

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

MÁSTER UNIVERSITARIO EN EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO AMBIENTAL
DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA POLITECNICA
SUPERIOR DE GANDIA

“Influencia de la materia orgánica sobre los flujos de nutrientes en la interfase sedimento-agua”

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autor/es:

Lara Galbis Valiente

Director/es:

**Dra. Silvia Laura Falco
Giaccaglia**

GANDIA, 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Materia orgánica en los sedimentos	1
1.2 Estudio de los flujos en la interfase sedimento-agua	2
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1 Extracción y procesado de sedimento base	6
3.2 Descripción del experimento	7
3.2.1 Montaje	
3.2.2 Aclimatación	
3.2.3 Ensayo para la determinación de los flujos	
3.2.4 Toma de muestras de sedimentos de las cámaras	
3.3 Tipos y niveles de materia orgánica ensayados en los experimentos	13
3.3.1 Pienso	
3.3.2 Mejillones y fitoplancton	
3.4 Métodos analíticos	15
3.4.1 Aguas	
3.4.2 Sedimento	
3.5 Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Flujos y parámetros bioquímicos del sedimento en el experimento realizado con pienso	18
4.2 Flujos y parámetros bioquímicos del sedimento en el experimento realizado con mejillones más fitoplancton	25
5. CONCLUSIONES	32
6. REFERENCIAS	34

RESUMEN

La materia orgánica en los sedimentos marinos es degradada a través de una red de procesos más o menos compleja, teniendo gran influencia en el ciclo de los nutrientes. El presente trabajo se centra, mediante experimentos *ex situ* con cámaras bentónicas en laboratorio, en el estudio sobre cómo afecta la concentración de materia orgánica y sus características, a los flujos de oxígeno y nutrientes en interfase sedimento-agua. Así se demostró que los flujos de oxígeno estuvieron inversamente relacionados con la cantidad de compuestos biopoliméricos de carbono presentes en el sedimento ya que éstos son consumidos durante su mineralización, así como procesos de amonificación y nitrificación cuya importancia estuvo determinada por la presencia de macromoléculas orgánicas principalmente.

Palabras clave: incubaciones en laboratorio, cámaras bentónicas, compuestos biopoliméricos de carbono.

ABSTRACT

Organic matter in marine sediments is degraded through a complex web of degradation processes, having great influence on the cycle of nutrients. This study is focused on the analysis of fluxes of oxygen and nutrient in sediment-water interface and their relationships with different concentrations and types of organic matter, using *ex situ* experiments with benthic chambers in the laboratory. It was observed that oxygen fluxes were inversely related to the amount of biopolymeric carbon in the sediments due to these compounds are consumed during their mineralization. Other processes, such as ammonification and nitrification were related with the main organic macromolecules

Key words: Laboratory mesocosm incubations, benthic chambers, biopolymeric carbon

1 INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras reciben aportes de materia orgánica alóctonos, tanto desde la atmósfera como del continente a través principalmente de escorrentías superficiales. Así mismo existen aportes autóctonos desde el propio sistema marino por transporte de unas zonas a otras, esta materia orgánica se deposita sobre los sedimentos marinos y pasa a formar parte de ellos (Sospedra, 2010).

1.1 MATERIA ORGÁNICA EN LOS SEDIMENTOS

La mayor parte del material orgánico se degrada a través de una red compleja de procesos de degradación, mientras que el material refractario restante se entierra permanentemente en el sedimento. Por lo tanto en escalas de tiempo cortas, el sedimento actúa como una fuente de carbono inorgánico y nutrientes asegurando una producción continuada en la columna de agua, pero a escalas temporales de milenios, los sedimentos representan el sumidero más importante para el enterramiento de la materia orgánica (Glud, 2005).

El carbono orgánico alcanza el lecho del mar y puede ser consumido tanto por macrofauna, microfauna o microbios. Generalmente la actividad de los distintos organismos esta acoplada por lo que los revestimientos de los organismos que se entierran o los depósitos fecales de la macrofauna representan sitios con estimulada actividad microbiana. Sin embargo, las bacterias en general son las principales responsables de la degradación del material que alcanza el lecho del mar (Glud, 2005).

En sedimentos donde la difusión del oxígeno no esté limitada, los microorganismos degradan la materia orgánica consumiendo este gas. En lugares donde la demanda excede a la tasa de suministro, la degradación ocurre mediante procesos metabólicos anaeróbicos. Estos procesos liberan NH_4^+ (amonio), S^{2-} (sulfuro) y otros iones o moléculas reducidas tóxicas (Vita et al, 2002).

A través de procesos biogeoquímicos como la mineralización la materia orgánica es transformada en nutrientes que pueden ser reincorporados a la columna de agua o bien ser inmovilizados por los productores primarios del sedimento (fitobentos, macroalgas y plantas vasculares). Es por esto que la fotosíntesis juega un importante papel en la composición de los sedimentos ya que incrementa la cantidad de materia orgánica y de oxígeno.

Existe un gran número de factores que intervienen en la disponibilidad de nutrientes en los ecosistemas costeros, como por ejemplo la radiación solar, la temperatura del agua, la actividad bacteriana, los organismos bentónicos, las propiedades físico-químicas del agua o la composición de los sedimentos, todos ellos en conjunto determinarán, en última instancia, que los sedimentos actúen como fuente (flujo positivo) o sumidero (flujo negativo) de nutrientes (Sospedra, 2010).

En las zonas someras, los flujos bentónicos de nutrientes en la interfase sedimento-agua se ven afectados por el fitobentos, ya que la radiación alcanza la superficie del sedimento, y afecta a la calidad del mismo. En zonas ricas en materia orgánica, así como en las que contienen mayor cantidad de macrofauna se produce una mayor liberación de nutrientes (Bertuzzi et al, 1997; Engelsen et al, 2008). En cambio, la presencia de fitobentos contribuye a la retención en el sedimento y puede eliminar nutrientes adicionales de la columna de agua. El acople bioquímico entre los flujos de nutrientes bentónicos y la materia orgánica es complejo, especialmente en ambientes poco profundos donde la mineralización y la producción de materia orgánica tienen lugar simultáneamente (Engelsen et al, 2008). Por esta razón, es en estas zonas donde tienen lugar la mayor parte de los procesos de mineralización de la materia orgánica y por consiguiente del ciclo de los nutrientes (Sospedra, 2010).

Una fracción importante de la materia orgánica sedimentaria corresponde a compuestos refractarios (por ejemplo, lignina y celulosa) que no pueden ser asimilados por los organismos bentónicos, y se caracterizan por bajas tasas de degradación. A la inversa, la fracción lábil de la materia orgánica sedimentaria comprende moléculas simples y/o combinadas como los biopolímeros (lípidos, carbohidratos y proteínas) que están de hecho disponibles para los organismos bentónicos y rápidamente son mineralizados. Los biopolímeros orgánicos varían más rápido que el carbono orgánico total en respuesta a los cambios espaciales y temporales en el estado trófico bentónico asociados a alteraciones ambientales tanto naturales como provocadas por el hombre. Además, varios trabajos han demostrado que los componentes (por ejemplo, biopolímeros) de la materia orgánica sedimentaria representan aproximaciones más sensibles para evaluar los diferentes tipos y niveles de presión antropogénica en los entornos costeros y estuarinos (Venturini et al, 2011).

1.2 ESTUDIO DE LOS FLUJOS EN LA INTERFASE SEDIMENTO-AGUA

La mayor actividad biogeoquímica en los sedimentos ocurre cerca de la interfase sedimento-agua y abarca unos pocos milímetros, siendo sumamente susceptible y perturbable durante el muestreo del sedimento (Viollier et al, 2003).

Existen distintas formas de abordar el estudio de los flujos en la interfase sedimento-agua: mediante estudios in situ y estudios ex situ.

Los estudios in situ consisten en la utilización de cámaras bentónicas también llamadas campanas, box o meso o microcosmos. Se trata de un aparato que encierra un área conocida de la superficie del sedimento junto con un volumen conocido de agua del fondo y que está en contacto con el mismo. Permite realizar medidas de concentraciones de solutos en el agua que están en contacto con el sedimento (mediante extracciones periódicas de alícuotas de agua o mediante medidas continuas a través del acople de distintos sensores) para estudiar la evolución de distintos

parámetros, ya que sin renovación aparente del agua, se experimentará un consumo o una liberación de los parámetros estudiados en función de los organismos presentes tanto en el agua contenida en la cámara, como en el interior del sedimento, así como en función de parámetros ambientales y químicos (temperatura, radiación o materia orgánica). Los cambios en las concentraciones de los solutos presentes en el agua encerrada a lo largo del tiempo de experimentación están sujetos a una serie de asunciones tales (Violler et al, 2003):

- Son válidas las condiciones estacionarias durante el periodo de incubación con respecto al gradiente de concentraciones entre el sedimento y la columna de agua.
- Los procesos biogeoquímicos ocurridos en la columna de agua son insignificantes comparados con los que tienen lugar en el sedimento.
- El régimen hidrodinámico dentro de las cámaras no altera el intercambio de solutos a través de la interfase sedimento-agua.
- El área muestreada es representativa de un área mucho más extensa.

La mayoría de los trabajos realizados con cámaras bentónicas in situ han sido realizados en áreas eutróficas como son las desembocaduras de ríos caudalosos como el Danubio o el Dnieper (Friedl et al, 1998), estuarios (Pratihary et al, 2009), lagunas costeras (Murray et al, 2006) o zonas de producción acuícola (Nizzoli et al, 2007; Morata et al, 2012) por lo que la producción bentónica primaria en zonas oligotróficas no es bien conocida.

Debido a la infinidad de procesos que ocurren dentro de un sistema natural y a las interrelaciones que existen entre el ambiente que los rodea y la influencia que ejercen sobre estos los procesos externos, resulta complicado poder cuantificar la importancia que tiene cada factor sobre el flujo de nutrientes, además hay que tener en cuenta que estos factores son variables a lo largo del tiempo y dependen de las condiciones del medio. Por esta razón surge la necesidad de simular unas condiciones similares a las que tendrían lugar en el medio natural con el objetivo de poder estudiar estos flujos con mayor detalle mediante el desarrollo de experimentos ex-situ.

Los estudios ex situ simulan las condiciones del medio natural y se realizan en laboratorio bajo condiciones controladas, donde se lleva a cabo la incubación del sedimento objeto de estudio en recipientes (cámaras) durante un determinado tiempo en el cual se extraen distintas alícuotas del agua incubada en contacto con el sedimento.

La mayoría de los ensayos ex situ realizados sobre sedimentos se han centrado en la macrofauna bentónica y su efecto en la bioturbación ya sea con diferentes densidades de alguna especie dominante, alóctona o de interés comercial en concreto, con

diferentes grupos funcionales de macrofauna (filtradores, excavadores, ramoneadores...), especies de macrófitas (Mermillod-Blondin et al, 2008; Mortimer et al, 1999) o con diferentes densidades de la composición habitualmente encontrada en la zona objeto de estudio. Otros autores han determinado sólo la producción primaria en función de la irradiancia en el agua (Glud et al, 2002; Spilmont et al, 2006) o la fijación de carbono por parte de las diatomeas bentónicas (Wolfstein et al, 2002) pero no se ha tratado la regulación de los flujos de nutrientes del propio sedimento en función de la composición de materia orgánica.

2 OBJETIVOS

En el presente estudio se analizó la importancia de la materia orgánica en un amplio rango de procesos como la respuesta del oxígeno disuelto y los nutrientes en la interfase sedimento-agua y la variación de moléculas orgánicas en el sedimento, bajo condiciones controladas *ex situ*. Concretamente los objetivos fueron

- Determinar los flujos de oxígeno y nutrientes en la interfase sedimento-agua mediante experimentos en condiciones controladas de laboratorio bajo distintas concentraciones y tipos de materia orgánica.
- Caracterizar la composición bioquímica de los sedimentos a incubar.
- Cuantificar la relevancia de las variaciones en la materia orgánica en el flujo de nutrientes en la interfase sedimento-agua.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Dada la complejidad del montaje y diseño de las cámaras para los ensayos, resultó necesario realizar una serie de experimentos a pequeña escala que no se contemplan en la metodología pero fueron de gran ayuda para poner en marcha los experimentos a gran escala con el objetivo de averiguar la materia orgánica óptima y el modo de añadirla al sedimento.

Los sedimentos en esta zona están formados por arenas finas bien calibradas dentro del piso infralitoral. Estos fondos al ser someros están sometidos al oleaje por lo que se ejerce un continuo movimiento hídrico que da lugar a una buena selección de los sedimentos por su granulometría (Melzer y Herzer, 2004). Las arenas finas bien calibradas están formadas en más de un 95% por un tamaño de arena comprendido entre (0,063 y 0,250 mm de diámetro de luz del tamiz). En consecuencia, estos sedimentos están bien oxigenados y más cuanto mayor es el tamaño del grano de arena.

3.1 EXTRACCIÓN Y PROCESADO DE SEDIMENTO BASE

El punto de muestreo en el que se realiza la extracción de sedimento para los experimentos se encuentra aproximadamente a 700 metros de distancia de la costa de la playa de Gandía y a 9 metros de profundidad, con coordenadas UTM 746317 4321780 30S tal como se muestra en la figura 3.1.

Durante los muestreos, con la ayuda de buzos, se extrajeron aproximadamente 110 L de sedimento repartidos en cubos de 10L.

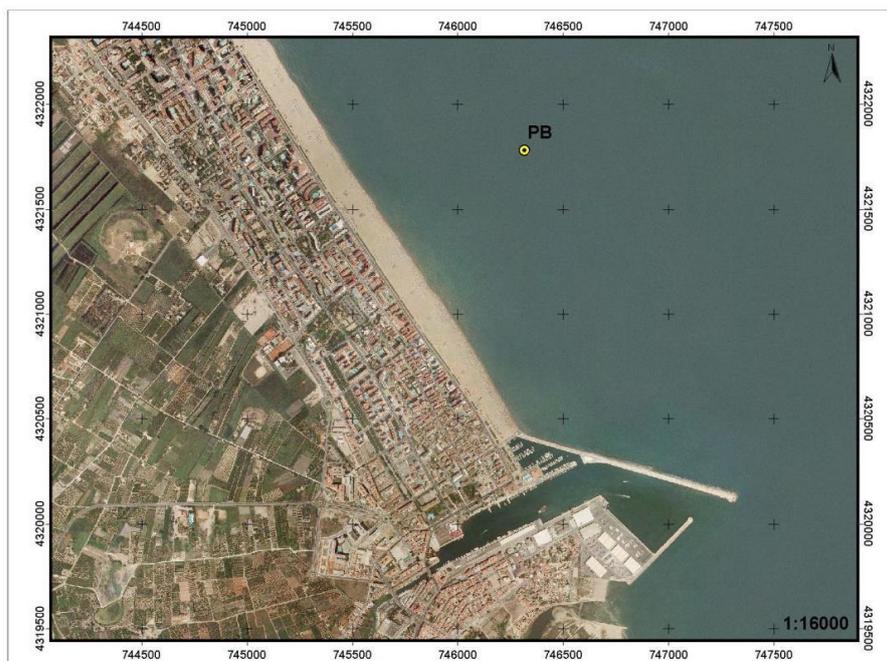


Figura 3.1: Punto de muestreo de sedimento base

Para el procesado del sedimento base fue necesario realizar los siguientes pasos:

1- Primera decantación del sedimento en los cubos de recogida para la posterior eliminación del agua sobrenadante. Esta tarea se realiza en la misma barca al momento de haberlos recogido.

2- Tamizado del sedimento en el laboratorio utilizando un tamiz con malla de 1 mm para eliminar la macrofauna y demás partículas grandes del mismo.

3- Decantación y eliminación del agua sobrenadante.

4- Se homogeniza todo el sedimento dentro de un bidón grande de plástico (de 170 l) con una pala.

5- Decantación y eliminación del agua sobrenadante.

6- Colocar por separado distintas porciones de unos 3,8 litros, volumen aproximado requerido para una cámara bentónica, en cubos de plástico y se deja reposar unos minutos para eliminar el agua sobrenadante que quede.

7- Se congela como mínimo dos semanas con el objetivo de que muera cualquier organismo o quistes de resistencia que puedan haber en el sedimento (Emmerson et al, 2001).

8- El día previo al inicio del experimento se descongela y se coloca todo el sedimento en un bidón grande de plástico para su homogeneización con una pala.

3.2 DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

3.2.1 Montaje

Se instalaron 12 cámaras con las siguientes medidas como se muestra en la figura 3.2.

Cada cámara está provista de una tapa hermética con hélice para homogeneizar el agua, y una serie de válvulas, dos de ellas servirán de entrada y salida para el circuito de agua de mar durante la etapa de aclimatación y otras dos que servirán para tomar muestras de agua y reemplazar el volumen extraído durante el ensayo para la determinación de los flujos. El sedimento alcanza una altura sobre el cilindro de unos 12 cm, mientras que el volumen restante de la cámara, durante el experimento, se encuentra ocupado por agua.

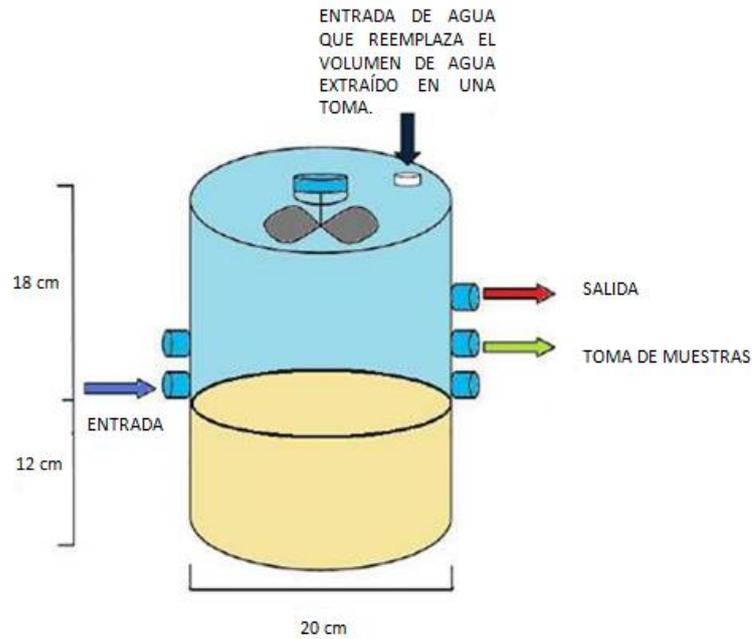


Figura 3.2: Esquema de una cámara bentónica



Figura 3.3: Instalación de las cámaras bentónicas durante la etapa de aclimatación y siembra

A continuación se muestra el esquema completo de la instalación figura 3.4, las doce cámaras conectadas al bidón que proporciona el agua de mar así como los bidones de salida donde se recoge el agua desechada. La circulación del agua se consigue con la ayuda de dos bombas peristálticas reguladas para que entre las dos aporten un caudal de 135 l/día al total de las cámaras, equivalente a renovar el agua 3 veces/día en cada cámara. Las bombas trabajan en discontinuo para aportar la suficiente presión en los

tubos de distribución y garantizar un adecuado reparto en cada una de las cámaras a través de los goteros autocompensantes.

Las cámaras de incubación se ubicaron en una cámara termostatazada a temperatura constante de aproximadamente unos 19°C que se corresponde con la temperatura media anual para el mar Mediterráneo en la costa suroeste de España (Mayer et al, 2012). Las cámaras permanecieron en oscuridad durante el ensayo, mientras que, durante la aclimatación, se siguió un fotoperiodo con 12 horas luz/ 12 horas oscuridad.

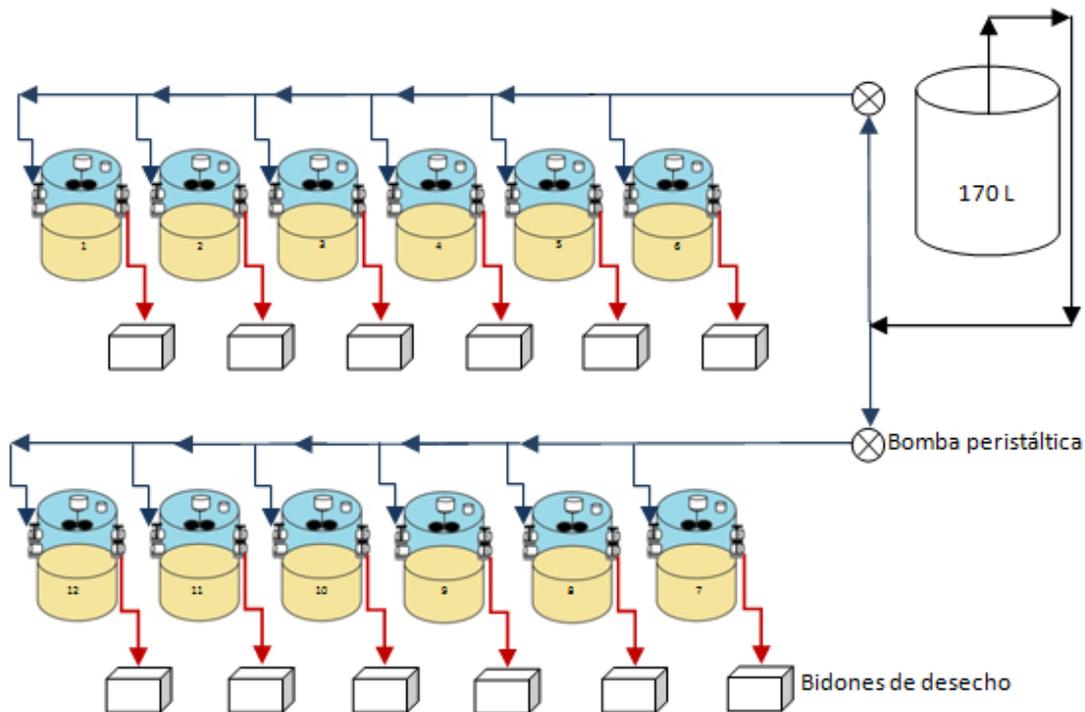


Figura 3.4: Esquema de la instalación

3.2.2 Aclimatación

Primero fue necesario colocar el sedimento en cada cámara de incubación. El sedimento base es mezclado con una determinada cantidad de materia orgánica que varía en función del experimento y de la concentración deseada en cada cámara. La materia orgánica se añadió sólo en los 4 cm superficiales de sedimento de cada cámara de incubación. Se optó por este método tras comprobar en múltiples pruebas que la adición a través de la columna de agua generaba pérdidas de materia orgánica imposibles de cuantificar. Las concentraciones utilizadas en cada ensayo fueron fruto de los resultados obtenidos en experimentos a pequeña escala, que de algún modo permitieron ajustar las concentraciones de materia orgánica de partida (iniciales) y de esta forma impedir que el sedimento entrase en anoxia antes de que finalizase el ensayo.

En las cuatro cámaras control se vertió el sedimento base hasta la altura de 12 cm mientras que en las 8 cámaras restantes sólo se añadió 8 cm de sedimento base. De estas 8 cámaras, a 4 de ellas, que fueron las de Concentración Baja, se les adicionó, 4 cm de sedimento mezclado con materia orgánica al que se le añadió una concentración media de materia orgánica y a las 4 cámaras restantes, que fueron las de Concentración Alta, se les adicionó 4 cm de sedimento base mezclado con una alta concentración de materia orgánica. Se nivelaron y compactaron ligeramente con un émbolo lo mejor posible.

Una vez preparado el sedimento en las respectivas cámaras se llenaron lentamente mediante bomba peristáltica con un caudal total de 135L/día con agua de mar sin filtrar hasta la altura de evacuación por gravedad para sembrar el sedimento, es decir, poner en contacto el sedimento con los microorganismos presentes en el agua de mar. Este proceso de llenado tardó unas 7-8 horas, de esta forma se evitó la resuspensión y alteración de los primeros centímetros del sedimento. A cada cámara se le colocó un aireador en el agua para asegurarnos de que existiera una elevada concentración de oxígeno además de impedir una posible anoxia. Una vez llena cada cámara, se continuó circulando agua de mar sin filtrar durante 48 horas para la completa aclimatación y siembra del sedimento.

Tras el proceso de aclimatación del sedimento, se circuló agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV. Este proceso se prolongó por un período de 24 horas más. De este modo nos aseguramos que los posibles cambios que se observen durante el ensayo para la determinación de los flujos sean una consecuencia de cambios en el sedimento y no en el agua. Finalmente se retiraron los aireadores de cada una de las cámaras.

3.2.3 Ensayo para la determinación de los flujos

Tras la etapa de aclimatación las cámaras ya estaban preparadas para comenzar el ensayo, en este momento se interrumpió el fotoperiodo y se establecieron condiciones permanentes de oscuridad para evitar procesos de proliferación de algas unicelulares que pudiesen aportar o eliminar determinados compuestos y alterar el ensayo.

El ensayo se realizó sobre 9 cámaras siendo 3 control sin adición de materia orgánica, 3 con concentración baja de materia orgánica y 3 con una concentración alta, las 3 restantes fueron apartadas y no se les realizó ningún ensayo ya que fueron utilizadas para la toma de sedimento y conocer así las condiciones iniciales.

En este momento se cerraron las válvulas de salida de agua de todas las cámaras, se les colocó una tapa hermética provista con una hélice para poder homogeneizar el agua antes de cada toma, y se llenaron completamente asegurándonos que no quedaran burbujas de aire atrapadas en el agua, véase figura 3.5:



Figura 3.5: Muestra una cámara de incubación durante el ensayo, donde se puede observar la jeringa instalada en la tapa a través de la cual se restituye el volumen de agua extraído en cada muestreo.

La duración del ensayo fue de aproximadamente 8 horas, durante las cuales se extrajeron muestras de agua incubada cada hora para ver como variaba la concentración de cada parámetro en función del tiempo. El intervalo de tiempo analizado podía variar en función de la velocidad a la que disminuía el oxígeno disuelto, ya que valores inferiores a 1,5 mg/L en agua indican que las tasas de oxidación aerobia han disminuido y que las bacterias anaerobias pueden comenzar a actuar (Clark, 2002).

Previo a la extracción de cada muestra se homogeniza el agua mediante el uso de la hélice instalada en la tapa de cada una de las cámaras, a una velocidad constante de 10 giros/ 15-20 segundos para evitar que se formen gradientes de concentración. La extracción de agua se realizó mediante el empleo de 3 jeringas durante un periodo aproximado de unos 30 segundos cada una y al mismo tiempo que era extraído un volumen de agua incubada, éste era reemplazado por agua de mar filtrada de calidad conocida. Las jeringas para extracción son acopladas en una de las aperturas de la cámara, representada en la figura 3.2 por la flecha verde, y la de reemplazo de agua en la tapa como se muestra en la figura 3.5, se abren tanto la válvula de entrada como la de salida consiguiéndose de este modo que no entre aire en la cámara que falsearía así los niveles de oxígeno que pretenden medirse en el experimento.

Debido al hecho de que durante la toma de muestras el agua extraída fue reemplazada por otra cuya calidad era conocida, se debió corregir los valores obtenidos en cada extracción por el efecto de dilución que provoca la adición de agua de mar filtrada, la fórmula para calcular la concentración es la siguiente:

$$n_0 = C_0 * V \quad (1)$$

$$n_1 = n_0 + (C_1 - C_0) * V - C_{e1} * V_{e1} + C_{s1} * V_{s1}$$

$$n_2 = n_1 + (C_2 - C_1) * V - C_{e2} * V_{e2} + C_{s2} * V_{s2}$$

$$n_3 = n_2 + (C_3 - C_2) * V - C_{e3} * V_{e3} + C_{s3} * V_{s3}$$

$$n_4 = n_3 + (C_4 - C_3) * V - C_{e4} * V_{e4} + C_{s4} * V_{s4}$$

Donde;

n = moles en cada tiempo.

C = concentración.

V = Volumen incubado, aproximado 3,8L.

C_e y V_e = concentración y volumen que entra en cada tiempo.

C_s y V_s = concentración y volumen de salida.

Así se restituye los moles que se insertan y los que se extraen, obteniendo la concentración en el interior de la cámara en el supuesto de que no hubiera ni entradas ni salidas de agua.

Los flujos fueron calculados a partir de la variación de concentraciones para cada nutriente analizado según de Freitas (2006). Para ello se ajusta una función lineal, a cada serie de valores de concentraciones para cada parámetro analizado a lo largo del tiempo en ensayo y se aplica la ecuación de Hargrave y Connolly:

$$F = (C_t - C_0) * 1/(A*t) * V * 24 = \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{d}^{-1} \quad (2)$$

Donde:

V es el volumen en litros del agua incubada en el interior de la cámara.

C_0 y C_t (en μM) son las concentraciones del nutriente para el tiempo inicial y final de la incubación calculado a partir de la función de ajuste.

t (en horas) es el tiempo transcurrido entre el inicio y fin de la incubación.

A (en m^2) es el área de sedimento encerrada dentro de la cámara = $0,031 \text{ m}^2$.

3.2.4 Toma de muestras de sedimentos de las cámaras

Las muestras de sedimento se extraen al final del ensayo en las 9 cámaras bentónicas (3 control, 3 bajas y 3 altas) en las que se realizó el ensayo para la determinación de los

flujos, pero también se realizó una toma de muestras de sedimentos en tres de las cámaras (1 control, 1 baja y 1 alta) en las que no se realizó el ensayo y que sirvieron para conocer los niveles iniciales de cada tipo de cámara antes del ensayo y por tanto poder disponer de mayor información.

3.3 TIPOS Y NIVELES DE MATERIA ORGÁNICA ENSAYADOS EN LOS EXPERIMENTOS

Se trabajó con dos tipos diferentes de materia orgánica: pienso y mejillones más fitoplancton. Para el cálculo de la masa en gramos de Materia Orgánica (MO) a añadir en los 4 cm superficiales de sedimento húmedo primero se establece el porcentaje de MO con el que deseamos trabajar y luego se calcula la masa de MO a añadir que representa dicho porcentaje. Esta masa se obtiene a través del peso seco que ocupa el sedimento en 4 cm y para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$P_{MO} = (P_{sed\ seco} * \% MO) / (100 - \% MO) \quad (3)$$

Donde:

P_{MO} peso de la MO a añadir en g.

$P_{sed\ seco}$ peso del sedimento seco que ocupan los 4 cm superficiales en la cámara (g).

$\% MO$ es el porcentaje de materia orgánica a añadir para cada tratamiento.

3.3.1 Pienso

La fuente de materia orgánica consistió en pienso extruido especialmente diseñado como alimento en piscifactorías para alevines de doradas.

Características del pienso utilizado

- Diámetro 2 mm
- Pienso completo para dorada y lubina desde los 40 a 100 g de peso vivo.
- Constituyentes analíticos: Proteína bruta 42,00%, cenizas brutas 9,00%, celulosa bruta 2,00%, materias grasas brutas 21,00%, fosforo 0,9%.
- Aditivos: Vit A 10000 UI/Kg, Vit D3 1700 UI/Kg, Vit E (alfa tocoferol) 200 UI/Kg, Cobre (sulfato de cobre penta-hidratado) 8 mg/kg, Antioxidantes (etoxiquina +BHT).

Para el experimento se establecieron tres concentraciones diferentes, control, baja y alta con una concentración de materia orgánica de:

CONTROL: sólo sedimento base (0% MO añadida)

BAJA: 0,9% de MO añadida

ALTA: 1,8% de MO añadida

Se añaden 18,93 g de pienso a 2764 g de sedimento húmedo (es lo que ocuparían los 4 cm superficiales) para obtener un % de pienso del 0,9 que correspondería a las cámaras con una concentración de materia orgánica “Bajas”

Se añaden 38.21 g de pienso a 2764 g de sedimento húmedo (es lo que ocuparían los 4 cm superficiales) para obtener un % de pienso del 1.8 que correspondería a las cámaras con una concentración de materia orgánica “Altas”

Como se necesitan 4 cámaras para cada nivel de MO los valores antes calculados se multiplican por 4 y se preparan de forma conjunta para asegurarnos una calidad homogénea para cada nivel.

3.3.2 Mejillones y fitoplancton

Para el segundo experimento la materia orgánica procede de una mezcla de mejillones y fitoplancton, al igual que en el anterior se diferencian tres cámaras control, tres cámaras con una concentración baja y otras tres con concentración alta con los valores que se muestran a continuación:

CONTROL: sólo sedimento base (0% MO añadida)

BAJA : 1,5 % de MO añadida

ALTA : 2,5% de MO añadida

La composición de la MO en las cámaras bajas fue de 50 ml concentrado de fitoplancton + 25,3 g de mejillón seco referenciado a sedimento seco y en las cámaras altas de 100 ml concentrado de fitoplancton + 42,5 g de mejillón seco referenciado a sedimento seco.

El fitoplancton cultivado en laboratorio es concentrado mediante sedimentación durante unas 3-4 horas. Luego se elimina el agua lentamente con un tubo y posteriormente es recogido y congelado en frascos de plástico por separado para cada siembra. A continuación se descongelan todos los frascos (3 horas fuera del congelador), se mezclan todos en un recipiente de 2 litros y se agitan con agitador magnético a 400 rpm. Se tamiza con tamiz de 1mm de luz de malla y con una pipeta, sumergiéndola a 1 cm del fondo y sin parar de agitar, se extrae y se reparten en tubos de plástico de 12 ml fracciones de 10 ml de fitoplancton cultivado y se vuelven a congelar. La concentración final de clorofila en estos tubos fue de 66,48 mg m⁻³.

Para la preparación de los mejillones frescos se separó la concha de la carne, la carne se secó en estufa a 80°C. Una vez secos se machacaron y trituraron con mortero hasta obtener unos granos homogéneos menores de 1 mm que se separaron con el empleo de un tamiz de 1 mm de luz de malla. Para el ensayo los gramos de mejillón correspondiente para las cuatro cámaras de cada nivel de materia orgánica fueron homogeneizados con el sedimento base.

Tanto los mejillones como el fitoplancton añadidos se mezclan con el sedimento base y se añaden en los 4 cm más superficiales.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

- **3.4.1. Aguas**

- **Amonio (NH_4^+)**

La muestra debe ser filtrada previamente a través de membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm . Se conserva a 4°C y se realiza su determinación antes de 24 horas. Su determinación se basa en la reacción de Berthelot. En medio alcalino el amonio disuelto (NH_4^+) reacciona con el hipoclorito formando una monocloramina. Este compuesto, en presencia de fenol, y un exceso de hipoclorito da lugar a la formación de azul de indofenol proporcional a la cantidad de amonio que podremos determinar colorimétricamente. El ion nitroprusiato cataliza la reacción. La adición de citrato trisódico elimina la interferencia de Ca y Mg (Solòrzano, 1969 en Baumgarten et al, 1996).

- **Nitrato + Nitritos ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$)**

Descrito en Baumgarten et al (1996). Los nitratos son reducidos hasta nitritos empleando una columna rellena de cadmio y una solución cúprica lo que se conoce, como la reacción de Griess, que serán leídos, junto los nitritos originales, en espectrofotómetro a 543nm previa adición de sulfanilamida y etilendiamina. El límite de detección se sitúa en 0,1 μM .

- **Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID)**

- Se obtiene a partir de la suma de amonio más nitratos más nitritos.

- **Fósforo Soluble Reactivo (PSR)**

Se midió siguiendo el método de Murphy y Riley (1962) que consiste en provocar la formación de un complejo fosfomolibdico de color azul mediante la adición de molibdato amónico en medio ácido. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan con el ortofosfato en un medio ácido para formar un complejo de fosfomolibdato de antimonio, el cual es reducido a azul de molibdeno por el ácido ascórbico.

- **Sílice (Si)**

Se basa en la reacción entre el molibdato amónico y el ácido ortosilícico según Strickland y Parson (1972). El silicio disuelto reacciona con el molibdato de amonio en medio ácido formando un complejo amarillento que a su vez, con la adición de una mezcla reductora de metolsulfito, se reduce a ácido silicomolibdato reducido, un complejo azul, cuya absorción máxima la alcanza a 810 nm. El límite de detección está en 0,1 µM.

- **Oxígeno disuelto (O.D)**

Se determinó siguiendo el método iodométrico clásico de Winkler (Baumgarten et al, 1996) el cual consiste en la adición de sulfato de manganeso y yoduro alcalino de potasio. El sulfato de manganeso junto con el yoduro alcalino y en contacto con el oxígeno disuelto del agua forma un precipitado marrón de $Mn(OH)_3$. Luego con la adición de ácido, el Mn^{+3} presente en el precipitado marrón se reduce de nuevo a Mn^{+2} oxidando al mismo tiempo aniones de yoduro (I^-) a I_2 en una cantidad idéntica a la de oxígeno presente en un principio en la muestra de agua. Finalmente, este yodo es titulado con una solución de tiosulfato de sodio. Para las muestras de la columna de agua.

3.4.2 Sedimentos

Todos los parámetros analizados en sedimentos fueron determinados por triplicado.

- **Materia orgánica**

El contenido en materia orgánica se determinó con el método de calcinación a 600 °C con eliminación de carbonatos (Dell'Anno et al, 2002). Se deseca una muestra de unos 4 gramos a 100-105°C, se pesa con precisión y se mezcla con 50 ml de ácido clorhídrico al 5% (v/v), manteniendo en contacto unos 15 minutos para eliminar los carbonatos de la muestra. Transcurrido este tiempo, se filtra la muestra, sobre un filtro sin cenizas desecado y tarado previamente, añadiéndole poco a poco un volumen de unos 100 ml de ácido clorhídrico 5%, hasta conseguir limpiar todo el recipiente donde estaba contenida la muestra. El filtro se introduce dentro del crisol y se deseca a 105°C durante 24 h. A continuación se pesa el crisol y se lleva a calcinar en la mufla a 600°C durante una hora. Se vuelve a pesar y se calcula el contenido de Materia Orgánica.

$$\% \text{ MO} = ((b - c) / a) * 100 \quad (3)$$

Donde,

a = peso de la muestra seca en gramos (g),

b = peso tras estar a 105°C en gramos (g),

c = peso tras estar a 600°C en gramos (g).

- **Proteínas (PRT)**

Según Hartree (1972) modificado por Rice (1982) en Pusceddu et al (2004).

Método colorimétrico que permite la reacción de proteínas con tartrato rameico y el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico (pH=10) La reacción proporciona una coloración azul estable que es intensamente proporcional a la concentración de proteínas en la solución.

- **Carbohidratos (CHO)**

Según Dubois et al (1956) optimizado para sedimentos por Gerchacov y Hatcher (1972) en Pusceddu et al (2004). El ensayo colorimétrico está basado en la reacción entre azúcares y fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado. El método es no específico y permite concentraciones de carbohidratos totales, incluidos celulosa.

- **Lípidos (LIP)**

Se realiza según Bligh y Dyer (1959) y Marsh y Weinstein (1966) en Pusceddu et al (2004) cuya concentración viene expresada en equivalentes de tripalmitina.

- **Compuestos Biopoliméricos del Carbono (BPC)**

El contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos en el sedimento es convertido a equivalentes de C utilizando un factor de conversión de 0,40, 0,49, 0,75mg C *mg⁻¹ respectivamente cuya suma viene definida como Compuestos Biopoliméricos del Carbono (Fabiano et al, 1995).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO REALIZADO

El análisis estadístico se realizó con el programa Stat Graphics Centurion XVI, utilizando un análisis de correlaciones de Pearson a un nivel de confianza del 95%, ya que como se comprobó los datos seguían una distribución normal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FLUJOS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL SEDIMENTO EN EL EXPERIMENTO REALIZADO CON PIENSO

En la Figura 4.1 y tabla 4.1 se muestran los flujos de OD, NID, PSR y Si obtenidos en el ensayo realizado con pienso.

En el caso del OD los flujos siempre fueron negativos indicando un consumo de oxígeno por el sedimento. Las cámaras altas mostraron flujos más negativos que las bajas y éstas que las controles debido a que la descomposición de la materia orgánica conlleva un consumo de oxígeno en el cual los organismos heterotróficos utilizan esta molécula como aceptor final de electrones (Morata et al, 2012). En la gráfica se observa un patrón claro, donde el consumo de oxígeno va aumentando conforme aumenta la carga orgánica en la cámara.

El NID no muestra un patrón claro, puesto que en las cámaras controles y altas, la dirección del flujo fue positiva indicando así que se está generando algún compuesto de N inorgánico, mientras que en las bajas fue negativa sugiriendo un consumo por parte del sedimento. Los flujos positivos de NID se debieron tanto a flujos positivos de amonio como flujos positivos de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ (con la excepción de alta 2 y control 1). La materia orgánica al descomponerse libera NH_4^+ (amonificación), siendo posible en presencia de oxígeno, la nitrificación de este compuesto a NO_2^- y NO_3^- (Herbert, 1999). En el caso del flujo negativo en las cámaras bajas se observó que éstos fueron el resultado de mayores flujos negativos de amonio que positivos de nitritos más nitratos, indicando que el posible proceso producido podría haber sido el anammox donde el NH_4^+ es consumido junto con $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ formando como producto final N_2 (g) (Nedwell et al, 1999). Este es un proceso anaerobio llevado a cabo por bacterias quimioautotróficas para la obtención de energía, por lo que podría haberse producido en capas subsuperficiales del sedimento.

Los flujos de PSR obtenidos fueron negativos, indicando un leve consumo de fósforo ya que los valores fueron próximos a cero. Si bien en la mineralización de la materia orgánica se produce como producto final PSR, no hubo una liberación de este compuesto por parte del sedimento, ya que podría haberse quedado adsorbido en la capa más superficial oxigenada de los sedimentos (Nedwell et al, 1999). Con estos valores tan bajos no es posible discutir el patrón que siguen los resultados debido a que las diferencias existentes entre ellos pueden ser despreciables.

Los flujos de Si fueron negativos, indicando también un consumo, aunque también bajo, en el sedimento analizado con valores medios de las cámaras control, baja y alta muy próximos entre sí. Estos flujos pudieron ser consecuencia de que el Si presente en el agua pudo precipitar formando sílice mineral suspendida o a que el Si pudo ser absorbido por las diatomeas del fitobentos que pudieron haber crecido durante la fase

de aclimatación del experimento. Según Longphuir et al (2009) todavía no está clara la dinámica de la absorción de ácido silícico por parte de las diatomeas bentónicas, es decir si la asimilación del ácido silícico, se realiza durante el período diurno cuando parte de la biomasa se concentra en la superficie de los sedimentos, en la oscuridad, una vez que han migrado al interior del sedimento, o continua e independientemente de su posición en la superficie o interior del sedimento. Por lo tanto si bien los experimentos se realizaron en condiciones de oscuridad, es posible que se hubiera producido la asimilación de Si por parte del fitobentos.

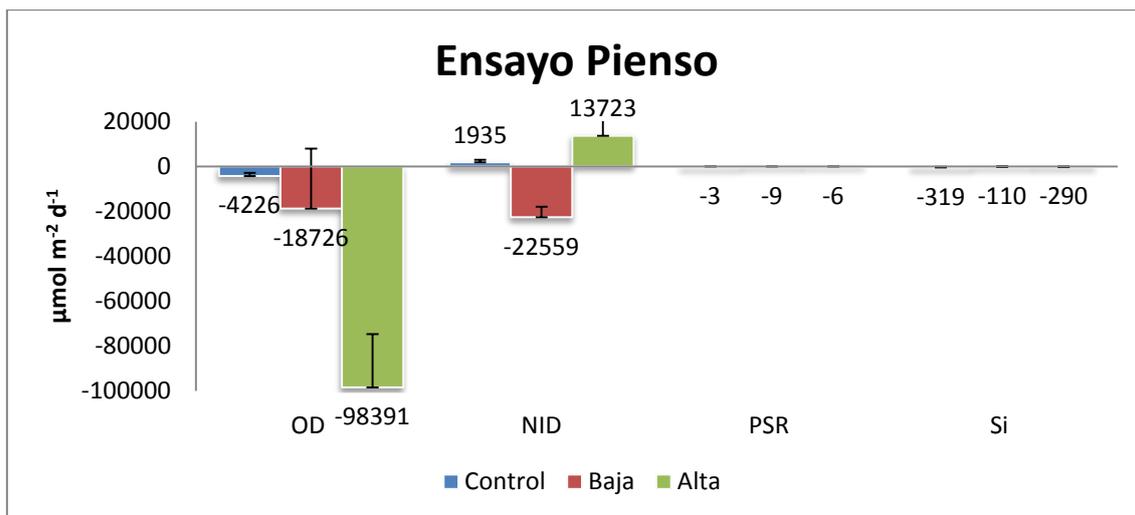


Figura 4.1: Flujos de OD, NID, PSR y Si medidos en las cámaras control, bajas y altas del ensayo pienso (se muestra la media de cada tipo de cámara con su desviación estándar).

El análisis estadístico de los flujos de OD, NID, PSR y Si no muestra ningún tipo de relación entre ellos, únicamente se detectó relación entre el OD y algunas de las moléculas orgánicas que se comentan a continuación.

En todos los sistemas marinos, el compartimento bentónico recibe, con intensidad y duración variable, entradas discretas de materia orgánica desde los ambientes pelágicos. Una vez dichas entradas se depositan en el fondo del mar pueden actuar como biorreactores o formar depósitos de detritus orgánico al quedar enterradas. La producción fotosintética in situ, la advección lateral del carbono y la utilización bentónica son procesos integrados espacial y temporalmente, que pueden ser considerados como “registros” de los procesos bióticos ocurridos en la capa de agua del fondo en contacto con el sedimento. En sistemas marinos costeros poco profundos los dominios pelágicos y bentónicos están íntimamente ligados, por lo que cambios en el estado trófico debido a entradas alóctonas de nutrientes pueden ser investigados en términos de respuesta bentónica (Pusceddu et al, 2004).

En la figura 4.2 se muestran los datos de materia orgánica obtenida en cada una de las cámaras control, alta y baja. Los valores de materia orgánica finales (MO f) son los obtenidos tras realizar el ensayo en cada una de las 9 cámaras analizadas. Los valores

de materia orgánica inicial (MO i) proceden de las restantes 3 cámaras que fueron retiradas al inicio del ensayo con el objetivo de tener unos valores iniciales de referencia del sedimento para cada tipo de cámaras (control, baja y alta).

En la figura 4.2 se observa que el valor promedio de la MO f de las cámaras control fue menor que el de las bajas y éste a su vez que el de las altas (1.2, 1.3 y 1.7% en control, bajas y altas respectivamente) aumentando con respecto a la cantidad de pienso añadido en el momento previo a la etapa de aclimatación.

Al comparar los valores iniciales con los finales de cada tipo de cámara, se observó que en la cámara control el nivel inicial (0.7%) fue menor que el promedio de las finales (1.2%), mientras que para las bajas y altas las concentraciones iniciales (1.6 y 1.8% respectivamente) fueron mayores que las finales (1.3 y 1.7% respectivamente). Si bien lo esperado era que los niveles de materia orgánica al final del ensayo fuesen menores que los valores iniciales, debido a los procesos de descomposición de la materia orgánica, se observó, en el caso de los controles, que los valores finales medidos fueron mayores que los iniciales. Esto probablemente es debido a que la concentración inicial no fue medida en la misma cámara, sino que se tomó, como representativa de las concentraciones iniciales, en una cuarta cámara en la que no se realizó el ensayo y también a la variabilidad que hubo dentro de cada tipo de cámaras.

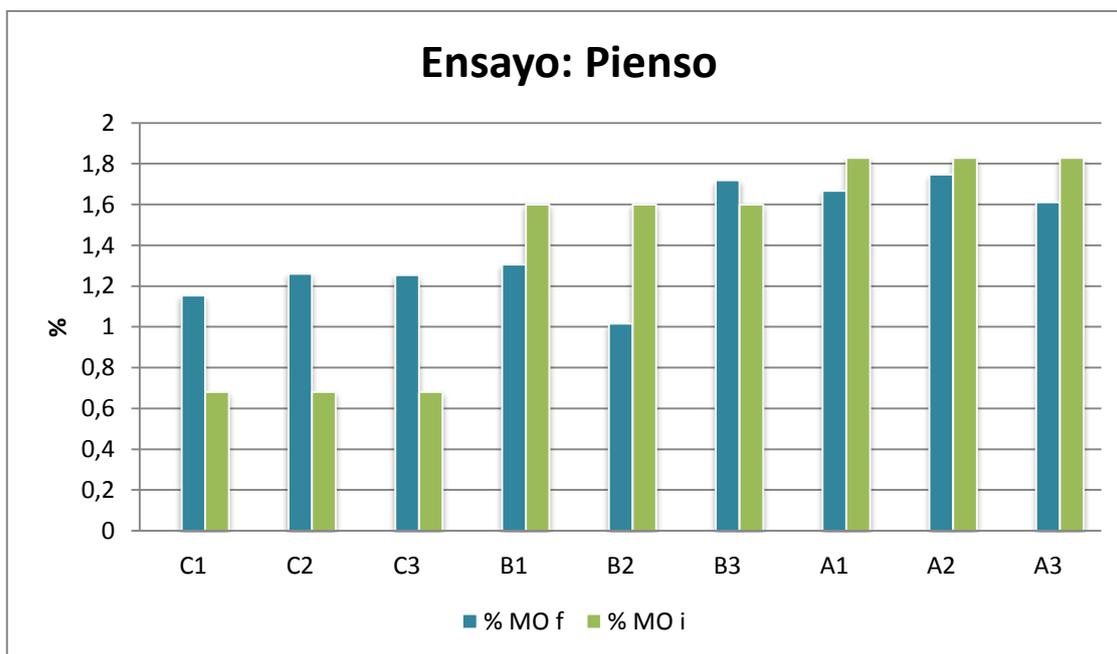


Figura 4.2: Materia Orgánica de la cámara control, baja y alta inicial con la media de las 3 cámaras control, baja y alta finales.

La materia orgánica en sedimentos marinos se compone de compuestos lábiles y refractarios, cuya concentración relativa cambia en función de la dimensión de los procesos: origen, degradación, utilización, transformación, acumulación y exportación. Los componentes orgánicos refractarios (ej, ácidos húmicos y fúlvicos y carbohidratos

estructurales como la celulosa) a menudo representan una fracción relevante de detritus orgánico sedimentario y dado que resisten la descomposición, tienden a acumularse en el sedimento. La fracción lábil de la materia orgánica sedimentaria está compuesta de moléculas simples (aminoácidos libres y monosacáridos) o combinadas y biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos, los cuales, junto con ciertos polisacáridos y lípidos, pueden ser considerados en conjunto como la fracción orgánica de carbono más rápidamente disponible para los consumidores bentónicos (Pusceddu et al, 2004).

La figura 4.3 muestra la concentración de las moléculas orgánicas analizadas en las diferentes cámaras. En general en los controles los valores fueron muy bajos, mientras que en las cámaras bajas los niveles fueron medios y en las altas mayores.

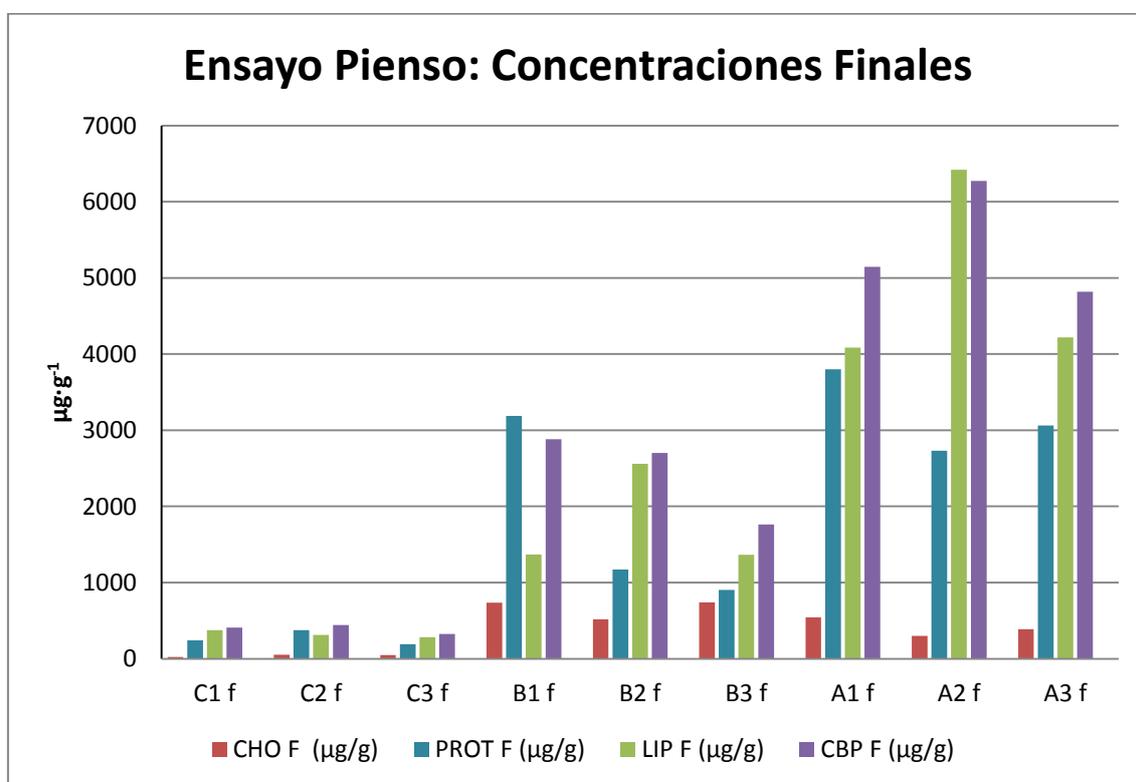


Figura 4.3: Concentraciones finales de carbohidratos, proteínas, lípidos y Compuestos Biopoliméricos analizados en las 3 cámaras control, 3 bajas y 3 altas, mostrando los valores de forma individual.

Los carbohidratos (CHO) son compuestos formados en su mayor parte por átomos de carbono e hidrógeno y, en una menor cantidad, por oxígeno. Pueden ser monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos y constituyen una abundante proporción del material biológico particularmente en el reino vegetal. Los polisacáridos se encuentran como unidades de soporte en el tejido esquelético (celulosa, pectina, quitina) o sirven como depósito de energía, por ejemplo en semillas (el almidón). Aunque los polisacáridos son mayormente insolubles en agua, ellos son fácilmente convertidos a pentosas y hexosas solubles por hidrólisis y por lo tanto en el

ambiente sedimentario tendrán un destino a corto plazo similar al de las proteínas (Rullkötter, 2006).

Los CHO (figura 4.3) mostraron valores muy bajos en las cámaras controles ($42 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de promedio), mientras que en las cámaras bajas y altas los niveles fueron mayores pero similares entre ellas. El promedio de CHO fue ligeramente más elevado en las bajas que en las altas, siendo de $663 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $411 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente. Los valores promedio no muestran la tendencia que cabría esperar puesto que cuanto mayor sea la cantidad de materia orgánica añadida a las cámaras mayor debería haber sido la concentración obtenida en los análisis. Es evidente que los niveles hallados en bajas y altas fueron claramente mayores que en los controles sugiriendo que el pienso añadido contenía CHO, pero es probable que en la aclimatación de las cámaras parte de las moléculas más rápidamente biodegradables desaparecieran quedando aquellas más refractarias.

Al comparar los valores iniciales de CHO (fig. 4.4) con los finales de cada tipo de cámara (fig. 4.3), se observó que los iniciales ($108 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ control, $746 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bajas y $873 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ altas) siempre fueron mayores que el promedio de las finales (42 , 663 y $411 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para control, baja y alta). Esto concuerda con lo esperado ya que parte de los carbohidratos representan la fracción más lábil de la materia orgánica presente en la superficie del sedimento siendo uno de los primeros en verse sometidos a mineralización (Venturini et al, 2011).

En este estudio se observó una correlación estadísticamente significativa, entre los flujos de OD y el consumo de CHO (diferencia entre las concentraciones finales e inicial de cada tipo de cámara) de $-0,7087$ indicando que la mineralización de los CHO afecta directamente a la dinámica del oxígeno.

Las proteínas son generadas en las células vivas durante la biosíntesis, cuando la información genética es transcrita en secuencias de aminoácidos. Estas macromoléculas varían ampliamente en el número de aminoácidos y por lo tanto en el peso molecular y representan la mayor parte de los compuestos ligados a nitrógeno en las células y sirven para diferentes funciones como catalizadores de reacciones bioquímicas y formación de estructuras esqueléticas (por ejemplo; conchas, fibras, moluscos). Durante la sedimentación de los organismos en descomposición, los ácidos nucleicos y las proteínas son rápidamente hidrolizados químicamente o enzimáticamente en unidades más pequeñas solubles en agua (Rullkötter, 2006).

En el gráfico 4.3 se observa que las proteínas analizadas mostraron los niveles más bajos en las cámaras control (promedio $270 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) seguidas por las bajas (promedio $1754 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y finalmente las altas (promedio $3199 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), siguiendo el patrón esperado debido a que cuanto mayor fue la cantidad de materia orgánica añadida a cada tipo de cámara, mayor fue la concentración obtenida en los análisis. Hay que

resaltar que existió una gran variabilidad en los niveles hallados en las cámaras bajas (baja 1 dio valores ligeramente superiores a los obtenidos en las cámaras alta 2 y alta 3).

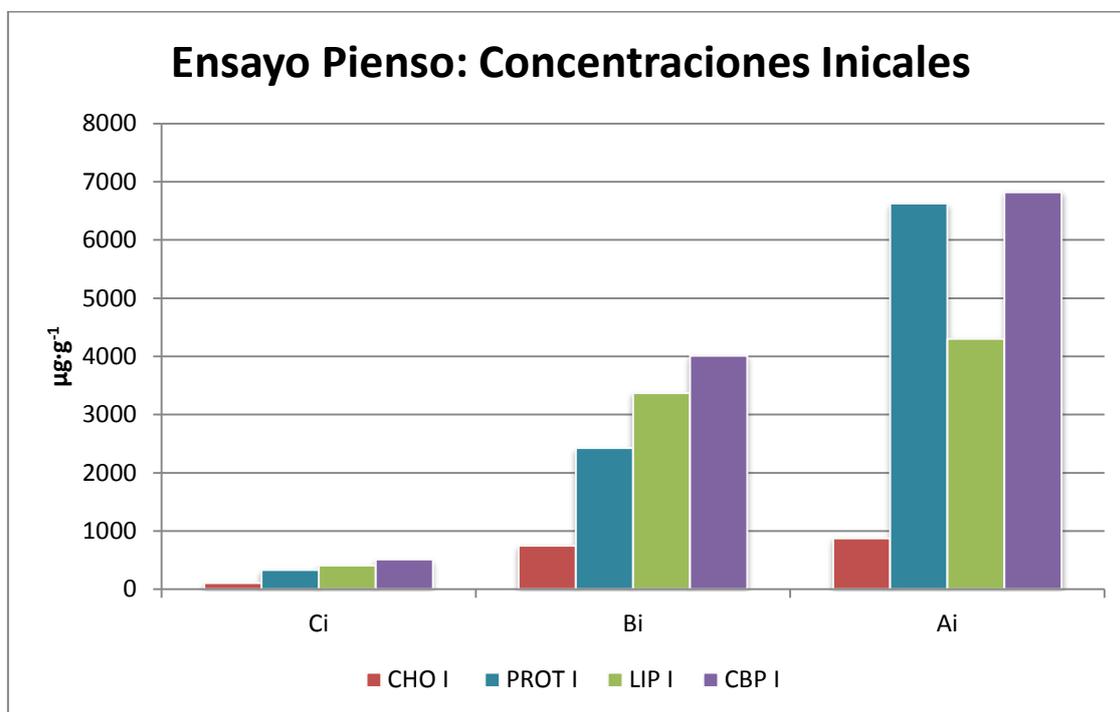


Figura 4.4: Concentraciones iniciales de Carbohidratos, Proteínas, Lípidos y Compuestos Biopoliméricos presentes en la cámara control, baja y alta.

Al comparar los valores promedio finales obtenidos con los iniciales (fig. 4.4) se vuelve a repetir el patrón esperado ya que los valores iniciales de las cámaras control, baja y alta (329, 2426 y 6625 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente) fueron superiores a los finales (270, 1754 y 3199 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente).

En el análisis estadístico se detectó una relación entre los niveles finales de PRT hallados en cada cámara y los flujos de OD (-0,8841) y entre el consumo de PRT (diferencia entre finales e inicial de cada tipo de cámara) con los flujos de OD de -0,7375 indicando que la mineralización de los PRT afecta al consumo de oxígeno. Sin embargo no se observó ninguna correlación entre los niveles de PRT y los flujos de NID medidos en el experimento.

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas (la mayoría biomoléculas) compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Tienen como característica principal el ser hidrófobas (insolubles en agua) y solubles en disolventes orgánicos. Los lípidos cumplen funciones diversas en los organismos vivos, entre ellas la de reserva energética (como los triglicéridos), la estructural (como los fosfolípidos de las bicapas) y la reguladora (como las hormonas esteroideas).

Los lípidos mostraron una tendencia clara (fig. 4.3) para cada tipo de cámaras, con un valor promedio de $324 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en las control, $1765 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en las bajas y $4908 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ las altas. Se observó los niveles más bajos en las cámaras control seguidas por las bajas y finalmente altas, siguiendo el patrón esperado debido a que cuanto mayor fue la cantidad de materia orgánica añadida a las cámaras mayor fue la concentración de lípidos obtenida en los análisis.

Al comparar los valores iniciales (fig. 4.4) con los finales (fig. 4.3) se observó que las iniciales de control y baja (407 y $3366 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente) fueron mayores que los promedios de estos tipos de cámara (324 , $1765 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente), sin embargo para las altas el valor inicial fue menor ($4300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) que el promedio de los finales ($4908 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Se asumió que las condiciones observadas en las cámaras iniciales fueron iguales a las existentes en las cámaras finales tras el ensayo pero no necesariamente fue así ya que existió una importante variabilidad dentro del grupo de cámaras, debido a la carga de materia orgánica y a las condiciones que pudiesen darse dentro de cada cámara durante la etapa de aclimatación.

En el caso de los lípidos, a diferencia de CHO y PRT, no hubo una relación estadística entre Flujos de OD y el consumo de estos compuestos (diferencia entre lípidos finales e iniciales), pero si se observó una relación entre los niveles finales de LIP hallados en cada tipo de cámaras y los flujos de OD ($-0,8007$). Esta relación indica también que la mineralización de los LIP afecta al consumo de oxígeno pero no de una forma tan clara como en el caso de PRT y CHO.

Los compuestos biopoliméricos del carbono orgánico (CBP) están compuestos por la suma de las tres moléculas orgánicas analizadas en este estudio (proteínas, carbohidratos y lípidos) una vez han sido convertidos a equivalentes de carbono (véase metodología).

En la figura 4.3 se observa que las concentraciones finales de CBP de las cámaras control fueron muy similares entre sí, si bien la variabilidad en bajas y altas fue mayor. El promedio de las cámaras control fue de $392 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que en las bajas fue de $2448 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y en las altas de $5413 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Se observa cómo su concentración aumenta, como era de esperar, con la concentración de materia orgánica añadida.

En la figura 4.4 pueden verse los resultados iniciales de los CBP y al compararlos con las concentraciones finales se observó que las iniciales (control: $510 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, baja: $2448 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, y alta: $6820 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) fueron superiores a las concentraciones finales.

Las concentraciones finales de compuestos biopoliméricos están relacionados con los flujos de oxígeno disuelto ($-0,8743$), indicando que la mineralización de estos compuestos es la que afecta al consumo de oxígeno por parte del sedimento.

4.2 FLUJOS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL SEDIMENTO EN EL EXPERIMENTO REALIZADO CON MEJILLÓN MÁS FITOPLANCTON

Se realizó un segundo ensayo cambiando el tipo de materia orgánica que se añadía al sedimento en las cámaras con el propósito de estudiar cualquier variación que pudiese producirse en los flujos o en la concentración de moléculas orgánicas, así como el comportamiento del sedimento con dos tipos de materia orgánica diferentes. La figura 4.5 y tabla 4.2 muestra los flujos medidos en este segundo ensayo.

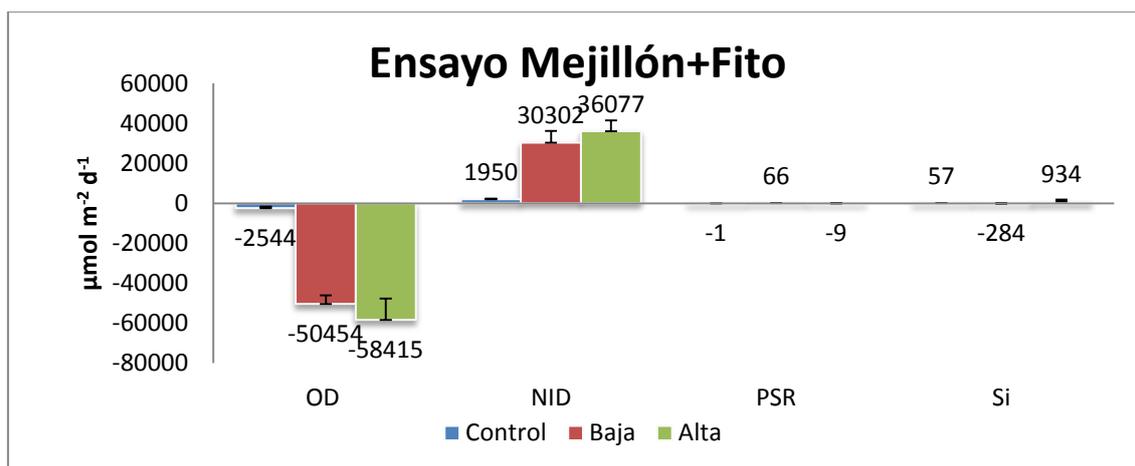


Figura 4.5: Flujos de OD, NID, PSR y Si medidos en las cámaras control, bajas y altas del ensayo pienso (se muestra la media de cada tipo de cámara con su desviación estándar)

El OD claramente fue consumido durante la duración del ensayo por lo que el flujo fue negativo e indicó que el consumo fue en aumento conforme mayor fue la cantidad de materia orgánica añadida.

Al analizar el NID se obtuvieron flujos positivos que indican la formación de N inorgánico como pueden ser NO_3^- o NO_2^- o NH_4^+ sin detectarse consumo por parte del sedimento en ninguno de los promedios de las cámaras control, baja y alta. Tanto los flujos de NH_4^+ como de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ mostraron flujos positivos a excepción de la cámara baja 3 que dio un valor negativo para $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ aunque muy bajo ($-5 \mu\text{mol} \cdot \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$). En general vemos que existe la correspondiente progresión esperada de los flujos, que va en aumento respecto a la cantidad de materia orgánica añadida al sedimento. Los flujos positivos de NID indican que la materia orgánica al descomponerse libera NH_4^+ (amonificación), siendo posible en presencia de oxígeno, la nitrificación de este compuesto a NO_2^- y NO_3^- (Herbert, 1999). Cuantitativamente los flujos de amonio (1898, 29959 y $35715 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ para controles, bajas y altas respectivamente) fueron mayores que los $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ (52, 343 y $361 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ en controles, bajas y altas) por lo que el proceso de amonificación parece que tuvo un mayor peso que la nitrificación.

El PSR, sin embargo, no siguió la progresión esperada puesto que las cámaras control y altas mostraron flujos negativos mientras que las cámaras bajas positivos. Los flujos positivos indicaron que se dieron procesos de formación de PSR durante la mineralización de la materia orgánica y que este fue liberado a la columna de agua desde el sedimento en lugar de quedar adsorbido, no obstante los resultados negativos obtenidos tanto en las cámaras control como en las altas, estuvieron próximos a cero.

Respecto al Si, los promedios que se muestran en la figura 4.5 no siguieron el patrón esperado, ya que las cámaras control mostraron flujos positivos, las bajas negativos y las altas nuevamente positivos. Los flujos positivos indican un aporte de Si al agua debido a la redisolución de las frústulas de las diatomeas (Dugdale y Wilkerson, 2001). En las cámaras control estos aportes pueden proceder tanto del Si que pudo contener el sedimento como de las propias diatomeas que pudieron crecer durante la etapa de aclimatación. En las cámaras altas los aportes fueron mucho mayores ya que el sedimento además contenía el Si procedente del fitoplancton cultivado en laboratorio. Sin embargo las cámaras bajas no siguieron la pauta esperada ya que mostraron flujos negativos indicando un consumo de este compuesto por el sedimento.

En la figura 4.6 se observa las concentraciones de materia orgánica final (MO f) de cada cámara. Los promedios de MO f fueron de 0,9% en controles, 1,8% en bajas y 1,8% en altas. Si bien las cámaras bajas y altas mostraron niveles significativamente mayores que las controles no se apreció diferencias entre los valores promedios debido fundamentalmente a la gran variabilidad que se observó en las cámaras bajas. Los niveles de MO f no siempre fueron inferiores a los porcentajes de MO i (0,7% control, 1,4% baja y 2,0% alta), como cabría esperar, dado que lo lógico sería un consumo de materia orgánica por parte del sedimento. Existió una correlación estadísticamente significativa entre la MO f y los flujos de OD, NH_4^+ y NID (-0,8856, 0,9229 y 0,9213 respectivamente), en cambio no se detectó ninguna relación con PSR o Si. La degradación de la MO conlleva un consumo de OD, la relación positiva tan alta con amonio y los compuestos de N indican que tuvieron lugar procesos de amonificación y nitrificación en el sedimento tras la adición de la mezcla de mejillón + fitoplancton.

En la figura 4.7 se observa los resultados obtenidos para CHO, con valores promedio de 185, 365 y 619 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para control, baja y alta respectivamente. Así mismo al analizar la figura 4.8, se observa que los valores procedentes de las cámaras iniciales fueron mayores a los promedios finales para las cámaras control (227 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y baja (514 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) pero no para las altas (477 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Como era de esperar, los CHO mostraron estar relacionados con los flujos de OD (-0,8239) ya que cuando mayor es la cantidad de estos compuestos mayor es el consumo de OD para su mineralización, sin embargo, también se apreció relaciones estadísticamente significativas con los flujos de NH_4^+ y NID (0,8860, 0,8874) a pesar de que estos compuestos no contienen nitrógeno. Estas

últimas relaciones podrían deberse a que los CHO f mostraron correlaciones con PRT f y LIP f y CBP f de 0,9048, 0,9767, 0,9894 respectivamente.

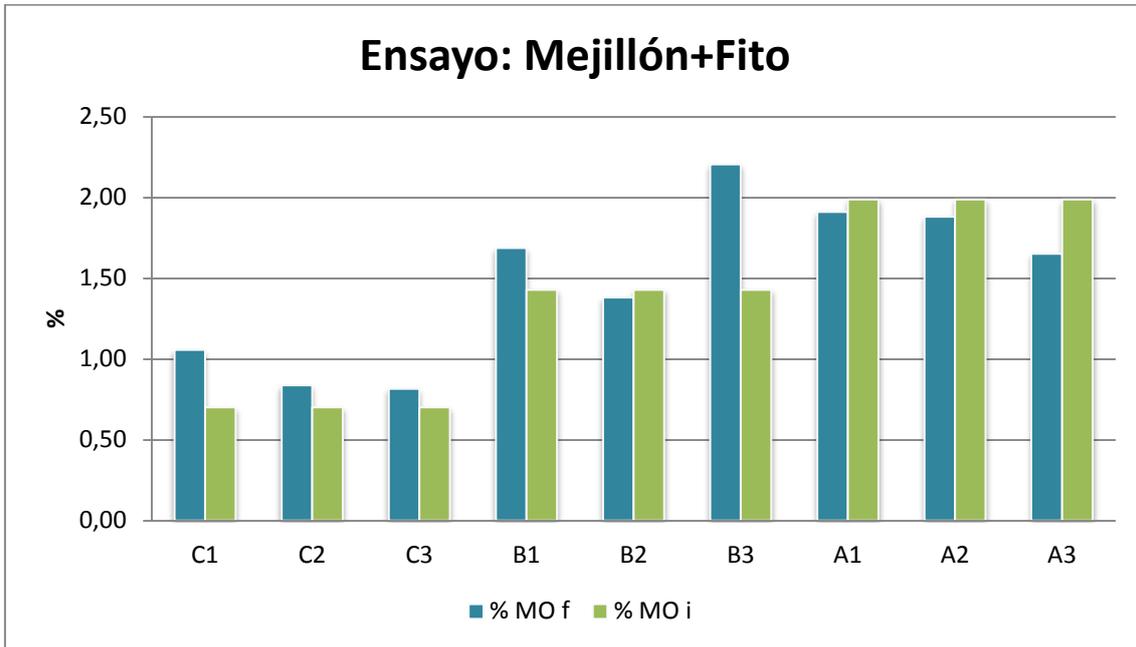


Figura 4.6: Materia Orgánica de la cámara control, baja y alta inicial con la media de las 3 cámaras control, baja y alta finales.

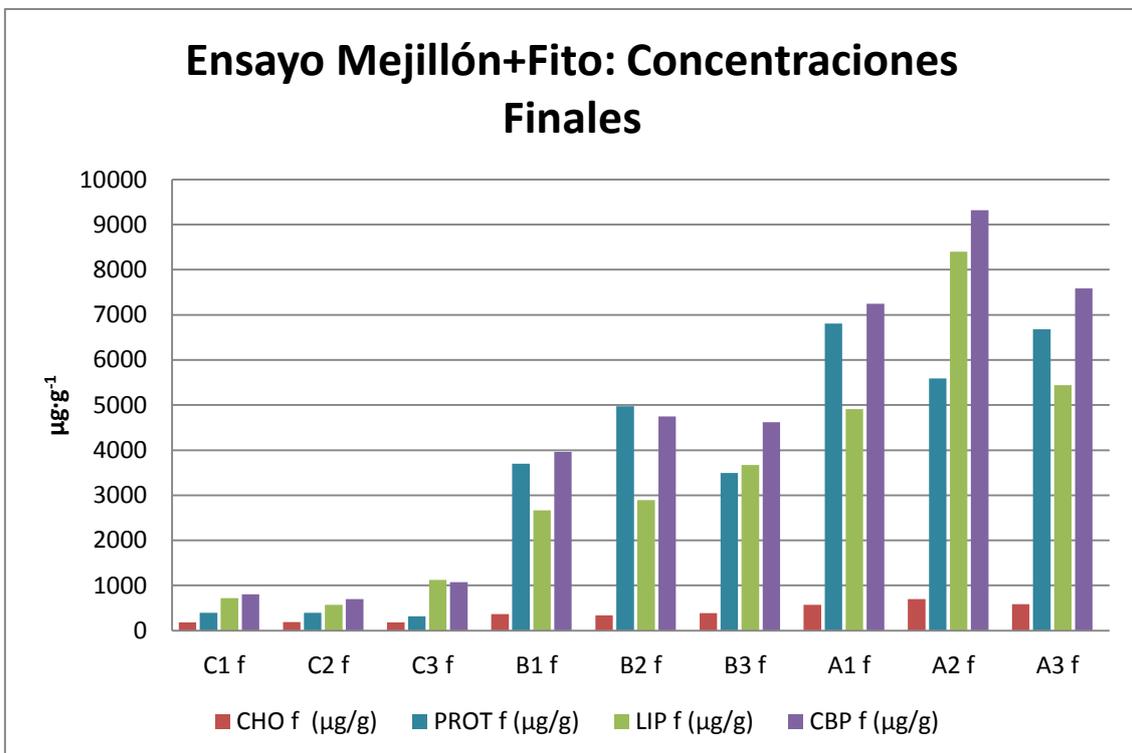


Figura 4.7: Concentraciones finales de carbohidratos, proteínas, lípidos y Compuestos Biopoliméricos analizados en las 3 cámaras control, 3 bajas y 3 altas, mostrando los valores de forma individual.

Las PRT mostraron un claro aumento (fig 4.7) en función de la concentración de materia orgánica añadida a cada grupo de cámaras, con promedios de $368 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en control, $4056 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en bajas y $6357 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en altas. La figura 4.8 muestra los valores iniciales, y en los tres casos estos valores (299 , 2922 y $6153 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en control, baja y alta respectivamente) fueron inferiores a los finales en contra de la pauta esperada. Las concentraciones de proteínas finales estuvieron relacionadas con los flujos de OD, NH_4^+ y NID ($-0,9452$, $0,8786$ y $0,8967$ en este orden) indicando procesos de mineralización que consumen oxígeno disuelto y liberan amonio y en menor medida de nitritos más nitratos.

En el caso de los LIP como se muestra en la figura 4.7 con unos valores promedio finales 807 , 3078 y $6249 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente, siguieron el mismo patrón observado que las PRT. Aunque en las cámaras controles y bajas no existió mucha variabilidad (sd: $524,9$), sí que se observó una desviación estándar alta en las cámaras altas (sd: $1878,5$). Los valores promedio finales fueron inferiores a las concentraciones iniciales (fig. 4.8) con valores de 824 , 4722 y $7078 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para control, baja y alta respectivamente. También los LIP, al igual que las PRT y CHO, guardaron una relación con los flujos de OD, NH_4^+ y NID ($-0,7576$; $-0,946$; $0,8799$ en este orden). Nuevamente el consumo (correlación negativa) de OD fue el esperado, pero la relación con los flujos de nitrógeno (NH_4^+ y NID) no fue tan clara puesto que los lípidos son moléculas que pueden no contener N.

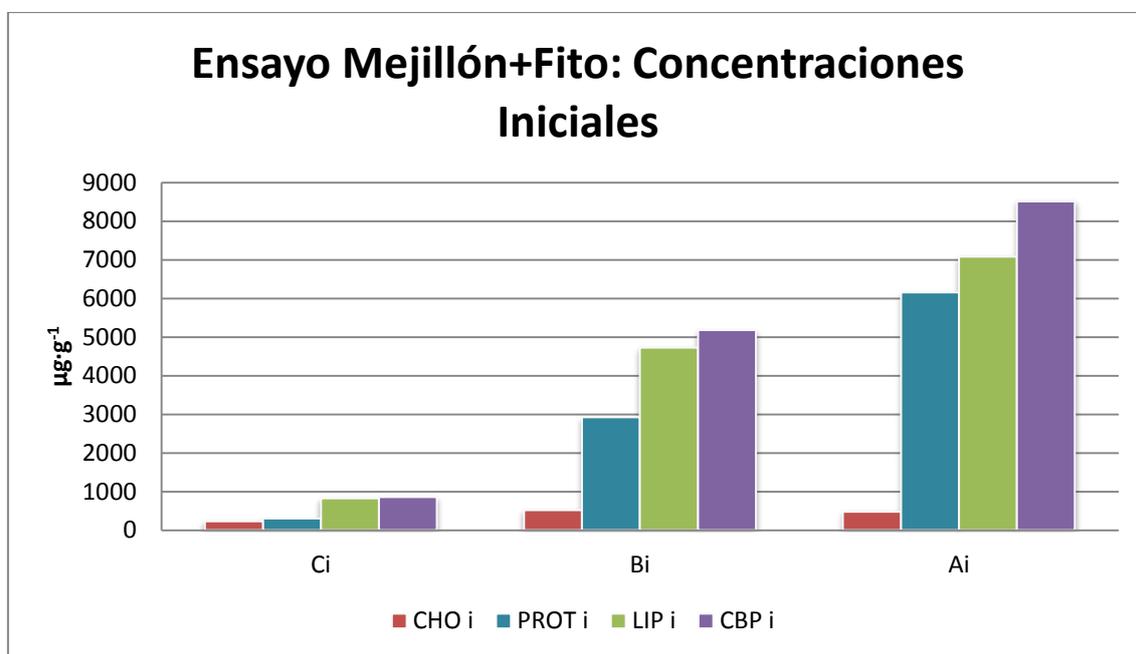


Figura 4.4: Concentraciones iniciales de Carbohidratos, Proteínas, Lípidos y Compuestos Biopoliméricos presentes en la cámara control, baja y alta.

Por último los CBP siguen el mismo patrón que se ha visto en todos los compuestos orgánicos analizados. Los valores promedio de las concentraciones finales (CBP f)

obtenidos fueron 860, 4442 y 8050 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para controles, bajas y altas respectivamente. Si los comparamos con los valores de las concentraciones iniciales, tal y como se muestran en la figura 4.8 (856, 5179 y 8514 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para las cámaras control, baja y alta), se observa que estas últimas fueron superiores en el caso de las bajas y altas a excepción de las control donde fueron prácticamente las mismas. Los CBP también guardaron una relación estadísticamente significativa con los flujos de OD, NH_4^+ y NID (-0,8691; -0,9277 y 0,9249).

Finalmente, teniendo en cuenta los dos ensayos realizados con los dos tipos diferentes de materia orgánica utilizada (pienso y mejillones más fitoplancton) se pudo observar que el consumo de oxígeno disuelto fue mayor a medida que aumentó la cantidad de materia orgánica (r: -0,8856 entre MO f y FOD), proteínas (r: -0,9452 entre PRT f y FOD), lípidos (r: -0,7576 entre LIP f y FOD) y compuestos biopoliméricos del carbono (r: -0,8691 entre CBP f y FOD). Hay que destacar que si bien no se observó una relación con los carbohidratos, la mayor correlación se dio con los CBP que integran el carbono procedente de las proteínas, lípidos como carbohidratos.

Los flujos de amonio también se relacionaron con la cantidad de materia orgánica (r: 0,9229 entre MO f y FNH_4^+), proteínas (r: 0,8946 entre PRT f y FNH_4^+), lípidos (r: 0,8793 entre LIP f y FNH_4^+) y compuestos biopoliméricos del carbono (r: 0,9236, entre CBP f y FNH_4^+) además de con los flujos de OD (r: -0,9380 entre FOD y FNH_4^+).

Los flujos de NID al igual que los flujos de amonio, tuvieron una relación estadísticamente significativa con materia orgánica (r: 0,5471 entre NID y %MO f), proteínas (r: 0,6858 entre NID y PRT f), lípidos (r: 0,4830 entre NID y LIP f), compuestos biopoliméricos del carbono (r: 0,6358 entre NID y CBP), , flujo de oxígeno disuelto (r: -0,5169 entre NID y F OD) y amonio (r: 0,9999 entre NID y NH_4^+).

No se observó ninguna relación entre los flujos de PSR y Si con ningún tipo de compuesto orgánico analizado ni dentro de cada ensayo ni de forma global.

PIENSO

CÁMARA	OD $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	NH₄⁺ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	N_N $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	NID $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	PSR $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	Si $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ $\cdot\text{día}^{-1}$	MO %	PRT $\mu\text{g/g}$	LIP $\mu\text{g/g}$	CHO $\mu\text{g/g}$	CBP $\mu\text{g/g}$
Control 1	-5157	990	-220	770	-10	-87	1,2	243	377	22	411
Control 2	-2535	1731	433	2163	-2	-523	1,3	377	312	55	441
Control 3	-4985	2100	771	2871	3	-348	1,3	190	283	50	325
C media	-4226	1607	328	1935	-3	-319	1,2	270	324	42	392
Inicial C	-	-	-	-	-	-	0,7	329	407	108	510
Baja 1	-44089	-27642	78	-27564	-26	-261	1,3	3188	1368	734	2882
Baja 2	9139	-18211	19	-18192	27	52	1,0	1172	2561	517	2702
Baja 3	-21228	-22129	209	-21920	-26	-122	1,7	903	1364	738	1761
B media	-18726	-22661	102	-22559	-9	-110	1,3	1754	1765	663	2448
Inicial B	-	-	-	-	-	-	1,6	2426	3366	746	4012
Alta 1	-124103	40758	366	41124	52	-226	1,7	3802	4087	544	5146
Alta 2	-93808	-6653	-108	-6761	-16	-714	1,7	2732	6420	302	6274
Alta 3	-77263	6513	292	6806	-53	70	1,6	3064	4217	388	4820
A media	-98391	13540	183	13723	-6	-290	1,7	3199	4908	411	5413
Inicial A	-	-	-	-	-	-	1,8	6625	4300	873	6820

Tabla 4.1: Resultados del ensayo con pienso

MEJILLÓN MÁS FITOPLANCTON

CÁMARA	OD $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	NH_4^+ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	N_N $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	NID $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	PSR $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	Si $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$	MO %	PRT $\mu\text{g/g}$	LIP $\mu\text{g/g}$	CHO $\mu\text{g/g}$	CBP $\mu\text{g/g}$
Control 1	-3438	2365	22	2387	-4	-17	1,1	391	724	184	808
Control 2	-1683	1920	54	1974	0	108	0,8	396	571	191	699
Control 3	-2511	1409	80	1489	3	80	0,8	318	1126	181	1073
C media	-2544	1898	52	1950	-1	57	0,9	368	807	185	860
Inicial C	-	-	-	-	-	-	0,7	299	824	227	856
Baja 1	-45550	24298	726	25024	-13	21	1,7	3699	2670	367	3962
Baja 2	-53163	28845	309	29154	160	-717	1,4	4973	2895	340	4744
Baja 3	-52650	36734	-5	36729	52	-156	2,2	3496	3670	388	4621
B media	-50454	29959	343	30302	66	-284	1,8	4056	3078	365	4442
Inicial B	-	-	-	-	-	-	1,4	2922	4722	514	5179
Alta 1	-70821	32423	184	32608	52	574	1,9	6804	4913	573	7248
Alta 2	-52358	41864	412	42276	-81	179	1,9	5591	8397	700	9318
Alta 3	-52065	32859	487	33346	2	2049	1,7	6677	5438	584	7584
A media	-58415	35715	361	36077	-9	934	1,8	6357	6249	619	8050
Inicial A	-	-	-	-	-	-	2,0	6153	7078	477	8514

Tabla 4.2: Resultados ensayo con mejillones más fitoplancton

5 CONCLUSIONES

En este estudio se pudo establecer las siguientes relaciones entre los flujos en la interfase sedimento-agua y los compuestos orgánicos analizados teniendo en cuenta los dos ensayos realizados con los dos tipos diferentes de materia orgánica utilizada (pienso y mejillones más fitoplancton):

- El consumo de oxígeno disuelto fue mayor a medida que aumentó la cantidad de materia orgánica en los sedimentos debido a que durante la degradación aeróbica de la materia orgánica se consume este compuesto. Este consumo también fue mayor a medida que mayor fue la cantidad de proteínas, lípidos y compuestos biopoliméricos del carbono.
- Los aportes de amonio y de nitrógeno inorgánico disuelto fueron mayores a medida que aumentó la cantidad de materia orgánica, proteínas, lípidos y compuestos biopoliméricos del carbono. A través de la amonificación, el nitrógeno orgánico es transformado a amonio inorgánico y en este proceso se consume oxígeno por lo que estos aportes estuvieron relacionados inversamente con los flujos de oxígeno disuelto. La relación del nitrógeno inorgánico disuelto con las distintas formas orgánicas se debió principalmente al amonio ya que la amonificación tuvo una mayor importancia que la nitrificación.
- Los carbohidratos a diferencia de las otras fracciones lábiles como las proteínas, lípidos y compuestos biopoliméricos del carbono no mostraron una relación clara con los flujos de oxígeno debido probablemente a que la fracción más lábil de ellos, es degradada rápidamente durante la etapa de aclimatación del experimento, quedando los más refractarios en el momento del ensayo.
- Los biopolímeros orgánicos mostraron una respuesta sensible a los flujos de oxígeno, y nitrógeno en la interfase sedimento-agua ya que representan la fracción lábil de la materia orgánica sedimentaria.
- No se observó ninguna relación entre los flujos de fósforo y sílice con ningún tipo de compuesto orgánico analizado en ninguno de los experimentos realizados.
- De los experimentos realizados, el que utilizó como fuente de materia orgánica mejillones más fitoplancton fue el más adecuado debido a que tanto oxígeno como nitrógeno respondieron en función de la predicción general de que la materia orgánica de los sedimentos al descomponerse de forma aerobia consume oxígeno del agua y libera a ésta nitrógeno.

- Las cámaras iniciales no aportaron la respuesta esperada ya que se pretendía utilizarlas como referencia para obtener las concentraciones iniciales del ensayo de cada tipo de cámara para la determinación de los flujos sin alterar el sedimento. Dada la heterogeneidad del mismo en muchas situaciones se observaron niveles iniciales más bajos que los finales (obtenidos tras terminar el ensayo), por lo que no resultaron útiles para establecer la cantidad de compuestos orgánicos consumidos en el ensayo.

6 REFERENCIAS

Baumgarten M.G, Rocha J.M y Niencheski L.F. (1996). Manual de análises em oceanografia química. Rio Grande, Ed. da FURG, Brasil, 132 p.

Bertuzzi A, Faganeli J Welker C y Brambati A. (1997). Benthic fluxes of dissolved inorganic carbon, nutrients and oxygen in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Water, Air, & Soil Pollution* 99:305-314.

Clark R.B, Frid C y Attrill M. (2002). *Marine pollution*. Ed. Oxford University Press. 5th edition.

Colodro I. (2012). Experimentos ex situ para la determinación de flujos de nutrientes en la interfase agua-sedimento: Puesta a punto. Universidad Politécnica de Valencia.

Dell'Anno A, Mei M.L, Pusceddu A y Danovaro R. (2002). Assessing the trophic state and eutrophication of coastal marine systems: a new approach based on the biochemical composition of sediment organic matter. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 611-622.

De Freitas U, Niencheski L.F.H, Zarzur S, Manzolli R.P, Vieira J.P.P.P y Rosa, L.C. (2008). Influência de um cultivo de camarão sobre o metabolismo béntico e a qualidade da água. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 12(3): 293-301.

Dugdale R.C y Wilkerson F.P. (2001) Sources and fates of silicon in the ocean: the role of diatoms in the climate and glacial cycles. *Science Marina* 65: 141–152.

Emmerson M.C, Solan M, Emes C, Paterson D.M y Raffaelli, D. (2001) Consistent patterns and the idiosyncratic effects of biodiversity in marine ecosystems. *Nature*. 411: 73-77. doi: 10.1038/35075055

Engelsen A, Hulth S, Pihl L y Sundbäck K. (2008). Benthic trophic status and nutrient fluxes in shallow-water sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78:783-795.

Friedl G, Dinkel C y Wehrli B. (1998). Benthic fluxes of nutrients in the northwestern Black Sea. *Marine Chemistry* 62:77-88.

Glud R.N, Rysgaard S y Kühl M. (2002). A laboratory study on O₂ dynamics and photosynthesis in ice algal communities: quantification by microsensors, O₂ exchange rates, ¹⁴C incubations and a PAM fluorometer. *Aquatic Microbial Ecology* 27:301-311.

Hargrave, B.T y Connolly G.F. (1978). A device to collect supernatant water for measurement of the flux of dissolved compounds across sediment surfaces. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1005-1010.

Herbert R.A. (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 23:563-590

Longphuir S.N, Ragueneau O, Chauvaud L, Martin S, Jean F, Thouzeau G y Leynaert A. (2009) Diurnal heterogeneity in silicic acid fluxes in shallow coastal sites: Causes and implications. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 82: 495–502.

Melzer R.R y Herzer K. (2004). El litoral. In: Hofrichter R. (Editor) *El Mar Mediterráneo. Parte I.*

Mermillod-Blondin F, Lemoine D, Boisson J. C, Malet E y Montuelle B. (2008). Relative influences of submersed macrophytes and bioturbating fauna on biogeochemical processes and microbial activities in freshwater sediments. *Freshwater Biology* 53:1969-1982.

Morata T, Sospedra J, Falco S y Rodilla M. (2012). Exchange of nutrients and oxygen across the sediment–water interface below a *Sparus aurata* marine fish farm in the north-western Mediterranean Sea *Journal of Soils and Sediments* (2012) 12:1623-1632

Mortimer R.J.G, Davey J.T, Krom M.D, Watson P.G, Frickers P.E y Clifton R.J. (1999). The effect of macrofauna on porewater profiles and nutrient fluxes in the intertidal zone of the humber estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 48:683-699.

Murray L, Mudge S, Newton A, y Icely J. (2006). The effect of benthic sediments on dissolved nutrient concentrations and fluxes. *Biogeochemistry* 81:159-178.

Murphy J y Riley J.P. (1962). A Modified Single Solution Method for Determination of Phosphate in Natural Water. *Anal. Chem. Acta* 27: 31-36.

Nedwell D.B, Jickells T.D, Trimmer M y Sanders R. 1999. Nutrients in Estuaries. *Advances in Ecological Research* 29: 43-92.

Nizzoli D, M Bartoli y Viaroli P. (2007). Oxygen and ammonium dynamics during a farming cycle of the bivalve *Tapes philippinarum*. *Hydrobiologia* 587:25-36.

Pratihary A K, Naqvi S.W.A, Naik H, Thorat B.R, Narvenkar G, Manjunatha B. R y Rao V. P. (2009). Benthic fluxes in a tropical Estuary and their role in the ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85:387-398.

Pusceddu A, Dell'Anno A, Fabiano M y Danovaro R. (2004) Quantity and biochemical composition of organic matter in marine sediments. In: Gambi MC, Diappiano, M (ed) *Mediterranean Marine Benthos: A Manual of Methods for its Sampling and Study*, Societa Italiana di Biologia Marina, Genova, pp 39-53.

Pusceddu A, Bianchelli S, Canals M, Sanchez-Vidal A, Durrieu De Madron X, Heussner S, Lykousis V, Stigter H, Trincardi F y Danovaro R. (2010) Organic matter in sediments of canyon sand open slopes of the Portuguese, Catalan, Southern Adriatic and Cretan Seamounts. *Deep-Sea Research I* 57: 441–457.

Rullkötter J. (2006) Organic matter: the driving force for early diagenesis In *Marine geochemistry* Ed: Schulz H.D y Zabel M.

Schulz H y Zabel M. (2006) *Marine Geochemistry*. Ed: Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg

Sospedra J. (2010). Flujos de nutrientes a través de la interfase sedimento-agua en fondos de arenas finas y su relación con los factores físico-químicos del sedimento. Escuela Politécnica Superior de Gandía, Universidad Politécnica de Valencia.

Spilmont N, Davoult D y Migné A. (2006). Benthic primary production during emersion: In situ measurements and potential primary production in the Seine Estuary (English Channel, France). *Marine Pollution Bulletin* 53:49-55.

Strickland J.D.H y Parsons T.R. (1972). *A Practical handbook of Seawater Analysis*. Bull. Fish. Res. Bd. Canada. 167.

Vita R, Marín A, Madrid J. A, Jiménez-Brinquis B, César A y Marín-Guirao L. (2002). Impacto ambiental de la acuicultura en el bentos marino: experimentos de exclusión – inclusión. *Boletín instituto español de oceanografía*. 18 (1-4): 75-86

Venturini N, Pita A.L, Brugnoli E, García-Rodríguez F, Burone L, Kandratavicius N, Hutton M y Muniz P. Benthic trophic status of sediments in a metropolitan area (Rio de la Plata estuary): Linkages with natural and human pressures. *Estuarine coastal and shelf science* (2011) 1-14. *Oceanografía y ecología marina, instituto de ecología y ciencias ambientales (ieca), facultad de ciencias, universidad de la república (udelar), iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.*

Viollier E, Rabouille C, Apitz S.E, Breuer E, Chaillou G, Dedieu K, Furukawa Y, Grenz C, Hall P, Janssen F, Morford J.L, Poggiale J.-C, Roberts S, Shimmield T, Taillefert M, Tengberg A, Wenzhöfer F y Witte U. (2003). Benthic biogeochemistry: state of the art technologies and guidelines for the future of in situ survey *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 285–286: 5 – 31

Wolfstein K, Brouwer J.F.C. d y Stal L.J. (2002). Biochemical partitioning of photosynthetically fixed carbon by benthic diatoms during short-term incubations at different irradiances. *Marine Ecology Progress Series* 245:21-31.