62 ± 0.00 | 24.27 ± 0.56 |
| SO ₄ (mM) | I | 14.41 ± 1.68 | 12.93 | 32.17 |
| | V | 12.44 ± 3.99 | 24.21 | 41.74 |
| | T | 15.79 ± 0.36 | 26.99 | 65.31 |
| Eh (mV) | I | -285 | -293 | -210 |
| | V | -200 | 58 | 175 |
| | T | -95 | 34 | 295 |
| pH | I | 7.75 | 7.15 | 7.54 |
| | V | 6.75 | 6.16 | 6.58 |
| | T | 6.84 | 6.69 | 6.73 |

Tabla I.i.- Caracterización analítica del sedimento previa a los experimentos sobre el efecto de la temperatura, del nitrato y de distinta fuente de C orgánico en la producción de N₂O y desnitrificación (N₂) a 35° C. (sedimento intermareal, I; de la marisma con vegetación, V, y con tapete, T).

| Experimento de metanogénesis y sulfatorreducción en el sedimento intermareal | |
|---|--------------|
| MO (%) | 6.24 ± 0.3 |
| C:N | 11.34 ± 0.39 |
| S (mg S g _{PS} ⁻¹) | 8.67 ± 0.61 |
| NO ₃ (μM) | 2.64 |
| NO ₂ (μM) | 1.01 ± 0.06 |
| NH ₄ (μM) | 508.2 ± 0.3 |
| SO ₄ (mM) | 5.55 |
| Eh (mV) | -58.7 |
| pH | 7.66 |

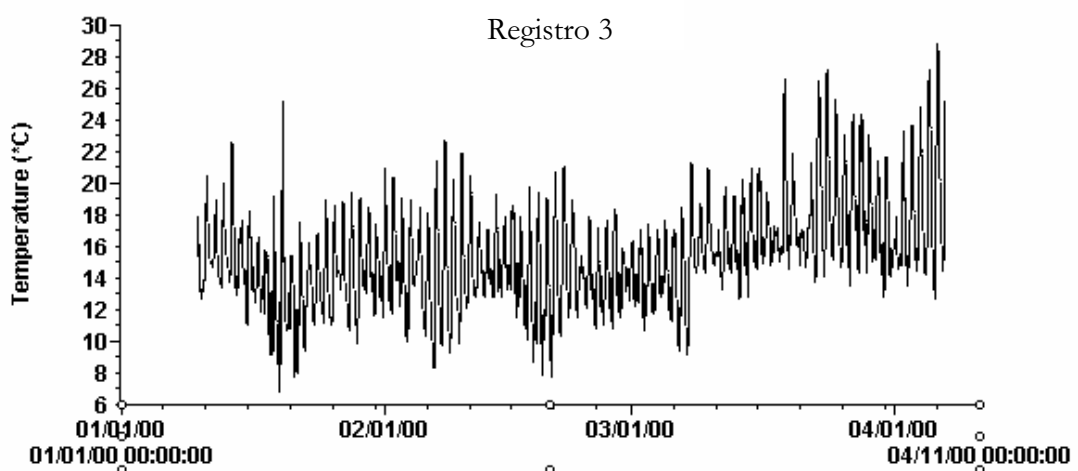
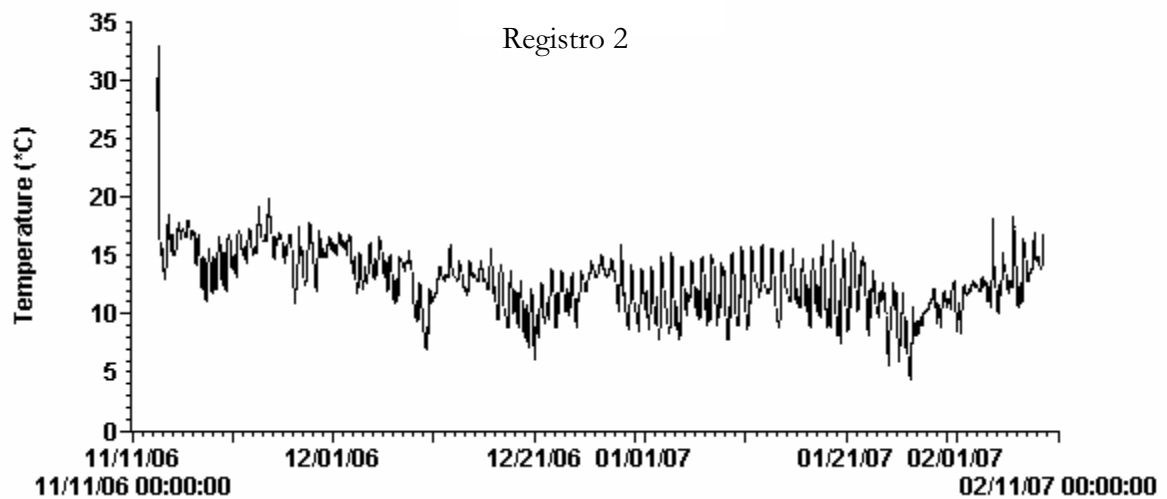
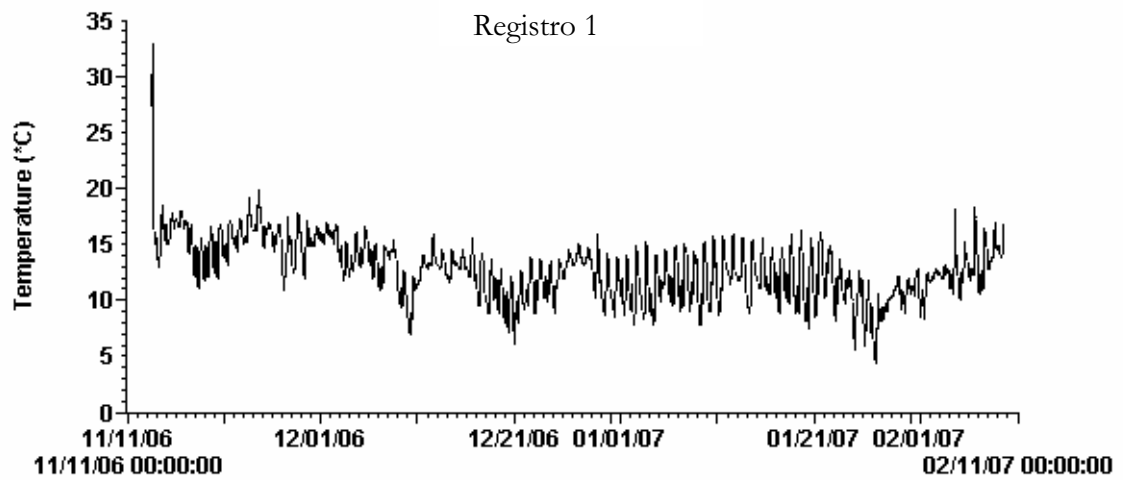
Tabla I.ii.- Caracterización analítica del sedimento previa al experimento de metanogénesis y sulfatorreducción en el sedimento del intermareal a 35° C.

| Experimentos de producción-emisión de gases <i>in situ</i> | | | | |
|---|---|-----------------|--------------|----------------|
| | | Invierno 07 | Primavera 07 | Verano 07 |
| MO (%) | I | 6.22 ± 1.93 | 7.04 ± 0.62 | 6.61 ± 0.94 |
| | V | 17.51 ± 0.79 | 14.33 ± 1.18 | 15.95 ± 1.51 |
| | T | 15.83 ± 1.39 | 12.56 ± 1.51 | 12.88 ± 0.70 |
| C:N | I | 10.45 ± 0.99 | 13.62 ± 1.79 | 11.60 ± 0.68 |
| | V | 12.66 ± 1.01 | 13.38 ± 0.30 | 15.38 ± 0.23 |
| | T | 10.89 ± 0.39 | 12.45 ± 0.65 | 12.30 ± 0.10 |
| S (mg S g _{PS} ⁻¹) | I | 9.52 ± 1.30 | 11.83 ± 2.57 | 8.48 ± 1.05 |
| | V | 2.26 ± 0.49 | 2.12 ± 0.25 | 2.40 ± 0.30 |
| | T | 1.77 ± 0.37 | 1.45 ± 0.25 | 1.98 ± 0.23 |
| NO ₃ (μM) | I | 1.27 ± 0.38 | 32.68 ± 9.04 | 5.00 ± 1.79 |
| | V | 2.33 ± 0.62 | 5.94 ± 3.67 | 6.44 ± 3.03 |
| | T | 1.68 ± 0.41 | 3.14 ± 2.02 | 12.04 ± 6.89 |
| NO ₂ (μM) | I | 0.75 ± 0.07 | 1.11 ± 0.47 | 0.70 ± 0.32 |
| | V | 0.89 ± 0.16 | 1.41 ± 0.03 | 0.80 ± 0.38 |
| | T | 0.53 ± 0.18 | 2.07 ± 0.28 | 2.09 ± 0.46 |
| NH ₄ (μM) | I | 375.73 ± 112.79 | 44.81 ± 3.21 | 164.09 ± 47.70 |
| | V | 188.98 ± 54.31 | 32.20 ± 4.88 | 252.99 ± 14.64 |
| | T | 240.15 ± 116.35 | 41.17 ± 1.20 | 234.89 ± 72.43 |
| SO ₄ (mM) | I | 17.7 ± 7.90 | 14.74 ± 2.5 | 32.50 ± 1.12 |
| | V | 30.67 ± 11.05 | 30.83 ± 5.44 | 80.31 ± 9.35 |
| | T | 20.11 ± 6.02 | 31.17 ± 9.85 | 89.50 ± 8.84 |
| Eh (mV) | I | -380 | -309 | -265 |
| | V | 237 | 277 | -86 |
| | T | 142 | 107 | -90 |
| pH | I | 7.34 | 7.045 | 7.55 |
| | V | 5.36 | 5.98 | 6.53 |
| | T | 6.20 | 6.17 | 6.72 |

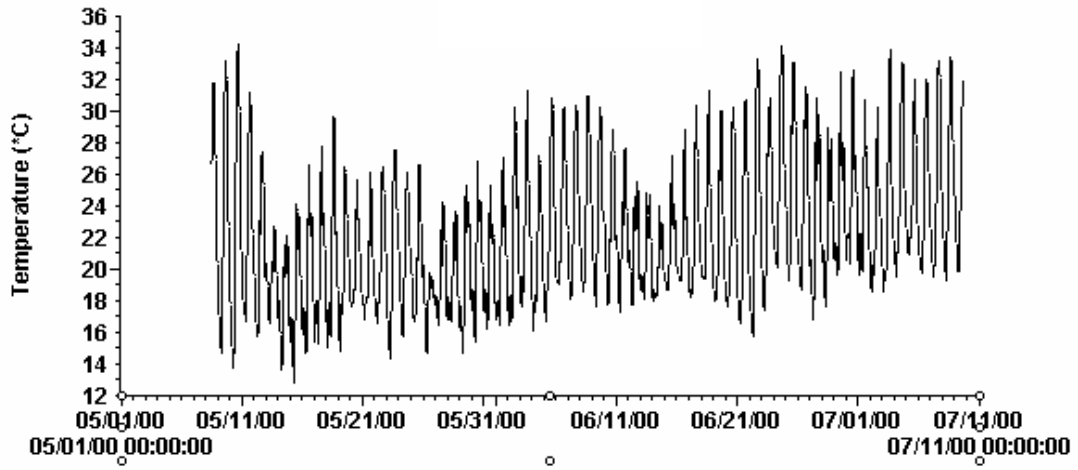
Tabla I.iii.- Caracterización analítica del sedimento previa a los experimentos de producción y emisión de gases *in situ* del sedimento en otoño, primavera y verano. (sedimento intermareal, I; de la marisma con vegetación, V; y con tapete, T).

Anexo II

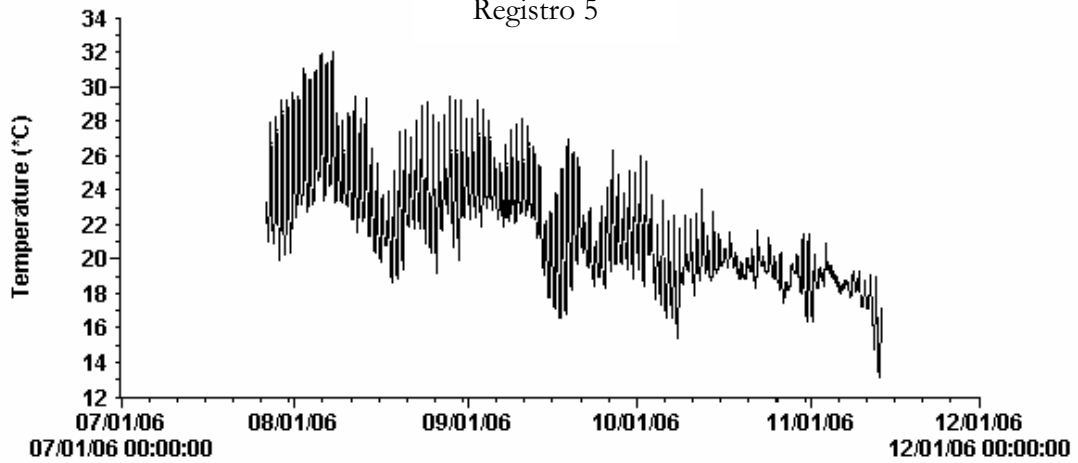
- Registros de Temperatura del Sedimento del Intermareal y de la Marisma



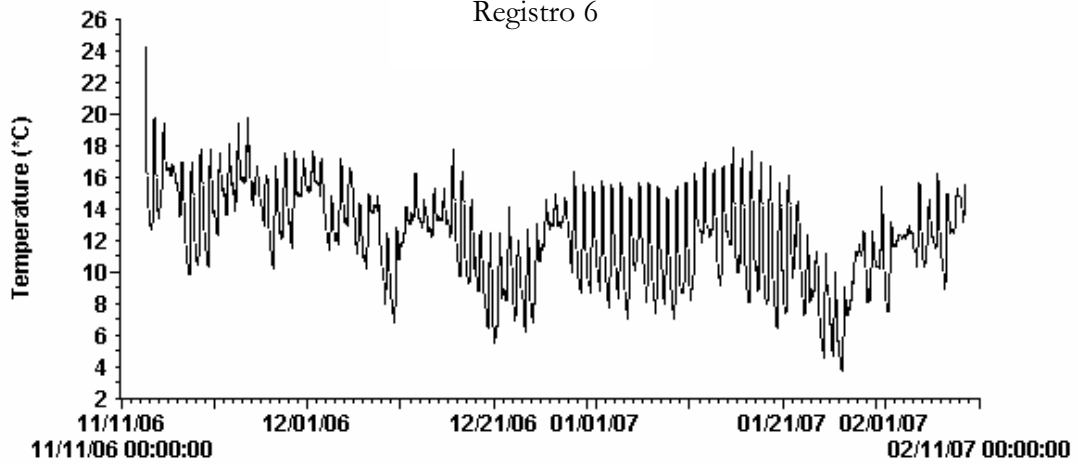
Registro 4

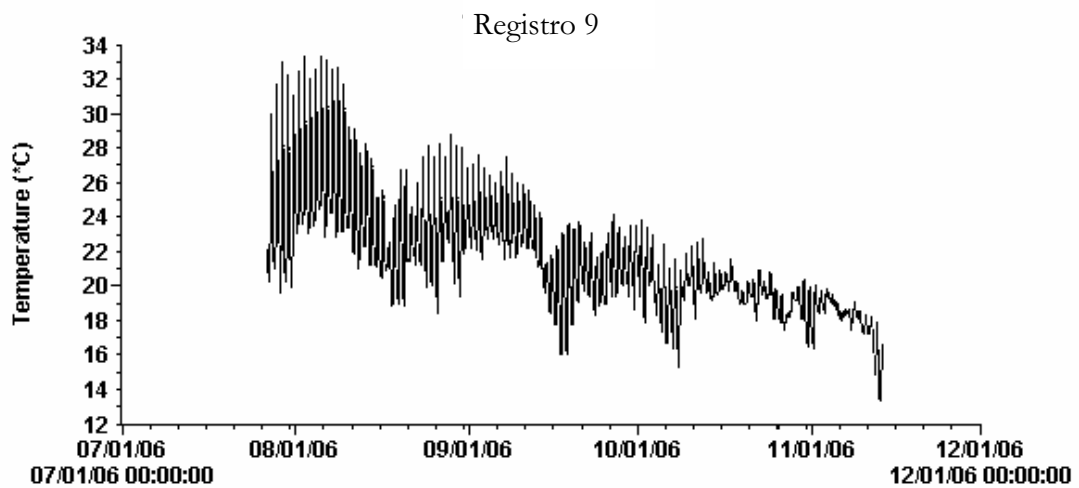
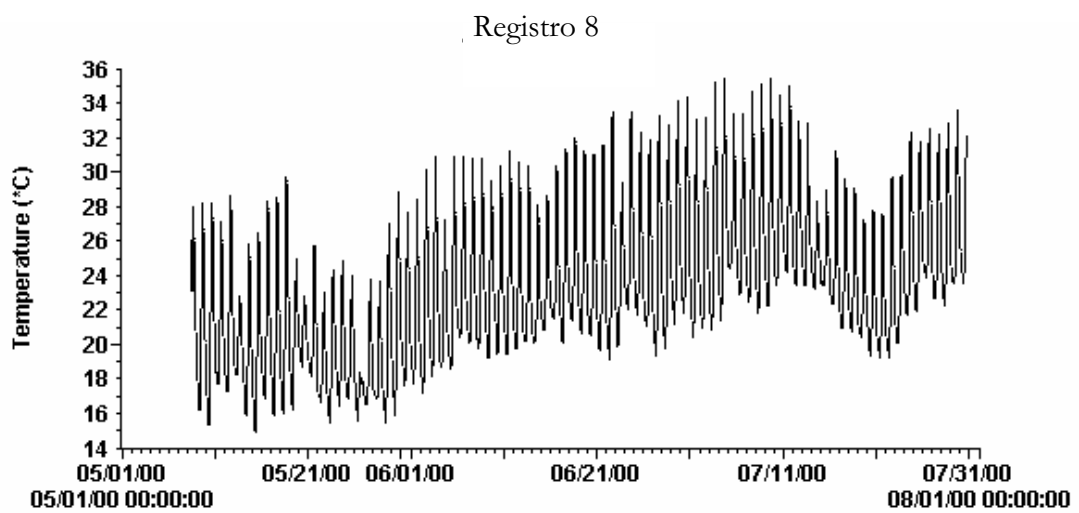
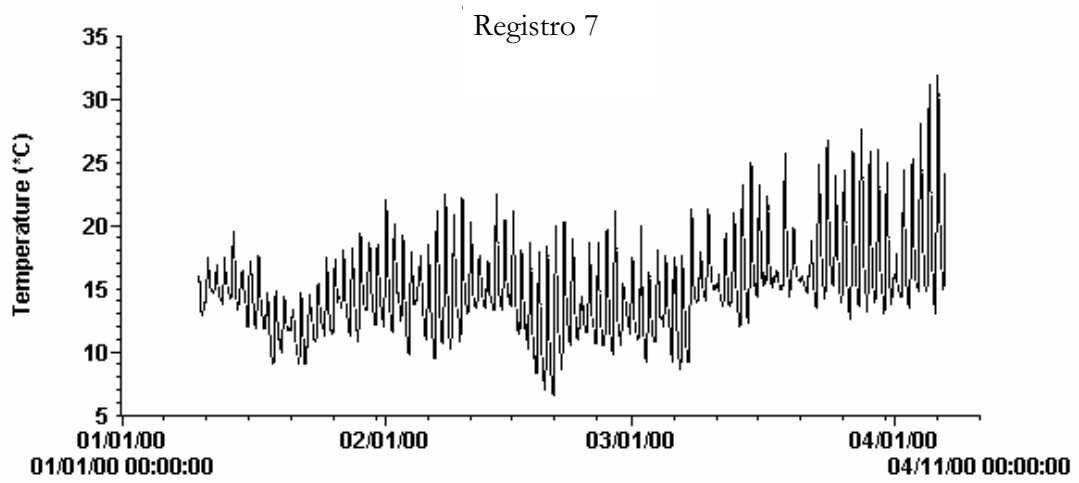


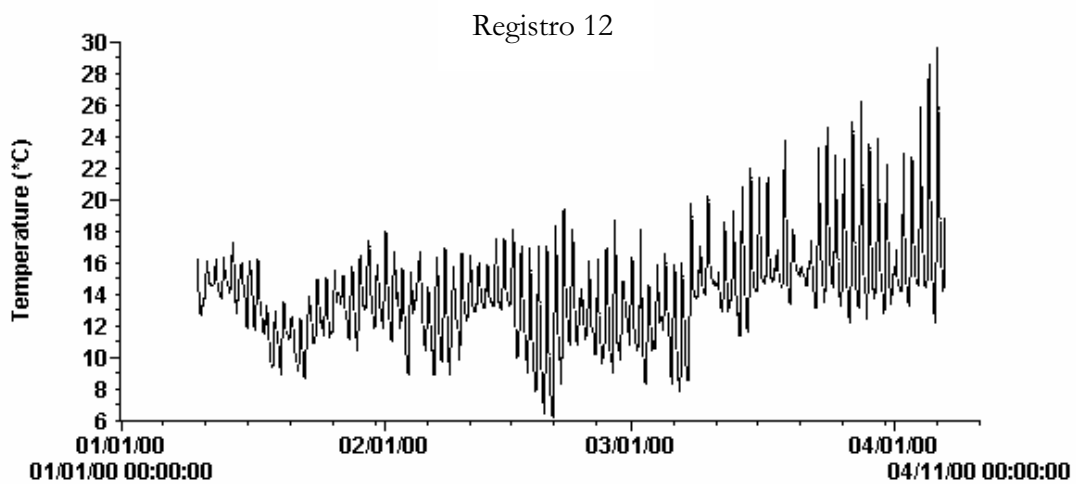
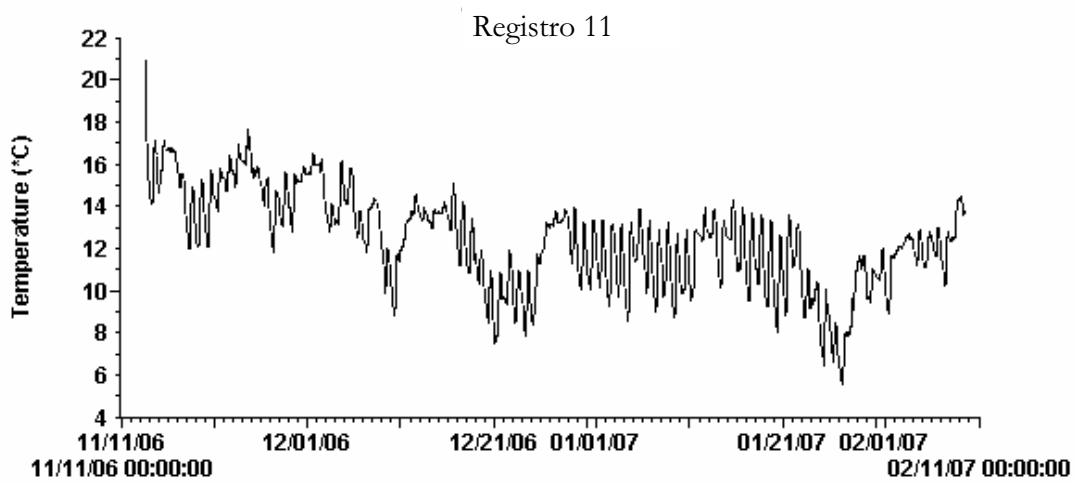
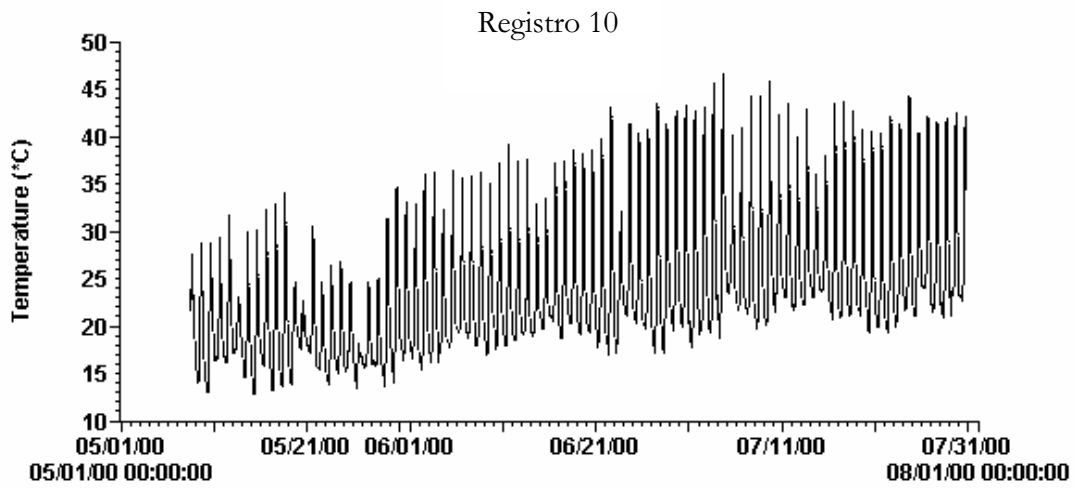
Registro 5



Registro 6







- Registro 1: Sedimento del intermareal (julio-noviembre 2006)
- Registro 2: Sedimento del intermareal (noviembre 2006-febrero 2007)
- Registro 3: Sedimento del intermareal (febrero-mayo 2007)
- Registro 4: Sedimento del intermareal (mayo-agosto 2007)
- Registro 5: Sedimento de la marisma con vegetación (julio-noviembre 2006)
- Registro 6: Sedimento de la marisma con vegetación (noviembre 2006-febrero 2007)
- Registro 7: Sedimento de la marisma con vegetación (febrero-mayo 2007)
- Registro 8: Sedimento de la marisma con vegetación (mayo-agosto 2007)
- Registro 9: Sedimento de la marisma con tapete(julio-noviembre 2006)
- Registro 10: Sedimento de la marisma con tapete (noviembre 2006-febrero 2007)
- Registro 11: Sedimento de la marisma con tapete (febrero-mayo 2007)
- Registro 12: Sedimento de la marisma con tapete (mayo-agosto 2007)

