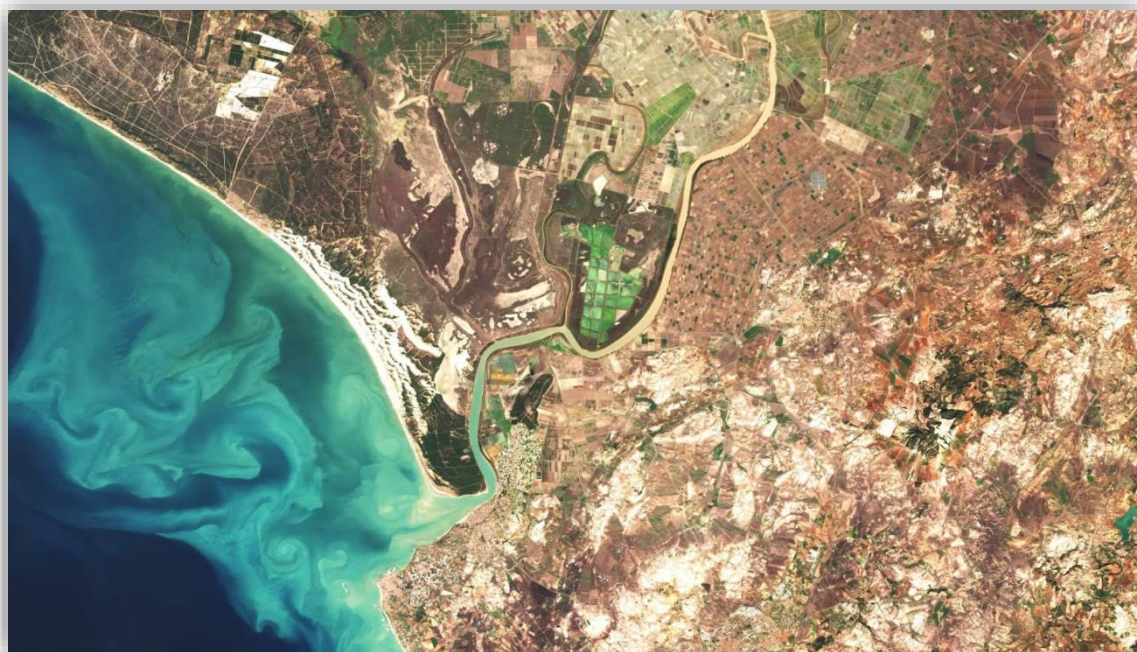


TRABAJO DE FIN DE GRADO



OXIDACIÓN DE METANO EN SISTEMAS ESTUÁRICOS

Trabajo presentado por:

Miriam Mestre Durán

Tutorizado por:

Jesús Forja Pajares

Teodora Ortega Díaz

Puerto Real (Cádiz), 10 de septiembre de 2021

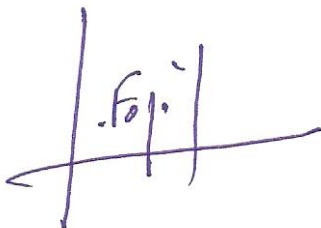
D. Jesús Forja Pajares, Catedrático del Dpto. de Química Física de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz y Dña. Teodora Ortega Díaz, Profesora Titular del Dpto. de Química Física de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

HACEN CONSTAR,

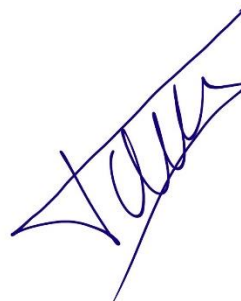
Que el trabajo recogido en el Trabajo de Fin de Grado, titulado “Oxidación de metano en sistemas estuáricos” presentado por la alumna Miriam Mestre Durán, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Considerando que resume su trabajo de investigación y que reúne todos los requisitos legales, autorizamos su presentación y defensa para la obtención del Grado en Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz.

En Puerto Real, a 9 de septiembre de 2021



Fdo: Jesús Forja Pajares



Fdo: Teodora Ortega Díaz

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis tutores, Jesús y Dori, por acogerme de la manera en la que lo han hecho, por enseñarme y confiar en mí.

A Jairo, por ser paciente conmigo y hacerme sentir una más. Gracias por tu confianza desde el primer minuto y por, aun estando a tope de curro, sacar hueco para explicarme las mil dudas que he tenido; y ti también Bea, por animarme, alegrarte por mí y darme la oportunidad de aprender a tu lado.

A mi familia en Cádiz, Juan, Marta, Arena y Diego, por hacerme sentir en casa y por estar desde siempre. Habéis hecho que este camino haya sido maravilloso. La empatía, las risas, las palabras de ánimo y todos los momentos vividos estarán siempre en mí.

A Elena y Fabi por no dejarme caer y apoyarme constantemente. Por alegraros de cada paso conseguido y por estar, aun en la distancia, siempre conmigo.

Y sobre todo a mi familia. A ti Carmen, por ser mi faro y mi referencia constante. Por enseñarme a pelear y a perseguir lo que uno quiere, con esfuerzo y sacrificio, y por hacerme la vida más bonita. Abuela, sin ti tampoco hubiera sido igual, así que gracias, gracias por ser cómplice y apoyarnos en cada paso que hemos dado. A ti mamá, que has peleado siempre por nosotros y nos has enseñado a no desfallecer, a ser humildes y a luchar por lo que nos apasiona. Y a ti papá, que nos motivas a seguir formándonos en la ciencia y a querer más. Vosotros sois el lugar al que siempre quiero volver.

Índice

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Gases invernadero en la atmósfera	1
1.2. Gases de efecto invernadero en los océanos	2
1.3. Metano y óxido nitroso en sistemas estuáricos	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Zona de estudio	7
3.2. Toma de muestras	9
3.2.1. Estrategia de muestreo	9
3.2.2. Medidas en continuo	10
3.3. Métodos analíticos	10
3.4. Fase experimental: Reactividad de gases	11
3.5. Cálculos de flujos con la atmósfera	14
3.6. Análisis estadístico	15
4. RESULTADOS	15
4.1. Variaciones longitudinales en el estuario del Guadalquivir	15
4.2. Experimento de incubación	17
5. DISCUSIÓN	20
5.1. Dinámica de gases invernadero	20
5.2. Reactividad de gases en la columna de agua	22
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

Se ha estudiado la distribución y reactividad de las concentraciones de CH₄ y N₂O a lo largo de un gradiente de salinidad en el estuario del Guadalquivir. Para ello, se ha realizado un muestreo longitudinal a bordo del B/O UCADIZ en marzo de 2021. Las concentraciones de CH₄ y N₂O se han cuantificado mediante cromatografía de gases. Se ha observado que la concentración de CH₄ y N₂O aumenta hacia el interior del estuario, observándose un incremento lineal para el óxido nítrico (de 8,7 a 23,23 nM), mientras que para el metano su máximo (42,6 nM) se alcanza a una salinidad intermedia a causa de los aportes laterales desde las zonas de marismas. Los flujos con la atmósfera son más intensos en la zona fluvial y la variación que presentan es similar a la que experimentan las concentraciones de ambos gases. Los flujos de CH₄ y N₂O son positivos (13,3-48,9 y 0,3-15,5 μmol·m⁻²·d⁻¹ respectivamente) por lo que el estuario actuaría como fuente de ambos gases a la atmósfera.

Para analizar la reactividad de estos gases se tomaron muestras en 4 estaciones a lo largo del estuario con salinidades comprendidas entre los 1,9 y 35,3, que fueron incubadas a dos temperaturas distintas (12 °C y 25 °C) durante 148 horas. Se ha obtenido que las velocidades de oxidación y consumo de CH₄ y N₂O, respectivamente, adquieren importancia a salinidades bajas y a una menor temperatura, pero se trata de valores bajos en comparación con otros estudios. Es probable que el diseño experimental utilizado no proporcione medidas de las reacciones individuales de producción o consumo de estos gases, contribuyendo a que los resultados obtenidos se encuentren afectados.

ABSTRACT

The distribution and reactivity the concentrations of dissolved of CH₄ and N₂O along a salinity gradient in the Guadalquivir estuary was studied. For this purpose, a longitudinal sampling was carried out on board the B/O UCADIZ in March 2021. CH₄ and N₂O concentrations were quantified by gas chromatography. It has been observed that CH₄ and N₂O concentration increases towards the interior of the estuary, with a linear increase for nitrous oxide (from 8,7 to 23,2 nM), while for methane its maximum (42,6 nM) is reached at intermediate salinity due to lateral inputs from the mudflat areas. The fluxes with the atmosphere are more intense in the river zone and the variation is similar to that of the concentrations of both gases. The fluxes of CH₄ and N₂O are positive (13,3-48,9 and 0,3-15,5 μmol·m⁻²·d⁻¹ respectively), so the estuary would act as a source of both gases to the atmosphere.

To analyse the reactivity of these gases, samples were taken at 4 stations along the estuary with salinities ranging from 1,9 to 35,3 and incubated at two different temperatures (12 °C and 25 °C) for 148 hours. It was found that the rates of oxidation and consumption of CH₄ and N₂O, respectively, become significant at low salinities and lower temperature, but these are low values compared to other studies. It is likely that the experimental design used does not provide measurements of the individual reactions of production or consumption of these gases, contributing to the fact that the results obtained are affected.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gases invernadero en la atmósfera

El sistema Tierra – Atmósfera absorbe parte de la radiación proveniente del Sol. Cierta fracción de ésta es emitida desde la superficie terrestre principalmente como radiación infrarroja (IR). Algunos gases presentes en la atmósfera que conocemos como “gases de efecto invernadero” (GEIs), absorben una fracción de esta radiación, lo que afecta al clima de nuestro planeta (Salby, 2012). La retención de calor por parte de estos gases se denomina "efecto invernadero". Se trata de un fenómeno natural que mantiene la temperatura media mundial en torno a los 18 °C que, de otro modo, sería cercana a los -15 °C, por lo que este mecanismo permite la vida en la Tierra (Tremblay *et al.*, 2005).

Desde la Revolución Industrial (1750) la concentración de los gases de efecto invernadero se ha incrementado significativamente en la atmósfera (Figura 1), principalmente en respuesta a la quema de combustibles fósiles y biomasa (IPCC, 2007).

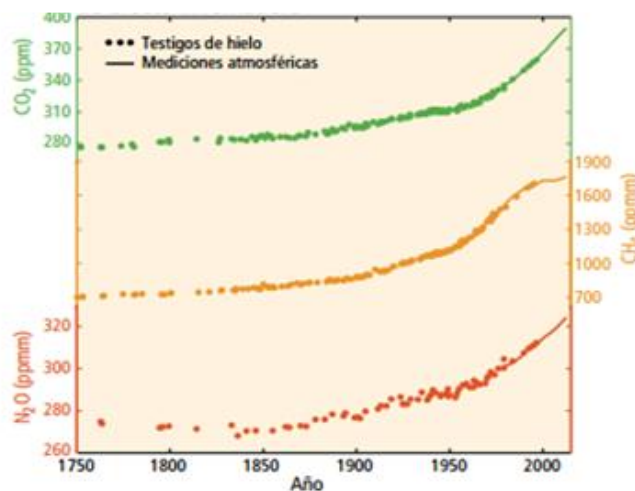


Figura 1: Cambios observados en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero. Se han superpuesto los datos de los testigos de hielo y las mediciones atmosféricas directas. Fuente: IPCC (2014).

Los principales gases de efecto invernadero son el vapor de agua (H₂O), el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) (IPCC, 2001). Estos gases son emitidos tanto por ecosistemas naturales acuáticos (lagos, ríos, estuarios, humedales) y terrestres (bosques, suelos) como por fuentes antropogénicas (Blais *et al.*, 2005).

Si no se considera el vapor de agua, el metano es el segundo gas de efecto invernadero (GEI) más importante, después del dióxido de carbono (Maylan *et al.*, 2016). Después del CO₂, el metano presenta el segundo mayor forzamiento radiactivo de los gases de efecto invernadero de larga duración (Ramaswamy *et al.*, 2001). Concretamente, el efecto de la radiación de un

kilogramo de CH₄ atmosférico es 28 veces mayor que el del CO₂ atmosférico en una escala temporal de 100 años. Por lo tanto, un pequeño cambio en la concentración atmosférica de CH₄ implica cambios significativos para el clima futuro (IPCC, 2013).

La concentración de metano en la atmósfera a finales de la década de los 90's era dos veces la cantidad presente durante la era preindustrial (Ballesteros y Aristizábal, 2007). De hecho, la concentración durante el siglo XX ha aumentado drásticamente hasta alcanzar las 1859 ppb en 2017. Este valor constituye el 257% de los niveles preindustriales (anteriores a 1750) (IPCC, 2019).

Aproximadamente, el 60% del metano liberado a la atmósfera proviene de fuentes antropogénicas como la agricultura, el tratamiento de desechos, la quema de biomasa y los combustibles fósiles. El 40% restante proviene de fuentes naturales, principalmente humedales (Kirschke *et al.*, 2013).

Con respecto al óxido nitroso, se trata de un gas de efecto invernadero 300 veces más potente que el CO₂ y es el tercero que más contribuye al forzamiento radiactivo de las emisiones antropogénicas (Myhre *et al.*, 2014). También es uno de los principales causantes del agotamiento del ozono estratosférico, pues está involucrado en la destrucción de la capa de ozono contribuyendo indirectamente al incremento de la radiación UV (Manne y Richels, 2001; Portmann *et al.*, 2012). En 2017, las concentraciones atmosféricas de N₂O promediadas a nivel mundial fueron de 329,9 ppb. Estos valores constituyen el 122% de los niveles preindustriales (IPCC, 2019).

Las fuentes que contribuyen con óxido nitroso a la atmósfera son tanto de origen antropogénico, como de origen natural. Estas últimas provienen principalmente de la descomposición bacteriana de los suelos y de los océanos. A pesar de que la concentración de N₂O es baja en aguas marinas, se sabe que los océanos en su conjunto actúan como una fuente considerable de N₂O atmosférico (Outdot *et al.*, 1990). Aun así, la fuente más importante de óxido nitroso son las emisiones generadas por el uso de fertilizantes y, en menor medida, por el consumo de combustibles fósiles (IPCC, 2013).

1.2. Gases de efecto invernadero en los océanos

Los océanos se encargan de regular el clima del planeta mediante un continuo intercambio con la atmósfera de calor y gases con efecto invernadero (Sarmiento y Gruber, 2002). De hecho, los océanos actúan de forma global como un sumidero para el CO₂, influyendo sustancialmente en el ciclo del carbono (Reedburgh, 2007) y como fuentes de CH₄ y N₂O a la atmósfera (Seitzinger

et al., 2000). Entre 1994 y 2007, el océano absorbió $2,6 \pm 0,3$ Pg C·año⁻¹ de CO₂, lo que representa el $31 \pm 4\%$ de las emisiones antropogénicas de este gas (Gruber *et al.*, 2019) y se ha estimado que emite alrededor de 11-18 Tg CH₄·año⁻¹ a la atmósfera, lo que contribuye alrededor del 4% a las emisiones globales totales (Borges *et al.*, 2016). En cuanto al N₂O, en 2006 las emisiones fueron de 17,9 Tg N·año⁻¹ (IPCC, 2013).

El metano en los océanos se forma por dos mecanismos principales, uno biogénico y otro geológico. El primero de ellos está asociado a la descomposición de la materia orgánica mediante el proceso anaeróbico de la metanogénesis (Cicerone y Oremland, 1988). Este proceso de descomposición constituye la última fase del proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica (Stams y Plugge, 2010). La metanogénesis está mediada por microorganismos anaerobios estrictos, y sus principales reacciones son la reducción de CO₂ (1) y la fermentación de acetato (2) (Reeburgh, 2007):



Debido a que los organismos metanogénicos son estrictamente anaeróbicos, la producción de CH₄ se limita a ambientes reductores como los sedimentos marinos (Middelburg *et al.*, 2002), los intestinos de animales marinos y microentornos anóxicos de partículas de materia orgánica o pellets fecales en la columna de agua (De Angelis y Lee, 1994).

La producción de metano en sedimentos marinos depende de las propiedades fisicoquímicas del propio sedimento (pH, Eh, concentración de oxígeno, salinidad, concentración de sulfato, etc.), de la disponibilidad de sustrato y de la actividad de otros organismos que habitan el sedimento, como es el caso de las bacterias sulfatorreductoras (Hartmann *et al.*, 2020). Se conoce que la actividad metanogénica aumenta con la temperatura, pero se reduce en sedimentos con altas concentraciones de sulfato. Las bacterias sulfatorreductoras compiten con las metanogénicas por el mismo sustrato de manera más eficiente en sedimentos con alto contenido en sulfato (Kristjansson y Schönheit, 1983). Además, el sulfato puede actuar oxidando al metano presente en el sedimento (Burdige y Komada, 2011). Una vez formado en el sedimento, el CH₄ tiende a difundirse a la columna de agua donde se oxida (Reeburgh, 2007).

En la columna de agua óxica, el metano, por lo general, se oxida; sin embargo, en ciertas zonas del océano existe un máximo subsuperficial que se denomina la “paradoja del metano oceánico” (Damm *et al.*, 2009). El origen de este máximo se desconoce y para explicarlo se han sugerido

diferentes orígenes como: el transporte lateral de CH₄ desde zonas litorales, considerándose éstas como fuentes importantes de metano (Del Sontro *et al.*, 2010), la producción en nichos microanóxicos en el interior de materia orgánica particulada (Donis *et al.*, 2017), a través de metilfosfonato por limitación de fósforo (P) (Karl *et al.*, 2008) o vía dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Florez-Leiva *et al.*, 2013). También, se ha evidenciado que el fitoplancton puede producir CH₄ directamente (Günthel *et al.*, 2020). Aun así, en aguas costeras, son las fuentes sedimentarias las que tienen una mayor influencia en las concentraciones de metano (Borges *et al.*, 2018).

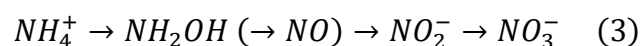
Además, existen otras fuentes no biogénicas de este gas que presentan una naturaleza geológica como los volcanes de fango (Dimitrov, 2003), la disolución de los hidratos de este gas o la liberación en forma de filtraciones (Kvenvolden y Rogers, 2005).

En los sistemas acuáticos, más del 90% del CH₄ producido se puede oxidar por procesos aerobios y anaerobios (Reeburgh, 2007). El consumo microbiano de metano es realizado, en condiciones aeróbicas, por bacterias metanótrofas y, en condiciones anaeróbicas, por bacterias reductoras de sulfato y arqueas metanótrofas (Inostroza *et al.*, 2011). Por lo tanto, la oxidación de CH₄ puede jugar un papel fundamental en la reducción de las emisiones de CH₄ de los ecosistemas acuáticos a la atmósfera (Utsumi *et al.*, 1998; Sawakuchi *et al.*, 2016).

El N₂O se produce en los océanos por los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación que están ligados a la remineralización de la materia orgánica (Seitzinger *et al.*, 1984; Codispoti *et al.*, 2001). Ambos procesos ocurren tanto en los sedimentos como en la columna de agua y, también, en el interior de partículas en suspensión (Bange, 2006).

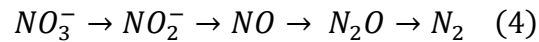
La producción de óxido nitroso en los océanos depende de la concentración de oxígeno disuelto y de la concentración de nitrógeno orgánico disuelto (DIN) presentes (De Bie *et al.*, 2002; Canfield *et al.*, 2010).

La nitrificación (3) es un proceso que requiere de oxígeno y, en el cual, el ión amonio (NH₄⁺) es oxidado a nitrito (NO₂⁻) y posteriormente a nitrato (NO₃⁻), produciendo N₂O a partir de NH₂OH o NO en la columna de agua (Arp y Stein, 2003).



Este proceso tiene lugar tanto en la columna de agua como en la zona óxica de los sedimentos (Arp y Stein, 2003) y se considera una fuente importante de contribución oceánica al N₂O atmosférico (Cohen y Gordon, 1979; Oudot *et al.*, 1990).

La desnitrificación (4) es un proceso por el que se reduce el nitrato o nitrito a nitrógeno gaseoso (N_2) como producto principal, con la generación de N_2O como intermediario y es producido por bacterias anaeróbicas facultativas (Fuhrman y Capone, 1991; Seitzinger *et al.*, 2000). Este proceso está restringido a la parte anóxica del sedimento y al interior de partículas en suspensión (Bange *et al.*, 2010).



El N_2O también puede ser consumido en el océano por la desnitrificación, por su reducción a dinitrógeno ($N_2O \rightarrow N_2$) (Giblin *et al.*, 2013, Ma *et al.*, 2019). Recientemente, Farías *et al.* (2013) encontraron que el N_2O se puede transformar directamente en nitrógeno orgánico particular (PON) a través de la asimilación biológica. Este proceso puede tener lugar en condiciones biogeoquímicas extremas e incluso con concentraciones de N_2O muy bajas. La fijación biológica de N_2O podría proporcionar un sumidero de importancia mundial para el N_2O atmosférico y oceánico y también una fuente potencial de nitrógeno fijo oceánico (Farías *et al.*, 2013).

1.3. Metano y óxido nitroso en sistemas estuáricos

Las zonas costeras, donde interactúan tierra, océano y atmósfera, cubren aproximadamente el 7% de la superficie oceánica mundial (Gattuso *et al.*, 1998), y aunque se trata de una superficie relativamente pequeña, presentan una gran variabilidad en términos de forzamientos físicos y biogeoquímicos, todo ello causado por aportes de materia orgánica y nutrientes terrestres a través de los ríos y la descarga de aguas subterráneas. Constituyen una de las zonas más activas desde el punto de vista geoquímico y biológico de la biosfera (Wollast, 1998). Además, los sistemas estuáricos están sujetos a cambios estacionales importantes que influyen en la concentración de gases con efecto invernadero (Middelburg *et al.*, 2002; Abril y Borges, 2005).

En la actualidad, se estima que los ecosistemas costeros desempeñan un papel modesto en el balance mundial de metano, ya que su contribución representa entre el 1 y el 10% de las emisiones totales (Bange *et al.*, 1994; Middelburg *et al.*, 2002; Conrad, 2009). Aunque la plataforma continental y los estuarios representan sólo el 15 y el 0,4%, respectivamente, de la superficie oceánica mundial, contribuyen con alrededor del 68 y del 7 al 10%, respectivamente, al total de las emisiones oceánicas de metano (Bange *et al.*, 1994; Upstill-Goddard *et al.*, 2000; Middelburg *et al.*, 2002). Se estima que las emisiones medias de CH_4 de los estuarios europeos son de $0,73 \text{ Tg } CH_4 \cdot \text{año}^{-1}$ (Bange, 2006).

Los estuarios reciben grandes aportes de materia orgánica, lo que da lugar a una gran producción de CH₄ y a que sus concentraciones sean superiores al equilibrio atmosférico (Abril y Borges, 2005). Al tratarse la metanogénesis de la última etapa de degradación de la materia orgánica, se encuentran mayores concentraciones de metano en las zonas anóxicas del sedimento (Jørgensen y Kasten, 2006; Reeburgh, 2007). Por tanto, la disponibilidad de sulfato, que aumenta con la salinidad, será un factor clave en la producción de metano, que disminuye hasta en dos órdenes de magnitud desde las zonas de agua dulce a las saladas (Abril y Borges, 2005).

La influencia de las mareas es otro factor clave en la distribución de metano (Grunwald *et al.*, 2009). Los estuarios mareales, como es el caso de la zona de estudio, son muy dinámicos, con altas velocidades de corriente, alta turbidez, frecuentes resuspensiones de sedimentos y presencia de grandes llanuras mareales. En estos sistemas, la alta turbulencia favorece la emisión de metano y la oxidación de metano es significativa en la región de menor salinidad (Middelburg *et al.*, 2002; Abril e Iversen 2002). De hecho, la producción de metano puede ocurrir en zonas de máxima turbidez (Upstill-Goddard *et al.*, 2000).

La mayor contribución marina global de N₂O proviene principalmente de los estuarios, con un aporte de alrededor del 40% del balance oceánico total (De Wilde y De Bie, 2000; Dong *et al.*, 2002). Esto sucede porque una carga elevada de materia orgánica y nitrógeno favorece la producción de óxido nitroso en el interior del estuario (Frankignoulle y Middelburg, 2002).

La principal entrada de nitrógeno a los ríos y, por consiguiente, a los estuarios, se produce por vía antropogénica. De la cantidad total de emisiones a la atmósfera de N₂O de ríos, estuarios y plataformas continentales, (1,9 Tg N·año⁻¹), el 90% tienen una naturaleza antropogénica. Los fertilizantes, los combustibles fósiles o la fijación biológica de N₂ asociada a cultivos son los principales causantes de este hecho (Seitzinger *et al.*, 2006).

Existen muy pocos estudios centrados en la dinámica del CH₄ y N₂O en los sistemas costeros, así como en el estudio de la oxidación de estos gases en la columna de agua. Concretamente en el estuario del río Guadalquivir, sólo existen cuatro trabajos centrados en la dinámica del metano y óxido nitroso (Huertas *et al.*, 2018; Sánchez-Rodríguez, 2018, 2019 y Sierra *et al.*, 2020), en los que se estudia la transferencia de estos gases internadeno a través de la interfase agua-atmósfera, así como las diferentes fuentes de CH₄ y N₂O al estuario. En ninguno de ellos se estudia la oxidación de estos gases y las implicaciones que tiene este proceso en sus distribuciones y emisiones a la atmósfera.

La mayoría de los estudios realizados sobre la oxidación de metano en la columna de agua se han realizado a temperatura ambiente. De modo que, son pocos los trabajos experimentales realizados con diferentes temperaturas e incluso diferentes salinidades. El estuario del Guadalquivir es un sistema óxico, por lo que este estudio servirá para ampliar la información actual sobre la capacidad de oxidación del metano a lo largo del gradiente de salinidad y con diferentes temperaturas en el estuario del Guadalquivir. Esto va a permitir tener un mayor conocimiento del comportamiento de estos gases invernadero en dicho estuario y, por ende, en los sistemas costeros.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en obtener un mayor conocimiento sobre la distribución y reactividad del metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) en el estuario del río Guadalquivir. Para alcanzar este objetivo se formularon los siguientes objetivos específicos:

- Establecer e interpretar la variabilidad espacial de las concentraciones de CH₄ y N₂O, en base a las variaciones de distintas variables fisicoquímicas como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto a lo largo del estuario del Guadalquivir.
- Estudiar la variabilidad de los flujos de CH₄ y N₂O a través de la interfase agua-atmósfera a lo largo del gradiente de salinidad. Establecer si la zona de estudio actúa como fuente o sumidero de estos gases invernadero.
- Estimar la velocidad de oxidación de CH₄ y de producción de N₂O en la columna de agua de este sistema estuárico mediante un ensayo de incubación a distintas salinidades y temperaturas e interpretar los resultados obtenidos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio

El estudio se ha llevado a cabo en el estuario del Guadalquivir (Figura 2) situado al suroeste de la península Ibérica. Posee una longitud de 110 km desde su desembocadura en Sanlúcar de Barrameda hasta la presa en Alcalá del Río (Díez-Minguito *et al.*, 2012). Con una superficie de unas 185.000 ha conforma el estuario más importante de la cuenca suratlántica de la península Ibérica.

A lo largo del curso del Guadalquivir se han realizado diversas actuaciones de origen antropogénico que han modificado su configuración natural, lo cual le confiere una especial singularidad. El Guadalquivir es el único río navegable de España y permite la navegación entre

Sanlúcar de Barrameda y el Puerto de Sevilla. La profundidad media del canal es de 7,1 m (Díez-Minguito *et al.*, 2012) pero son necesarios dragados periódicos que permitan mantener la cota mínima constante en 6,5 m de profundidad (Álvarez *et al.*, 2001; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2019). Estas actuaciones se han asociado a episodios de elevada turbidez en el propio estuario (Navarro *et al.*, 2011).

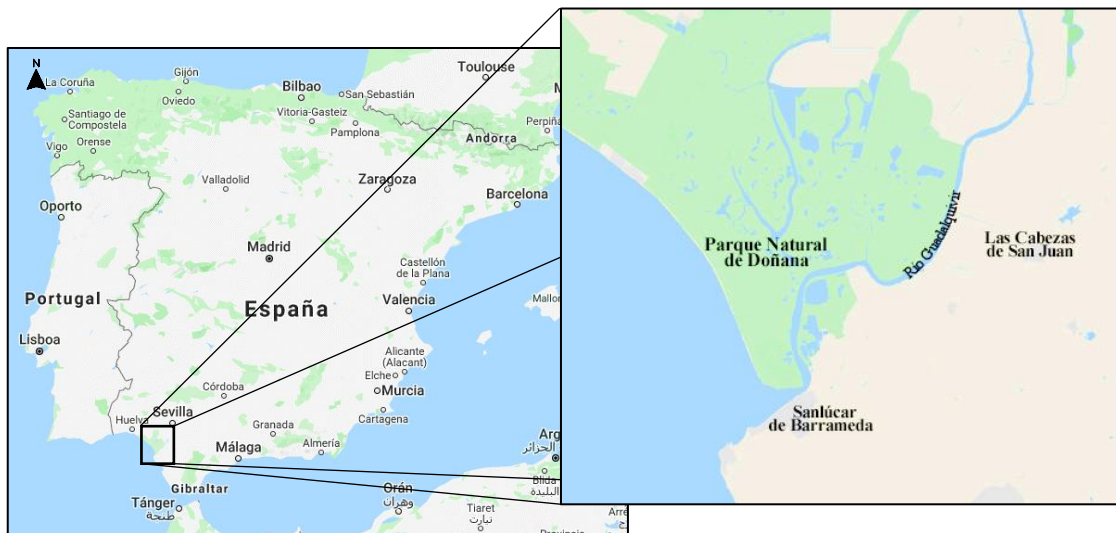


Figura 2: Mapa del estuario del Guadalquivir ubicado al suroeste de la península Ibérica, desembocando en el océano Atlántico.

Al localizarse su desembocadura en el golfo de Cádiz, la dinámica de marea en el interior del estuario se halla condicionada por el océano Atlántico. Presenta un periodo principal de mareas de tipo semidiurno y una amplitud de rango mesomareal. La hidrodinámica está controlada por el régimen fluvial, la afluencia de las mareas, la acción de las olas y las corrientes de deriva, así como el clima (Díez-Minguito *et al.*, 2012).

El estuario, que alberga amplias zonas de marisma y forma parte del Parque Nacional de Doñana, ha visto, en los últimos 50 años, como ha ido desapareciendo una parte sustancial (más de un 80%) de los bosques y los humedales que se han convertido en tierras de cultivo (la agricultura intensiva se practica en las marismas fuera del Parque, siendo el arroz el cultivo principal) y asentamientos urbanos. Con la construcción de embalses, para hacer frente a la demanda agrícola, las contribuciones de agua dulce al estuario han disminuido en promedio un 60% desde 1931, siendo esta disminución más marcada en los ciclos de año seco (Díez-Minguito *et al.*, 2012; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2019).

Todos los factores mencionados han provocado que se den variaciones en el régimen de descargas de agua dulce. Esto favorece la progresiva salinización del estuario, la aparición de

periodos de turbidez por la escasa renovación de aguas, o el aumento de nutrientes y metales pesados en las aguas del cauce.

3.2. Toma de muestras

3.2.1. Estrategia de muestreo

La toma de muestras se realizó durante la campaña GD6, el 18 de marzo de 2021, a bordo del Buque Oceanográfico UCADIZ. Se llevó a cabo un transecto desde la desembocadura del río Guadalquivir hasta la altura de Las Cabezas de San Juan (Sevilla) (Figura 2) con un total de 8 estaciones cuya localización se muestra en la tabla 1. El transecto longitudinal se realizó a favor del gradiente de salinidad, comenzando desde la zona más salina hacia la más fluvial y tomando muestras cada 4 unidades de salinidad aproximadamente. El intervalo de salinidad varió entre 35,34 en la primera estación, hasta 1,92 en la octava y última estación. Es reseñable que el estuario del Guadalquivir es verticalmente homogéneo, sin importantes cambios de salinidad con la profundidad en la columna de agua (Díez-Minguito *et al.*, 2012).

Tabla 1: Coordenadas de las ocho estaciones de muestreo en el transecto longitudinal realizado el 18 de marzo de 2021 en el estuario del Guadalquivir (GD6).

Cod. Muestra	Latitud	Longitud
GD6-1	36°46'39.7"N	6°24'00.0"O
GD6-2	36°50'29.8"N	6°21'23.6"O
GD6-3	36°51'43.3"N	6°21'14.4"O
GD6-4	36°53'24.7"N	6°20'45.9"O
GD6-5	36°54'26.9"N	6°17'32.9"O
GD6-6	36°53'53.1"N	6°15'49.0"O
GD6-7	36°54'18.7"N	6°12'52.1"O
GD6-8	36°58'34.8"N	6°10'16.2"O

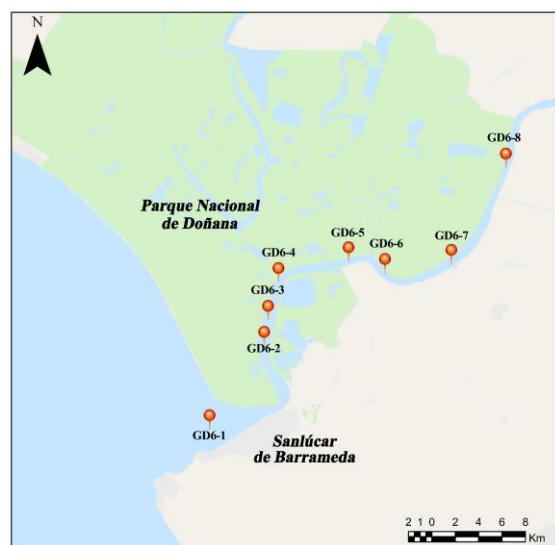


Figura 3: Localización de las estaciones de muestreo a lo largo del gradiente de salinidad en el estuario del Guadalquivir durante la campaña de marzo de 2021 (GD6).

Para el estudio de reactividad de CH_4 y N_2O en la columna de agua se tomaron un total de 4 muestras del continuo del buque en garrafas de 25 litros, concretamente en las estaciones GD6-1, GD6-3, GD6-5 y GD6-8 (Figura 3) correspondientes a las salinidades 35,34; 23,09; 14,31 y 1,92. Éstas se dejaron reposar y decantar hasta el día siguiente que se procedió a realizar la fase experimental. También se midió la concentración de oxígeno disuelto (OD) para estas cuatro salinidades.

Para la estimación del flujo de gases invernadero (CH_4 y N_2O) a través de la interfase agua-atmósfera a lo largo del gradiente de salinidad se cogieron muestras en las 8 estaciones seleccionadas. Éstas se tomaron del continuo del barco por duplicado en frascos Winklers de 250 mL y se fijaron con cloruro de mercurio (HgCl_2) para inhibir cualquier proceso biológico en el interior. Los frascos se llenaron evitando que se quedaran en el interior burbujas de aire. Se sellaron con grasa Apiezon® para prevenir el intercambio gaseoso con la atmósfera. Para la recogida de muestras de OD también se utilizaron Winklers de 250 mL, en este caso, uno por estación y fueron fijadas a bordo. Todos los frascos, 24 en total, se forraron con papel de aluminio y se almacenaron en oscuridad, para evitar que se produjeran posibles reacciones fotoquímicas, hasta su posterior medida en el laboratorio.

3.2.2. Medidas en continuo

Los valores de las variables salinidad (S), temperatura (T) y pH en las aguas superficiales se obtuvieron a partir de los equipos conectados al continuo del barco.

La salinidad y la temperatura se midieron con un termosalinógrafo (Seabird, SBE-45). Las medidas en continuo de pH se realizaron mediante un electrodo de vidrio (SubCtech/Meinsberg, MV-4010U).

3.3. Métodos analíticos

La determinación de las concentraciones de CH_4 y N_2O disueltos se realizaron mediante un cromatógrafo de gases (Bruker®, GC-450) con un detector de captura de electrones (ECD) para el óxido nítrico y con un detector de ionización de llama (FID) para el metano (Weiss, 1981). Para ello, fue necesaria la calibración con tres patrones estándar preparados por LINDE que presentaban las siguientes concentraciones de CH_4 y N_2O , respectivamente: 1,95 ppm y 0,30 ppm en el primer patrón, 3,00 ppm y 0,40 ppm en el segundo, y 100,00 ppm y 2,00 ppm en el último. El primer patrón presenta concentraciones similares a las de la atmósfera.

Gracias a la configuración del instrumento, el análisis de CH₄ y N₂O se puede realizar de forma simultánea: una electroválvula permite que, una vez se inyecte la muestra, ésta se dirija a dos *loops* que están conectados a diferentes columnas cromatográficas y detectores (Burgos *et al.*, 2015).

El análisis de gases se realizó mediante la técnica de equilibrio del espacio de cabeza utilizada anteriormente por autores como Sierra *et al.* (2017). De las muestras se tomaron 25 g (\pm 0.01 g) mediante una jeringa de cristal de 50 mL (Agilent P/N 5190-1547) y se le añadieron 25 mL del primer patrón para completar el volumen total de la jeringa. Ésta se llevó a un agitador durante 5 minutos para equilibrar la muestra y se dejó reposar otros 5 minutos. Transcurrido este tiempo se inyectó en el cromatógrafo.

Para el cálculo de las concentraciones de los gases disueltos en las muestras de agua se ha hecho uso de las solubilidades propuestas por Wiesenburg y Guinasso (1979) para el CH₄ y por Weiss y Price (1980) para el N₂O.

La determinación del oxígeno disuelto (OD) se realizó mediante una adaptación del método iodométrico tradicional de Winkler (Grasshoff y Ehrhardt, 1983). La concentración de OD se cuantifica mediante un valorador potenciométrico (Metrohm, 905) utilizando un electrodo combinado de potencial redox (Metrohm, *ref.* 0431.100) y tiosulfato sódico (0,01 M) como solución valorante. La precisión de la medida es de \pm 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Sierra *et al.*, 2017). Para el cálculo de la Utilización Aparente de Oxígeno (AOU) se utilizó la expresión de solubilidad propuesta por Weiss (1974).

El contenido en sólidos en suspensión (SS) se ha obtenido por filtración a través de filtros de 0,7 μm (Whatman, GF/F).

3.4. Fase experimental: Reactividad de gases

Para el estudio de reactividad de CH₄ y N₂O se diseñó un experimento en el que se consideraron 2 temperaturas de incubación (12 y 25°C) correspondientes al valor máximo y mínimo registrado en el estuario del Guadalquivir (Sánchez-Rodríguez, 2018, 2019; Sierra *et al.*, 2020). Se han utilizado cuatro salinidades (1,9; 14,3; 23,1 y 35,3) y 10 tiempos de incubación (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 124 y 148 horas). Para cada muestra se han tomado 3 réplicas, por lo que se incubaron y analizaron un total de 240 muestras.

Una vez realizada la recogida de muestras en las garrafas, fueron llevadas al laboratorio y se quedaron en reposo decantando durante toda la noche (aproximadamente 15 horas). Se busca,

con esta acción, que la mayoría de sólidos en suspensión presentes en la garrafa se depositen en el fondo y así, evitar posibles interferencias o procesos que afecten al objetivo de este estudio. Trascurrido este tiempo, a la mañana siguiente, se procedió al llenado de los viales.

Para realizar correctamente el proceso de llenado de los viales de incubación (Figura 4) se diseñó un sistema de extracción del agua de las garrafas con tubos de silicona ayudados por una bomba peristáltica. Para crear una atmósfera inerte y así evitar los procesos de oxidación en el agua de las garrafas al mismo tiempo que esta se extraía para el llenado de los viales se introdujo nitrógeno en el interior de las garrafas. La muestra salía de la garrafa a través de tubo de silicona que se introducía hasta el fondo del vial, llenándose éste poco a poco para evitar la formación de burbujas. La capacidad de dicho vial es de 21,82 mL. Una vez que rebosaba la muestra del vial se procedió al sellado de éste herméticamente con un septum. Para poder sellarlo correctamente se hizo uso de una crimpadora y fue necesario introducir una aguja en el tapón de goma del septum que permitiera la salida de la muestra sobrante al realizarse el cierre hermético, lo que evita la formación de burbujas.



Figura 4: Proceso de llenado de viales para el experimento de incubación.

Una vez llenados y sellados los viales se fijaron las muestras del tiempo de incubación 0. A cada vial, a través del septum, se le inyectaron con una jeringa 50 μ L de una solución de HgCl_2 saturada para inhibir cualquier proceso o actividad biológica. Durante la inyección de HgCl_2 , para compensar la presión atmosférica, se colocó una aguja en el septum que permitió que saliera el exceso de muestra. Para cada tiempo de incubación se llenaron un total de 24 viales (3 réplicas por cada salinidad y por cada temperatura). Las muestras se introdujeron en las dos cámaras de incubación, una a 12 $^{\circ}\text{C}$ y la otra a 25 $^{\circ}\text{C}$ y se taparon con una bolsa oscura para

impedir posibles reacciones fotoquímicas. A los diferentes tiempos de incubación fijados, las muestras fueron extraídas de las cámaras y fijadas con HgCl_2 . Las muestras fijadas fueron conservadas a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su cuantificación en el laboratorio.

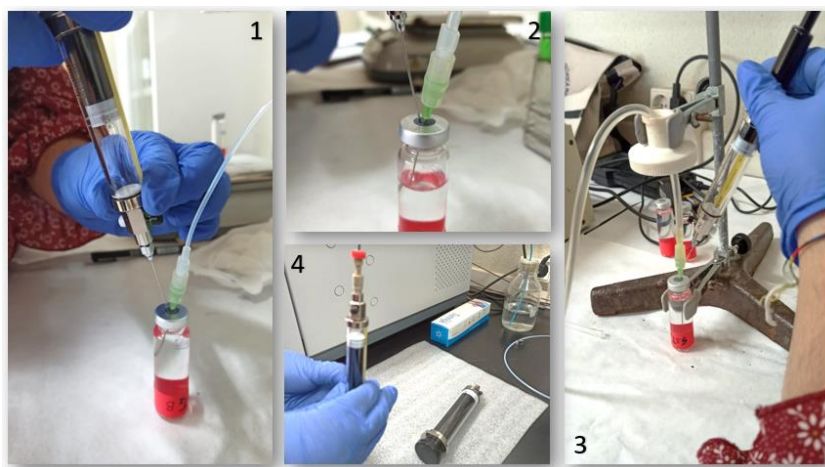


Figura 5: Proceso de extracción de gas para la medición con cromatografía de gases.

Una vez finalizada la parte experimental, se cuantificó el CH_4 y el N_2O de los viales incubados (Figura 5). En primer lugar, se pesó cada vial y se generó el espacio de cabeza en cada uno de ellos. Para ello, se les inyectó, a través del septum, 8 mL de un gas patrón con mezcla de gases de composición similar a la atmosférica (1,95 ppm de CH_4 y 0,30 ppm de N_2O) con una jeringuilla de cristal de 10 mL (Agilent P/N 5190-1547). Para realizar este proceso se inyectó el patrón en el vial con la ayuda de una segunda aguja (clavada en el septum) de unos 50 mm que permitía que la muestra sobrante saliera del vial manteniendo la presión en el interior. Se volvió a pesar el vial con el espacio de cabeza creado para conocer con exactitud el espacio de cabeza generado. Posteriormente, se agitó vigorosamente durante unos 20 segundos para acelerar la equilibración entre las fases agua-atmósfera creadas en el interior. A continuación, el vial se colocó en un agitador durante 5 minutos para seguir equilibrando ambas fases y se dejó reposar otros 5 minutos. Trascurrido este tiempo se extrajo la fase gaseosa del vial y, para ello, se colocó en el septum una aguja que, gracias a la ayuda de una bomba peristáltica, introducía en el vial una solución concentrada de cloruro potásico. A su vez, con una jeringa de cristal (Agilent P/N 5190-1547) de 10 mL se extraían unos 7 mL de la fase gaseosa que posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo de gases, lo que permitió obtener un cromatograma que serviría de base para conocer la concentración de metano y óxido nítrico en la muestra medida.

Las velocidades de consumo o producción del CH₄ y N₂O para cada una de las salinidades y temperaturas utilizadas en el experimento fueron obtenidas a partir de los ajustes lineales de las variaciones de concentración del gas con el tiempo de incubación.

Para la medida de OD se utilizaron un total de 80 Winklers de 250 mL (8 por cada tiempo de incubación: 4 para las salinidades y por las dos temperaturas). Las muestras se tomaron de las 4 garrafas a continuación de los viales y con el mismo mecanismo: el tubo de silicona se introducía hasta el fondo llenando poco a poco el Winkler para evitar la formación de burbujas. Para el tiempo de incubación 0 se fijaron los que correspondían a este instante. El resto, una vez llenados y sellados, se introdujeron en las cámaras de incubación a las dos temperaturas seleccionadas para su posterior fijación respetando los tiempos de incubación. La fijación de los viales y de los Winklers se realizó simultáneamente y las muestras de OD fijadas se conservaron a temperatura ambiente y oscuridad hasta su análisis.

3.5. Cálculos de flujos con la atmósfera

Los flujos de CH₄ y N₂O que se producen a través de la interfase agua-atmósfera se han calculado haciendo uso de la siguiente expresión:

$$F = k (C_w - C^*)$$

Donde k (cm·h⁻¹) es la velocidad de transferencia del gas, C_w (μM) es la concentración del gas en el agua y C^* (μM) es la solubilidad propuesta por Wiesenburg y Guinasso (1979) para el CH₄ y por Weiss y Price (1980) para el N₂O, y que dependen de la concentración del gas en la atmósfera, la temperatura y la salinidad de la muestra. Como resultado, si el flujo es positivo, indica que se produce transferencia del gas desde el agua a la atmósfera.

La concentración en la atmósfera de CH₄ (https://gml.noaa.gov/ccgg/trends_ch4/) y N₂O (https://gml.noaa.gov/ccgg/trends_n2o/) se ha obtenido a partir de la página web oficial de la NOAA. Para ambos gases se ha tomado el valor medio mundial para el mes en el que se realizó la campaña. De modo que, los valores utilizados para la concentración de CH₄ y N₂O en la atmósfera son 1893,4 ppb y 333,9 ppb, respectivamente.

Para el cálculo de k , que hace referencia a la velocidad de transferencia, se ha usado la parametrización propuesta por Jiang *et al.* (2008) para sistemas costeros:

$$K = 0,314 u^2 - 0,436 u + 3,990(Sc/600)^{-0,5}$$

Siendo u la velocidad del viento a 10 m de altura ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) y Sc el número de Schmidt para cada gas. Este último es específico para cada gas y se ha calculado a partir de las expresiones propuestas por Wanninkhof (2014) para salinidades de 0 y 35, suponiendo que el número de Schmidt varía linealmente con la salinidad. La velocidad del viento se ha obtenido del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA, Junta de Andalucía) consultando los datos de la estación meteorológica más cercana a la zona de muestreo que se encuentran disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/riaweb/web/estacion/11/101>. Para el día de muestreo la velocidad del viento fue de $2,2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.6. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se ha usado el test de correlación de Pearson estableciendo correlaciones entre las variables. Gracias al software Sigma Plot versión 11.0 se han obtenido las correlaciones lineales y las figuras expuestas en este trabajo.

4. RESULTADOS

4.1. Variaciones longitudinales en el estuario del Guadalquivir

En la figura 6 se muestra la variación con la distancia a costa de la temperatura y la salinidad. La temperatura sólo varió $0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ a lo largo del estuario, con el valor más bajo en la desembocadura del río ($16,6 \text{ }^\circ\text{C}$).

La salinidad disminuye de forma lineal desde la desembocadura, con un valor de $35,3$, hasta la zona más interna donde se obtuvo un valor de $1,9$.

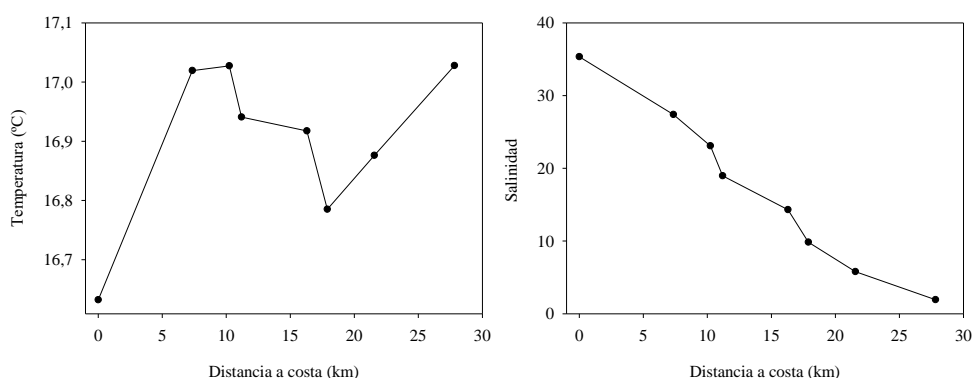


Figura 6: Variación de la temperatura ($^\circ\text{C}$) y salinidad respecto a la distancia a costa en el estuario del Guadalquivir el 18 de marzo de 2021.

En la figura 7 se representa la variación del contenido en sólidos en suspensión (SS), pH y oxígeno disuelto (OD) con la salinidad. Se observa una aumento de SS hacia el interior del

estuario pasando de un valor de $0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en la desembocadura a un valor máximo de $1,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en la estación más fluvial.

El pH aumenta con la salinidad, con un valor de 7,86 en la zona fluvial del estuario y de 8,06 en la desembocadura. Entre salinidades de 23 y 27, los valores de pH se mantienen prácticamente constantes (7,93).

En el caso del oxígeno disuelto, la tendencia general es aumentar su concentración a medida que disminuye la salinidad. En la desembocadura, con la salinidad máxima, se obtuvo un valor el valor mínimo de $172,8 \mu\text{M}$ y el máximo de $245,2 \mu\text{M}$ a salinidad 5,7. Cabe destacar que a salinidad 14 hay una pequeña disminución de la concentración de OD.

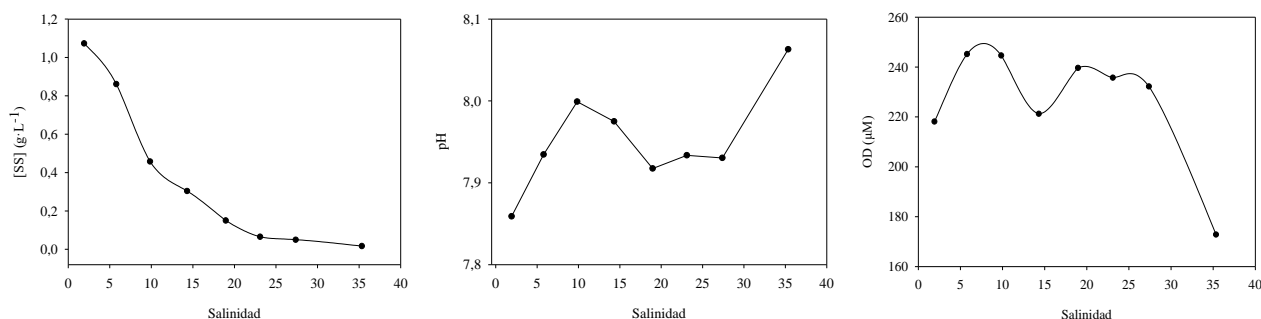


Figura 7: Variación de los sólidos en suspensión (SS), pH y oxígeno disuelto (OD) con la salinidad en el estuario del Guadalquivir el 18 de marzo de 2021.

Como se aprecia en la figura 8 tanto el CH_4 como el N_2O aumentan sus concentraciones hacia la zona menos salina. Esta tendencia es prácticamente lineal en el caso del N_2O . El CH_4 presenta un valor mínimo de $12,7 \text{ nM}$ en la desembocadura del estuario y, en torno a valores de salinidad 14, alcanza la máxima concentración ($42,6 \text{ nM}$). A las salinidades más bajas se registra una disminución de la concentración llegando a valores próximos a $22,0 \text{ nM}$. Cabe destacar que se midió un valor de $463,2 \text{ nM}$ a salinidad 27 que ha sido eliminado del gráfico por tratarse de un dato anómalo.

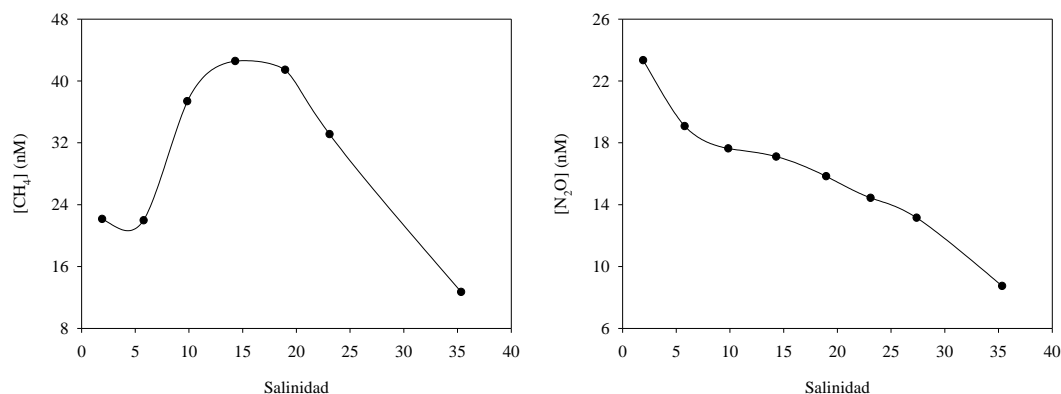


Figura 8: Variación de la concentración de metano (CH_4) y de óxido nitroso (N_2O) con la salinidad en el estuario del Guadalquivir el 18 de marzo de 2021.

El N_2O presenta la máxima la concentración en el interior del estuario (23,2 nM) y va disminuyendo progresivamente hasta llegar a los 8,7 nM en la desembocadura.

En la figura 9 se presentan los flujos a través de la interfase agua-atmósfera de CH_4 y N_2O a lo largo del gradiente longitudinal del estuario del Guadalquivir.

Los flujos de metano varían entre 12,3 y 48,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ a lo largo del gradiente de salinidad, con el valor mínimo en la primera estación de muestreo (GD6-1) y el máximo en la estación 5 (GD6-5). En las tres últimas estaciones, donde la salinidad es menor, se han registrado valores comprendidos entre 23,9 y 43,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$.

Los flujos de N_2O muestran un aumento progresivo a medida que se avanza hacia el interior del estuario, al igual que ocurre con la concentración de N_2O . A salinidades altas el flujo de nitroso decrece hasta llegar a una situación prácticamente de equilibrio con la atmósfera en la desembocadura con un valor en la estación 1 (GD6-1) de 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$. El valor máximo de flujo (15,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) se ha obtenido en la última estación (GD6-8). En las estaciones 5 y 6 (GD6-5 y GD6-6, respectivamente) el flujo se mantiene constante con valores próximos de 9,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$.

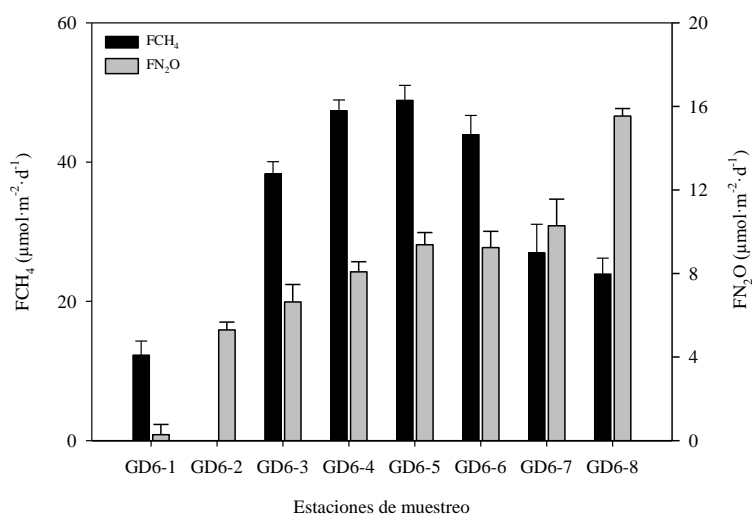


Figura 9: Flujos a través de la interfase agua-atmósfera de CH_4 ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) y N_2O ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) en cada estación de muestreo en el estuario del Guadalquivir.

4.2. Experimento de incubación

En la tabla 2 se muestran los valores medios y la desviación estándar de la concentración de metano y óxido nitroso obtenidos durante el experimento de incubación. Ambos gases presentan un aumento de la concentración con la disminución de la salinidad en las dos temperaturas de incubación. Cabe destacar que esta tendencia en el CH_4 se produce entre las salinidades de 14,3 y 35,3, pues a la salinidad mínima de trabajo (1,9) la concentración de CH_4

presenta un valor mínimo. Si se analizan los valores medios de concentración de CH₄ y N₂O en función de la temperatura, éstos han sido superiores a mayor temperatura (25 °C) con un aumento leve en la mayoría de salinidades.

Tabla 2: Valores medios y desviación estándar de la concentración de CH₄ y de N₂O obtenidos en el experimento de incubación a dos temperaturas para cuatro salinidades diferentes.

Estación	Salinidad	t (°C)			
		25 °C		12 °C	
		[CH ₄] (nM)	[N ₂ O] (nM)	[CH ₄] (nM)	[N ₂ O] (nM)
GD6-1	35,3	13,7 ± 0,7	10,4 ± 0,1	12,9 ± 0,5	10,4 ± 0,1
GD6-3	23,1	16,9 ± 1,7	13,2 ± 0,2	13,4 ± 0,8	14,1 ± 0,1
GD6-5	14,3	21,1 ± 0,8	16,4 ± 0,2	20,2 ± 0,9	15,6 ± 0,2
GD6-8	1,9	12,6 ± 0,6	20,9 ± 0,2	12,4 ± 1,1	20,7 ± 0,5

En la tabla 3 se muestran las velocidades de oxidación/producción que se han estimado para el CH₄ en el experimento de incubación. Cuando el valor es negativo se indica un consumo del gas, por el contrario, se habrá dado producción cuando el valor es positivo.

A salinidades altas (23,1 y 35,3) las velocidades de reacción del CH₄ son muy bajas, inferiores a ± 0,02 nmol·m⁻²·d⁻¹, y las regresiones lineales obtenidas no son significativas. A salinidades más bajas se aprecia la existencia de procesos de oxidación de CH₄ durante las incubaciones, aunque los coeficientes de regresión lineal sólo son aceptables a salinidad de 1,9.

Tabla 3: Velocidades de oxidación (valor negativo) y producción (valor positivo) de metano (CH₄) y coeficientes de regresión lineal r² para cuatro salinidades diferentes a dos temperaturas. Las velocidades (V) están expresadas en nmol·m⁻²·d⁻¹.

Estación	Salinidad	25 °C		12 °C	
		V	r ²	V	r ²
GD6-1	35,3	0,016	-	0,016	-
GD6-3	23,1	-0,004	-	0,0004	-
GD6-5	14,3	-0,117	0,18	-0,128	0,09
GD6-8	1,9	-0,133	0,54	-0,289	0,81

El óxido nitroso se produce a salinidades altas (23,1 y 35,3) con valores superiores a la temperatura de 12 °C. Sin embargo, a la salinidad de 14,3 se produce un consumo del gas durante la incubación. A salinidad 1,9 a la temperatura de 12 °C es consumido durante la incubación y, sin embargo, a 25 °C el proceso que domina es la producción del gas. A salinidad de 23,1, las regresiones lineales usadas para la estimación de las velocidades de reacción no son significativas.

Tabla 4: Velocidades de consumo (valor negativo) y producción (valor positivo) de óxido nitroso (N_2O) y coeficientes de regresión lineal r^2 para cuatro salinidades diferentes a dos temperaturas. Las velocidades (V) están expresadas en $nmol \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$.

Estación	Salinidad	25 °C		12 °C	
		V	r^2	V	r^2
GD6-1	35,3	0,051	0,26	0,062	0,25
GD6-3	23,1	0,018	-	0,056	-
GD6-5	14,3	-0,046	0,51	-0,098	0,35
GD6-8	1,9	0,156	0,31	-0,264	0,58

Los valores positivos de la Utilización Aparente de Oxígeno (AOU) indican consumo de oxígeno y, los negativos producción. Atendiendo a los resultados presentados en la tabla 5 se observan valores positivos de AOU durante todos los experimentos de incubación, siendo máximos a salinidad 1,9 y mínimos a salinidad 35,1 con desviaciones superiores a mayor temperatura. Este comportamiento, a menor salinidad mayor valor de AOU y, por tanto, mayor consumo de oxígeno, se refleja también en la figura 10 donde se aprecia la buena correlación lineal de la AOU con la salinidad para las dos temperaturas del experimento (r^2 de 0,98 a 25 °C y r^2 de 0,96 a 12 °C).

Tabla 5: Valores medios ($\mu mol \cdot L^{-1}$) y desviación estándar de la utilización aparente de oxígeno (AOU) obtenidos en el experimento de incubación a dos temperaturas para cuatro salinidades diferentes.

Estación	Salinidad	t (°C)	
		25 °C	12 °C
GD6-1	35,3	$8,7 \pm 11,7$	$16,9 \pm 11,2$
GD6-3	23,1	$19,7 \pm 13,4$	$34,1 \pm 7,4$
GD6-5	14,3	$34,8 \pm 13,3$	$36,8 \pm 2,4$
GD6-8	1,9	$49,6 \pm 5,3$	$55,6 \pm 2,4$

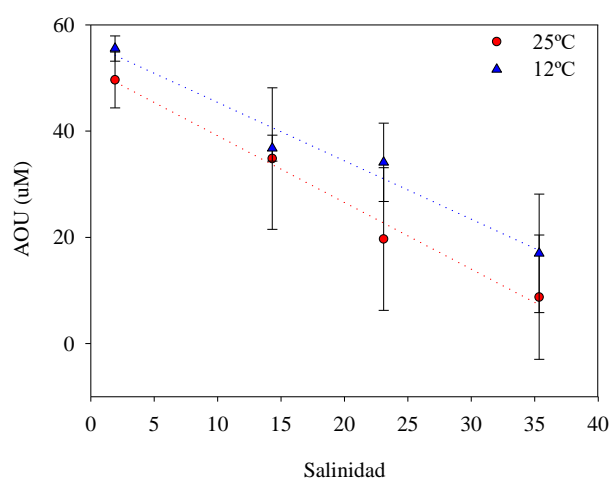


Figura 10: Variación de la Utilización Aparente de Oxígeno (AOU) con la salinidad obtenida en el experimento de incubación a dos temperaturas diferentes.

5. DISCUSIÓN

5.1. Dinámica de gases internadero

El oxígeno disuelto al igual que los gases internadero aumenta su concentración hacia el interior del estuario, con un intervalo de variación de 172,8-245,2 μM . En otros estudios realizados en el estuario del Guadalquivir por De la Paz *et al.* (2007), Sánchez-Rodríguez (2018) y Sierra *et al.* (2020), obtuvieron concentraciones de OD similares a los descritos en este estudio, con valores de AOU más bajos en la desembocadura asociado a una alta actividad fotosintética.

Las variaciones longitudinales de las concentraciones de CH_4 y N_2O en el estuario del Guadalquivir son sustancialmente diferentes. Mientras que el aumento hacia el interior del estuario de N_2O es lineal con la salinidad ($r^2=0,95$), la concentración de CH_4 presenta un valor máximo a salinidades comprendidas entre 10 y 20. Sierra *et al.* (2020) describieron variaciones longitudinales similares para el CH_4 y el N_2O , con un acusado aumento de sus concentraciones a salinidades más bajas que las consideradas en este estudio. Ferrón *et al.* (2010) obtuvieron valores de metano similares en la desembocadura del Guadalquivir que variaban entre los 2,46 y los 18,55 nM, y Huertas *et al.* (2018) encontraron intervalos de variación entre 14 y 750 nM para el CH_4 , y entre 3 y 34 nM para el N_2O . Osudar *et al.* (2015) también presentaron intervalos de variación similares en el estuario del río Elba (Alemania), aunque en su caso la concentración de CH_4 mostraba una variación lineal con la salinidad. Matoušů *et al.* (2017) encontraron una intensa sobresaturación de CH_4 en la columna de agua en el estuario del río Elba (Alemania).

Como se ha comentado anteriormente, y como describen autores como Abril y Borges, (2005) o Huertas *et al.* (2018); las altas concentraciones de sulfato, presente en la zona marina, permite a las bacterias reductoras de sulfato competir con las metanogénicas. De este modo, la producción de CH_4 se inhibe y se ve reducida su concentración en la zona marina. La distribución de estos gases se ve afectada por factores como los aportes de materia orgánica y nutrientes que recibe el estuario o las entradas laterales de las marismas circundantes, así como desde el propio río. Por otra parte, las variaciones longitudinales de los gases internadero pueden estar afectadas por los cambio de intensidad de la producción bentónica a lo largo del estuario. El hecho de que el metano presente máximos relativos a salinidades intermedias en el estuario del Guadalquivir se ha relacionado con las entradas laterales desde zonas de marismas procedentes del cultivo de arroz (Sierra *et al.*, 2020; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2021).

Si se analiza la correlación lineal entre CH₄ y AOU, se encuentra que existe una relación inversa, lo que sugiere que la producción de CH₄ se encuentra relacionada con los procesos de oxidación de la materia orgánica que tiene lugar principalmente en el sedimento. A este respecto, el estuario del Guadalquivir se caracteriza por presentar una intensa sobresaturación de CH₄ (porcentaje medio de saturación de 1175,9 % ± 50,2). Reeburgh, (2007) considera que la principal fuente de CH₄ en estos sistemas es la metanogénesis que se produce en el sedimento debido a la actividad bacteriana. De esta forma, la difusión desde el sedimento es la entrada de CH₄ al estuario, ya que la metanogénesis se produce en sedimentos anaeróbicos con independencia de que la columna de agua se encuentre bien oxigenada (Bridgham *et al.*, 2013).

Por el contrario, el N₂O, con un porcentaje medio de saturación 173,6 % ± 8,1, presenta valores inferiores a los medidos en otros trabajos en el estuario del Guadalquivir (Sánchez-Rodríguez, 2018; Sierra *et al.*, 2020), debido a que la zona estudiada por estos autores comprende estaciones situadas más hacia el interior del estuario. Al encontrarnos con concentraciones de oxígeno elevadas, la desnitrificación no parece ser el principal mecanismo que justifique la sobresaturación de N₂O, ya que según Capone *et al.* (2008), en estas condiciones no actúan las bacterias desnitrificantes y el proceso dominante sería la nitrificación. A este respecto, Meyer *et al.* (2008) afirmaron que la nitrificación es el principal proceso de producción de óxido nítrico en los sedimentos, por lo que los sedimentos funcionarían como fuente de N₂O a la columna de agua.

Los flujos de CH₄ y N₂O siguen una variación longitudinal en el estuario similar a la que experimenta la concentración de estos gases. Ambos flujos aumentan cuando la salinidad disminuye y son positivos en todas las estaciones de muestreo variando en un intervalo comprendido entre 12,3 y 48,9 μmol·m⁻²·d⁻¹ para el CH₄ y entre 0,3 y 15,5 μmol·m⁻²·d⁻¹ para el N₂O. Por lo tanto, el estuario del Guadalquivir se comporta como una fuente de estos dos gases con efecto invernadero a la atmósfera. Estos valores de flujo están dentro del intervalo de variación encontrados en otros sistemas estuáricos (Tabla 6). Huertas *et al.* (2018) obtuvo para el flujo del metano un intervalo de variación superior al encontrado en este estudio para la misma zona y época del año (13,00-180,00 μmol·m⁻²·d⁻¹). Sierra *et al.*, 2020 también han descrito valores superiores para los flujos de ambos gases en la zona interna del estuario.

Los flujos de N₂O recogidos en la tabla 6 para diferentes sistemas costeros muestran intervalos, en la mayoría de los casos, superiores al descrito en este estudio. Autores como Burgos *et al.* (2015) o Sierra *et al.* (2020) hablan de la importancia de las descargas de agua dulce o lluvias

presentes en diferentes sistemas sobre la intensidad del intercambio de N₂O con la atmósfera. Sánchez-Rodríguez (2018) analizó los flujos para marzo y abril de 2018 en el estuario del Guadalquivir y concluyó que, aunque durante el mes de marzo se produjeron fuertes descargas de agua dulce, las temperaturas de abril fueron superiores facilitando la transferencia de estos gases a la atmósfera al disminuir, en consecuencia, la solubilidad.

Tabla 6: Flujos interfase agua-atmósfera de CH₄ y N₂O en diferentes sistemas costeros.

Sistema	Fecha	FCH ₄ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	FN ₂ O ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	Referencia
Bahía de Fundy (Canadá)	July-Sep. 1993	12,5-687,5	-	Magenheimer <i>et al.</i> (1996)
Río San Pedro (España)	Feb.-Oct. 2004	34-155	24-62	Ferrón <i>et al.</i> (2007)
Zona de surgencia de Chile	2002- 2011	-	-6-122,2	Meneses, V. (2013)
Estuario del Tajo (Portugal)	Mayo 2007	-	0,2-10,4	Gonçalves, C. (2010)
Isla de Andamán (India)	Ab.-Ag. 2005-06	110-470	-	Linto <i>et al.</i> (2014)
Río Guadalete	Nov. 2012	20,3-3645,7	65-204,2	Burgos <i>et al.</i> (2015)
Estuario North Creek (Australia)	Enero 2013	7-51	-	Maher <i>et al.</i> (2015)
Río Guadalquivir (España)	Mayo 2017	13-1100	-7-35	Huertas <i>et al.</i> (2018)
	Mar.-Ab. 2018	2,01-179,58	-1,86-64,57	Sánchez-Rodríguez (2018)
	Julio 2017	46-138	4,3-14,1	Sierra <i>et al.</i> (2020)
	Marzo 2021	13,3-48,9	0,3-15,5	Este estudio

5.2. Reactividad de gases en la columna de agua

Matoušů *et al.* (2019) afirman que son pocos los estudios centrados en la oxidación de gases como el metano en sistemas estuáricos, y el conocimiento actual de los factores ambientales que afectan a este proceso es muy limitado. Sierra *et al.* (2020) realizaron un estudio sobre los factores que afectan a la variabilidad del CH₄ y del N₂O en distintos estuarios de la cuenca suratlántica de la península Ibérica, y llegaron a la conclusión que los procesos biogeoquímicos relacionados con su producción o consumo constituyen la principal causa de la variabilidad espacio temporal de la concentración de estos gases invernadero, con una contribución significativamente mayor que la producida por los cambios térmicos, las variaciones de salinidad o las emisiones a la atmósfera.

El experimento de incubación realizado a lo largo del gradiente de salinidad del Guadalquivir no ha dado lugar a resultados claros sobre la influencia de la temperatura y la salinidad sobre la oxidación de CH₄. El comportamiento esperado consiste en la disminución progresiva de la concentración de CH₄ a medida que aumenta el tiempo de incubación. Sin embargo, en las dos

primeras salinidades estudiadas (35,3 y 29,1), la concentración de metano se mantiene prácticamente constante con el tiempo y, por tanto, no se aprecia la existencia de reacciones de oxidación o producción. Adicionalmente los replicados de las medidas de las concentraciones de CH₄ presentan elevadas desviaciones estándar que hace que los coeficientes de regresión lineal usados para el cálculo de la velocidad de reacción no sean estadísticamente significativos ($r^2 < 0,1$). En las incubaciones realizadas con muestras de salinidad más baja se aprecia una disminución relativamente suave de la concentración con el tiempo y un aumento de los coeficientes de regresión lineal, en especial en las muestras de salinidad 1,9 (tabla 3). Tampoco se han observado las variaciones previsibles de la velocidad de oxidación de CH₄ con la temperatura. Autores como Borjesson *et al.* (2004) u Osudar *et al.* (2015) encontraron una relación directa entre la velocidad de oxidación y la temperatura. Sin embargo, en los experimentos de incubación a salinidades bajas, la velocidad de oxidación de CH₄ es mayor a 12 °C que a 25 °C. No obstante, Lofton *et al.*, (2014) encontraron que en aquellos sistemas saturados de metano no se observa una influencia de la temperatura en la velocidad de oxidación en un estudio en un lago del Ártico. Del mismo modo, el hecho de que no se produzca oxidación de metano puede estar relacionado, como apuntaban Abril e Inversen (2002) para el fiordo Randers (Dinamarca) a una concentración baja de metano en el agua. Además, es probable que, eventos cortos como inundaciones o resuspensiones de sedimentos favorezcan la oxidación de metano (McClain *et al.*, 2003).

En los estudios de Hanson y Hanson (1996) y Osudar *et al.* (2015) se ha puesto de manifiesto el efecto que tiene la salinidad sobre la oxidación de metano. Estos autores atribuyen la disminución de la velocidad de oxidación de CH₄ al estrés osmótico que pueden llegar a sufrir las bacterias metanótrofas con un aumento de salinidad.

Los resultados obtenidos en los experimentos de incubación para la cuantificación de la velocidad de oxidación de CH₄ hacen plantearse la validez del diseño experimental utilizado. En la figura 11 se muestra la variación de la turbidez con la distancia a la desembocadura. Puede observarse un importante aumento de la turbidez que hace que la señal del sensor se sature a unos 40 km, donde se han medido contenidos en SS superiores a 1 g·L⁻¹. Esta elevada cantidad de material particulado puede constituir una fuente de CH₄, ya que la turbidez favorece la actividad metanogénica en el interior de la materia orgánica particulada (Abril *et al.*, 2007). En el diseño experimental, las garrafas de agua correspondientes a las distintas salinidades se dejaron decantar con objeto de disminuir el contenido de SS en los viales. De esta forma, en los viales existía una cierta cantidad de material particulado no cuantificado, y las variaciones de

la concentración con el tiempo puede ser el resultado de la disminución por oxidación y la producción procedente de la materia orgánica particulada.

Se plantean 2 posibles diseños experimentales que permitirían probablemente una mejor caracterización de la reactividad del CH_4 en sistema estuáricos. Para medir la oxidación sería conveniente realizar una filtración inicial de las muestras e incorporar el inóculo bacteriano adecuado de forma previa a las incubaciones. De esta forma, se eliminaría la influencia de la producción desde el material particulado, aunque los resultados sólo permitirían la cuantificación de la oxidación. La otra posibilidad consiste en realizar la incubación directamente en las garrafas manteniendo homogéneo el contenido de SS mediante agitación. Este experimento permitiría una mejor cuantificación del balance entre la oxidación y la producción en estuarios de elevada turbidez, y, por tanto, establecer una velocidad neta de la reactividad del CH_4 en la columna de agua.

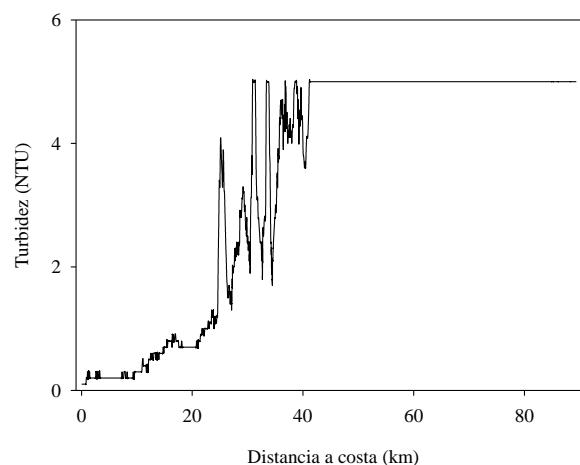


Figura 11: Evolución de la turbidez con respecto a la distancia a costa (km) en el estuario del Guadalquivir. Fuente: Sierra *et al.* (2020).

Con respecto a los experimentos de reactividad del N_2O , se observa la existencia de procesos de producción a salinidades altas y de consumo a salinidades bajas (tabla 4). La reactividad del N_2O en los estuarios se encuentra relacionada con 2 procesos, la nitrificación y la desnitrificación. Ambos procesos son capaces de producir o consumir N_2O en función de las condiciones ambientales. A este respecto, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2021) encuentran buenas relaciones lineales entre la concentración de N_2O y AOU, y sugieren que la nitrificación es el principal mecanismo de producción de N_2O en el cauce medio y alto del estuario del Guadalquivir. Por otra parte, Sierra *et al.* (2020) sugieren que existe un consumo de nitrato y una producción de N_2O por desnitrificación/nitratorreducción en la zona alta del estuario, y que tiene lugar fundamentalmente en el sedimento. Las velocidades de reacción de N_2O obtenidas

son relativamente bajas y su cálculo está basado, en algunos casos, en ajustes lineales poco significativos. A este respecto, el diseño experimental empleado tampoco permite una adecuada caracterización de los procesos que afectan a la reactividad del N_2O .

La producción de N_2O puede verse potenciada por una elevada cantidad de partículas en suspensión (Gonçalves *et al.*, 2010). Además, la mayoría de las bacterias nitrificantes se encuentran adheridas al material particulado (Stehr *et al.*, 1995), de forma que la elevada turbidez que se observa en los sistemas estuáricos contribuye a intensificar los procesos de nitrificación (Abril *et al.*, 2000; Brion *et al.*, 2000). La distinta cantidad de material particulado existente en los viales introduce una elevada incertidumbre sobre los procesos que realmente intervienen en los cambios de concentración de N_2O durante las incubaciones.

6. CONCLUSIONES

1. Existe un aumento de la concentración de metano y óxido nitroso a medida que nos adentramos en el estuario del Guadalquivir. Este aumento es lineal para el óxido nitroso, no así para el metano que alcanza su máximo a una salinidad intermedia y que parece estar relacionado con las entradas laterales desde zonas de marismas procedentes del cultivo de arroz. El incremento de AOU hacia el interior del sistema sugiere que los procesos de nitrificación constituyen la principal fuente de N_2O en el sistema y que la producción de CH_4 se encuentra relacionada con los procesos anaerobios de oxidación de la materia orgánica que tiene lugar principalmente en el sedimento.
2. Los flujos de CH_4 y N_2O a través de la interfase agua-atmósfera son positivos en todas las estaciones estudiadas en el estuario del Guadalquivir y aumentan hacia el interior del sistema. La variación longitudinal de estos flujos es similar a la que experimentan las concentraciones de estos gases, con un aumento lineal con la salinidad para los flujos de N_2O y un valor máximo a salinidades comprendidas entre 10 y 20 para los flujos de CH_4 . Estos valores positivos indican que el estuario del río Guadalquivir actúa como fuente de CH_4 y N_2O a la atmósfera.
3. Los resultados obtenidos en el experimento de incubación muestran que las velocidades de oxidación de CH_4 y las de consumo de N_2O adquieren mayor importancia a salinidades más bajas. Los valores obtenidos para estas velocidades son bajos en comparación con otros estudios realizados en sistemas costeros. Por otra parte, los coeficientes de regresión lineal de los ajustes utilizados en la cuantificación de estas velocidades son, en general, relativamente bajos. Es probable que el diseño

experimental que se ha utilizado no proporcione medidas de las reacciones individuales de producción o consumo de estos gases. La diferente cantidad de material particulado existente en los viables puede haber contribuido a que los resultados obtenidos se encuentren afectados por procesos que tienen lugar sobre las partículas de materia orgánica (producción de CH₄ y N₂O).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, G., Riou, S. A., Etcheber, H., Frankignoulle, M., De Wit, R., y Middelburg, J. J. (2000). Transient, tidal time-scale, nitrogen transformations in an estuarine turbidity maximum—fluid mud system (The Gironde, South-west France). *Estuarine, coastal and shelf science*, 50(5), 703-715.
- Abril, G., e Iversen, N. (2002). Methane dynamics in a shallow non-tidal estuary (Randers Fjord, Denmark). *Marine ecology progress series*, 230, 171-181.
- Abril, G., Commarieu, M. V., y Guérin, F. (2007). Enhanced methane oxidation in an estuarine turbidity maximum. *Limnology and oceanography*, 52(1), 470-475.
- Abril, G., y Borges, A. V. (2005). Carbon dioxide and methane emissions from estuaries. *Greenhouse gas emissions—fluxes and processes*, 187-207.
- Alvarez, O., Tejedor, B., y Vidal, J. (2001). La dinámica de marea en el estuario del Guadalquivir: un caso peculiar de ‘resonancia antrópica’. *Física de la Tierra*, 13, 11-24.
- Arp, D.J., Stein, L.Y., (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 471-495.
- Ballesteros, H. B., y Aristizabal, G. L. (2007). Información técnica sobre gases de efecto invernadero y el cambio climático. *Bogotá DC: nota técnica del IDEAM*.
- Bange, H. W., Bartell, U. H., Rapsomanikis, S., Andreae, M. O. (1994). Methane in the Baltic and North Seas and a reassessment of the marine emissions of methane. *Global Biogeochemical Cycles*, 8 (4), 465- 480.
- Bange, H. W. (2006). Nitrous oxide and methane in European coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(3), 361-374.
- Bange, H.W., Freing, A., Kock, A., Löscher, C.R., (2010). Marine pathways to nitrous oxide. *Nitrous Oxide and Climate Change 2*, 36–62.
- Blais, A. M., Lorrain, S., y Tremblay, A. (2005). Greenhouse gas fluxes (CO₂, CH₄ and N₂O) in forests and wetlands of boreal, temperate and tropical regions. *Greenhouse gas emissions—fluxes and processes*, 87-127.
- Borges, A. V., Champenois, W., Gypens, N., Delille, B., Harlay, J., (2016). Massive marine methane emissions from near-shore shallow coastal areas. *Scientific reports*, 6, 1-8.
- Borges, A. V., Darchambeau, F., Lambert, T., Bouillon, S., Morana, C., Brouyère, S., ... y Roland, F. A. (2018). Effects of agricultural land use on fluvial carbon dioxide, methane and nitrous oxide concentrations in a large European river, the Meuse (Belgium). *Science of the Total Environment*, 610, 342-355.
- Börjesson, G., Sundh, I., y Svensson, B. (2004). Microbial oxidation of CH₄ at different temperatures in landfill cover soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 305-312.
- Bridgham, S.D, Cadillo-Quiroz, H., Keller, J.K., Zhuang Q. (2013). Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob Change Biol*, 19 (5): 1325-1346.
- Brion, N., y Billen, G. (2000). Wastewater as a source of nitrifying bacteria in river systems: the case of the River Seine downstream from Paris. *Water Research*, 34(12), 3213-3221.
- Burdige, D. J., Komada, T., (2011). Anaerobic oxidation of methane and the stoichiometry of remineralization processes in continental margin sediments. *Limnology and Oceanography*, 56, 1781-1796.

- Burgos, M., Sierra, A., Ortega, T., y Forja, J. (2015). Anthropogenic effects on greenhouse gas (CH₄ and N₂O) emissions in the Guadalete River Estuary (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 503, 179-189.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., y Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001), 192-196.
- Capone, D. G., Bronk, D. A., Mulholland, M. R., Carpenter, E. J. (Eds.). (2008). Nitrogen in the marine environment. *Elsevier*.
- Cicerone, R. J., y Oremland, R. S. (1988). Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global biogeochemical cycles*, 2(4), 299-327.
- Codispoti, L. A., Brandes, J. A., Christensen, J. P., Devol, A. H., Naqvi, S. W. A., Paerl, H. W., y Yoshinari, T. (2001). The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina*, 65(S2), 85-105.
- Cohen, Y., y Gordon, L. I. (1979). Nitrous oxide production in the ocean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 84(C1), 347-353.
- Conrad, R. (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental microbiology reports*, 1(5), 285-292.
- Damm, E., Helmke, E., Thoms, S., Schauer, U., Nöthig, E., Bakker, K. y Kiene, R. P. (2009). Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences Discuss.* 6, 10355-10379.
- De Angelis, M.A., Lee, C. (1994). Methane production during zooplankton grazing on marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39, 1298-1308.
- De Bie, M. J., Middelburg, J. J., Starink, M., y Laanbroek, H. J. (2002). Factors controlling nitrous oxide at the microbial community and estuarine scale. *Marine Ecology Progress Series*, 240, 1-9.
- De la Paz, M. (2007). Variabilidad Espacio-Temporal del Carbono Inorgánico en Zonas Costeras. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz. 204pp.
- Del Sontro, T., McGinnis, D. F., Sobek, S., Ostrovsky, I., y Wehrli, B. (2010). Extreme methane emissions from a Swiss hydropower reservoir: contribution from bubbling sediments. *Environmental science & technology*, 44(7), 2419-2425.
- De Wilde, H. P., y de Bie, M. J. (2000). Nitrous oxide in the Schelde estuary: production by nitrification and emission to the atmosphere. *Marine chemistry*, 69(3-4), 203-216.
- Díez-Minguito, M., Baquerizo, A., Ortega-Sánchez, M., Navarro, G., y Losada, M. A. (2012). Tide transformation in the Guadalquivir estuary (SW Spain) and process-based zonation. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 117(C3).
- Dimitrov, L. I. (2003). Mud volcanoes—a significant source of atmospheric methane. *Geo-Marine Letters*, 23(3-4), 155-161.
- Dong, L. F., Nedwell, D. B., Underwood, G. J., Thornton, D. C., y Rusmana, I. (2002). Nitrous oxide formation in the Colne estuary, England: the central role of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1240-1249.
- Donis, D., Flury, S., Stöckli, A., Spangenberg, J. E., Vachon, D., y McGinnis, D. F. (2017). Full-scale evaluation of methane production under oxic conditions in a mesotrophic lake. *Nature communications*, 8(1), 1-12.
- Dlugokencky, E. J., Myers, R. C., Lang, P. M., Masarie, K. A., Crotwell, A. M., Thoning, K. W., ... y Steele, L. P. (2005). Conversion of NOAA atmospheric dry air CH₄ mole fractions to a gravimetrically prepared standard scale. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 110(D18).
- Etheridge, D. M., Steele, L., Francey, R. J., y Langenfelds, R. L. (1998). Atmospheric methane between 1000 AD and present: Evidence of anthropogenic emissions and climatic variability. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 103(D13), 15979-15993.
- Farías, L., Faúndez, J., Fernández, C., Cornejo, M., Sanhueza, S., Carrasco, C., (2013). Biological N₂O fixation in the Eastern South Pacific Ocean and marine cyanobacterial cultures. *PLoS One*, 8 (5).
- Ferrón, S., Ortega, T., Gómez-Parra, A., Forja, J.M. (2007). Seasonal study of dissolved CH₄, CO₂ and N₂O in a shallow tidal system of the bay of Cádiz (SW Spain). *J. Mar. Syst.* 66 (1), 244-257.
- Ferrón, S., Ortega, T., y Forja, J. M. (2010). Temporal and spatial variability of methane in the north-eastern shelf of the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Journal of Sea Research*, 64(3), 213-223.
- Florez-Leiva, L., Damm, E., y Farías, L. (2013). Methane production induced by dimethylsulfide in surface water of an upwelling ecosystem. *Progress in oceanography*, 112, 38-48.

- Frankignoulle, M., y Middelburg, J. J. (2002). Introduction: biogases in tidal European estuaries: the BIOGEST Project. *Biogeochemistry*, 1-4.
- Fuhrman, J. A., y Capone, D. G. (1991). Possible biogeochemical consequences of ocean fertilization. *Limnology and Oceanography*, 36(8), 1951-1959.
- Gattuso, J. P., Frankignoulle, M., Wollast, R. (1998). Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 405-434.
- Giblin, A., Tobias, C., Song, B., Weston, N., Banta, G., Rivera-Monroy, H., (2013). The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography* 26 (3), 124–131.
- Gonçalves, C., Brogueira, M. J., & Camões, M. F. (2010). Seasonal and tidal influence on the variability of nitrous oxide in the Tagus estuary, Portugal. *Scientia Marina*, 74(S1), 57-66.
- Grasshoff, K., y Ehrhardt, M. (1983). Automated chemical analysis. *Methods of seawater analysis*, 263-289.
- Gruber, N., Clement, D., Carter, B. R., Feely, R. A., Van Heuven, S., Hoppema, M., Ishii, M., Key, R. M., Kozyr, A., Lauvset, S., Lo Monaco, C., Mathis, J. T., Murata, A., Olsen, A., Perez, F. F., Sabine, C. L., Wanninkhof, R., (2019). The oceanic sink for anthropogenic CO₂ from 1994 to 2007. *Science*, 363, 1193-119.
- Grunwald, M., Dellwig, O., Beck, M., Dippner, J. W., Freund, J. A., Kohlmeier, C. y Brumsack, H. J. (2009). Methane in the southern North Sea: Sources, spatial distribution and budgets. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81(4), 445-456.
- Günthel, M., Klawonn, I., Woodhouse, J., Bižić, M., Ionescu, D., Ganzert, L., ... y Tang, K. W. (2020). Photosynthesis-driven methane production in oxic lake water as an important contributor to methane emission. *Limnology and Oceanography*, 65(12), 2853-2865.
- Hanson, R. S., y Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological reviews*, 60(2), 439-471.
- Hartmann, J. F., Günthel, M., Klintzsch, T., Kirillin, G., Grossart, H. P., Keppler, F., y Isenbeck-Schröter, M. (2020). High spatiotemporal dynamics of methane production and emission in oxic surface water. *Environmental science & technology*, 54(3), 1451-1463.
- Huertas, I. E., Flecha, S., Navarro, G., Pérez, F. F., de la Paz, M. (2018). Spatio-temporal variability and controls on methane and nitrous oxide in the Guadalquivir Estuary, Southwestern Europe. *Aquatic Sciences*, 80, 1-16.
- Inostroza, A. A., Pantoja, S., y González, R. R. (2011). Actividad enzimática de metanótrofos marinos y su uso potencial en biorremediación. *Gayana (Concepción)*, 75(2), 138-145.
- Jiang, L.Q., Cai, W.J., y Wang, Y., (2008). A comparative study of carbon dioxide degassing in river- and marine-dominated estuaries. *Limnology and Oceanography*, 53(6), 2603–2615.
- Jørgensen, B. B., y Kasten, S. (2006). Sulfur cycling and methane oxidation. *Marine Geochemistry*, 52, 271-309.
- Karl, D. M., Beversdorf, L., Björkman, K. M., Church, M. J., Martinez, A., y Delong, E. F. (2008). Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience*, 1(7), 473-478.
- Kristjansson, J. K., y Schönheit, P. (1983). Why do sulfate-reducing bacteria outcompete methanogenic bacteria for substrates? *Oecologia*, 60(2), 264-266.
- Kirschke, S., Bousquet, P., Ciais, P., Saunoy, M., Canadell, J. G., Dlugokencky, E. J., y Zeng, G. (2013). Three decades of global methane sources and sinks. *Nature geoscience*, 6(10), 813-823.
- Kvenvolden, K. A., y Rogers, B. W. (2005). Gaia's breath—global methane exhalations. *Marine and Petroleum Geology*, 22(4), 579-590.
- Linto N., Barnes J., Ramachandran R., Divia J., Ramachandran P. y Upstill-Goddard R. C. (2014). Carbon dioxide and methane emissions from mangrove-associated waters of the Andaman Islands, Bay of Bengal. *Estuaries Coasts* 37, 381–398.
- Lofton, D.D., Whalen, S.C., Hershey, A.E. (2014). Effect of temperatura on methane dynamics and evaluation of methane oxidation kinetics in shallow Arctic Alaskan lakes. *Hydrobiologia* 721, 209-222.
- Ma, X., Lennartz, S. T., Bange, H. W., (2019). A multi-year observation of nitrous oxide at the Boknis Eck Time Series Station in the Eckernförde Bay (southwestern Baltic Sea). *Biogeosciences*, 16(20), 4097-4111.

- Magenheimer, J.F., Moorer, T.R., Chmura, G.L., y Daoust, R.J., (1996). Methane and Carbon Dioxide Flux from a Macrotidal Salt Marsh, Bay of Fundy, New Brunswick. *Estuaries*, 19, 139-145.
- Maher, D. T., Cowley, K., Santos, I. R., Macklin, P., y Eyre, B. D. (2015). Methane and carbon dioxide dynamics in a subtropical estuary over a diel cycle: Insights from automated in situ radioactive and stable isotope measurements. *Marine Chemistry*, 168, 69-79.
- Malyan, S. K., Bhatia, A., Kumar, A., Gupta, D. K., Singh, R., Kumar, S. S., y Jain, N. (2016). Methane production, oxidation and mitigation: a mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Science of the Total Environment*, 572, 874-896.
- Manne, A. S., y Richels, R. G. (2001). An alternative approach to establishing trade-offs among greenhouse gases. *Nature*, 410 (6829), 675-677.
- Matoušů, A., Osudar, R., Šimek, K., y Bussmann, I. (2017). Methane distribution and methane oxidation in the water column of the Elbe estuary, Germany. *Aquatic Sciences*, 79(3), 443-458.
- Matoušů, A., Rulík, M., Tušer, M., Bednařík, A., Šimek, K., & Bussmann, I. (2019). Methane dynamics in a large river: a case study of the Elbe River. *Aquatic Sciences*, 81(1), 1-15.
- McClain, M. E., Boyer, E. W., Dent, C. L., Gergel, S. E., Grimm, N. B., Groffman, P. M., ... y Pinay, G. (2003). Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 301-312.
- Meyer, R. L., Allen, D. E., y Schmidt, S. (2008). Nitrification and denitrification as sources of sediment nitrous oxide production: A microsensor approach. *Marine Chemistry*, 110(1-2), 68-76.
- Meneses, V. B. (2013). *Variabilidad estacional y descripción de eventos de "hotspot" de óxido nitroso (N₂O) en la zona de surgencia de Chile central: Un estudio de serie de tiempo (2002-2011) (Doctoral dissertation, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO).*
- Middelburg, J. J., Nieuwenhuize, J., Iversen, N., Høgh, N., De Wilde, H., Helder, W., y Christof, O. (2002). Methane distribution in European tidal estuaries. *Biogeochemistry*, 59(1), 95-119.
- Myhre, G., Shindell, D., y Pongratz, J. (2014). Anthropogenic and natural radiative forcing.
- Navarro, G., Gutiérrez, FJ, Díez-Minguito, M., Losada, MA y Ruiz, J. (2011). Variabilidad temporal y espacial en la ría del Guadalquivir: un desafío para la telemetría en tiempo real. *Ocean Dynamics*, 61 (6), 753-765.
- Osudar, R., Matoušů, A., Alawi, M., Wagner, D., y Bussmann, I. (2015). Environmental factors affecting methane distribution and bacterial methane oxidation in the German Bight (North Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 160, 10-21.
- Oudot, C., Andrie, Ch. y Montel, Y. (1990). Nitrous oxide production in the tropical Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.*, 37 (2), 183-202.
- Portmann, R. W., Daniel, J. S., y Ravishankara, A. R. (2012). Stratospheric ozone depletion due to nitrous oxide: influences of other gases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1256-1264.
- Ramaswamy, V., Boucher, O., Haigh, J., Hauglustine, D., Haywood, J., Myhre, G., y Solomon, S. (2001). Radiative forcing of climate. *Climate change*, 349.
- Reeburgh, W. S. (2007). Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews*, 107(2), 486- 513.
- Rodríguez-Ramírez, A., Villarías-Robles, J. J., Pérez-Asensio, J. N., y Celestino-Pérez, S. (2019). The Guadalquivir estuary: spits and marshes. *The Spanish Coastal Systems*, 517-541.
- Sadat-Noori, M., Maher, D. T., y Santos, I. R. (2016). Groundwater discharge as a source of dissolved carbon and greenhouse gases in a subtropical estuary. *Estuaries and Coasts*, 39(3), 639-656.
- Salby, M. L. (2012). *Physics of the Atmosphere and Climate. Cambridge University Press.*
- Sánchez Rodríguez, J. (2018). Transporte y comportamiento ambiental de gases con efecto invernadero en el estuario del Guadalquivir en una situación de primavera.
- Sánchez Rodríguez, J. (2019). Dinámica de gases con efecto invernadero en el estuario del Guadalquivir en una situación de primavera.
- Sánchez-Rodríguez, J., Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Gómez-Parra, A., Forja, J., (2021). Dynamic of CO₂, CH₄ and N₂O in the Guadalquivir Estuary. *Science of The Total Environment*. En prensa.
- Sarmiento, J. L., y Gruber, N. (2002). Sinks for anthropogenic carbon. *Physics today*, 55(8), 30- 36.
- Sawakuchi, H. O., Bastviken, D., Sawakuchi, A. O., Ward, N. D., Borges, C. D., Tsai, S. M., y Krusche, A. V. (2016). Oxidative mitigation of aquatic methane emissions in large Amazonian rivers. *Global change biology*, 22(3), 1075-1085.

- Seitzinger, S. P., Nixon, S. W., y Pilson, M. E. (1984). Denitrification and nitrous oxide production in a coastal marine ecosystem 1. *Limnology and Oceanography*, 29(1), 73-83.
- Seitzinger, S. P., Kroeze, C., y Styles, R. V. (2000). Global distribution of N₂O emissions from aquatic systems: natural emissions and anthropogenic effects. *Chemosphere-Global Change Science*, 2(3), 267- 279.
- Seitzinger, S. P., Harrison, J. A., Bohlke, J. K., Bouwman, A. F., Lowrance, R., Peterson, B. y Tobias, C. (2006). Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications*, 16, 2064– 2090.
- Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Ponce, R., Bellanco, M. J., Sánchez-Leal, R. y Forja, J. (2017). Spatial and seasonal variability of CH₄ in the eastern Gulf of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *Science of the Total Environment*, 590, 695-707.
- Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Ponce, R., Bellanco, M. J., Sánchez-Leal, R. y Forja, J. (2018). Distribution of N₂O in the eastern shelf of the Gulf of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *Science of the Total Environment*, 593, 796-808.
- Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Gómez-Parra, A., y Forja, J. (2020). Factors controlling the variability and emissions of greenhouse gases (CO₂, CH₄ and N₂O) in three estuaries of the Southern Iberian Atlantic Basin during July 2017. *Marine Chemistry*, 226, 103867.
- Stams, A. J., y Plugge, C. M. (2010). The microbiology of methanogenesis. *Methane and climate change*, 14-26.
- Stehr, G., Böttcher, B., Dittberner, P., Rath, G., y Koops, H. P. (1995). The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 17(3), 177-186.
- Tremblay, A., Varfalvy, L., Garneau, M., y Roehm, C. (Eds.). (2005). Greenhouse gas Emissions-Fluxes and Processes: hydroelectric reservoirs and natural environments. *Springer Science & Business Media*.
- Upstill-Goddard, R. C., Barnes, J., Frost, T., Punshon, S., y Owens, N. J. (2000). Methane in the southern North Sea: Low-salinity inputs, estuarine removal, and atmospheric flux. *Global Biogeochemical Cycles*, 14(4), 1205-1217.
- Utsumi, M., Nojiri, Y., Nakamura, T., Nozawa, T., Otsuki, A., Takamura, N., y Seki, H. (1998). Dynamics of dissolved methane and methane oxidation in dimictic Lake Nojiri during winter. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 10-17.
- Wanninkhof, R. (2014). Relationship between wind speed and gas Exchange over the ocean revisited. *Limnology and oceanography: Methods*, 12, 351-362.
- Weiss, R. (1974). Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Marine Chemistry*, 2(3), 203–215.
- Weiss, R. F. y Price, B. A. (1980). Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry*, 8(4), 347-359.
- Weiss, R. F. (1981). Determinations of carbon dioxide and methane by dual catalyst flame ionization chromatography and nitrous oxide by electron capture chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 19(12), 611-616.
- Wiesenburg, D. A. y Guinasso Jr, N. L. (1979). Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 24(4), 356-360.
- Wollast, R. (1998). Evaluation and comparison of the global carbon cycle in the coastal zone and in the open ocean. *The sea*, 10, 213-252.