



Universidad Nacional del Sur

Tesis de Doctor en Química

**Dinámica de Nutrientes, Materia Orgánica y Clorofila *a* en
planicies de marea cubiertas por matas microbianas**

Lic. Eleonora Marisel Fernández

Bahía Blanca

Argentina

2017

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química y del Laboratorio de Química Marina (LQM) del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), el periodo comprendido entre el 21 de Agosto de 2012 y el 30 de Enero de 2017, bajo la dirección del Dr. Jorge Marcovecchio (Instituto Argentino de Oceanografía, IADO) y Dr. Marcelo Avena (Departamento de Química, UNS).

Fernández Eleonora Marisel



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** por otorgarme la beca para realizar mi Doctorado.

Al **Instituto Argentino de Oceanografía (IADO)** y al Departamento de Química por brindarme el lugar de trabajo y los medios necesarios para llevar a cabo esta tesis.

A mis **directores de tesis**, Jorge Marcovecchio y Marcelo Avena por tener siempre la mejor predisposición y ayudarme ante cualquier situación o duda. Jorge, gracias por haberme dado siempre la libertad de hacer, probar y discutir nuevas propuestas para la tesis y por haber respetado mis tiempos.

A **Carlita Spetter** por haber sido una gran guiadora y compañera en el desarrollo de esta tesis. Gracias por haber confiado en mí, por todo lo que me enseñaste dentro del laboratorio, por tus consejos, por alentarme y transmitirme tranquilidad en momentos difíciles, por los mates, las charlas y las risas. Por tanto tiempo compartido dentro del IADO y en las horas de cátedra. Me enseñaste no sólo a crecer profesionalmente sino también como persona. Gracias por esos abrazos y estampitas en momentos personales complicados.

A **Diana Cuadrado** por haberme guiado en los primeros pasos de esta tesis y haberme brindado las herramientas necesarias para llevarla a cabo durante los dos primeros años de beca.

A **Cristina Matulewicz** por haberme brindado la posibilidad de hacer una pasantía en su laboratorio de Qca Orgánica de UBA y aprender la determinación de monosacáridos por CGL.

A todo el **personal de apoyo del IADO** por su buena predisposición y colaboración siempre para cualquier cosa que necesitara. A **Javier Arlenghi** por llevarme, acompañarme, ayudarme y cuidarme en todos los muestreos a Puerto Rosales, por enseñarme a manejarme dentro del instituto y por esos consejos y charlas de la vida interminables. Al Abel Astesuain, el “**Vasquito**” por reservarme el equipo y no retarme por los cambios de días y horarios reiteradas veces, por haber confiado en mí y ponerle

siempre la mejor onda. A **Carlitos Galán** por estar siempre ahí, lo más rápido posible arreglando cualquier cosa que se rompiera con una sonrisa y una gran amabilidad. A **Walter Melo** por su gran ayuda con los mapas y figuras presentadas en congresos, papers y la tesis. A Graciela que siempre nos recibía con un piropo a la mañana en la biblioteca y nos hacía reír con sus ocurrencias. A todos los que de una u otra forma colaboraron para llevar a cabo las campañas.

A los personales de apoyo del **LIUC (UNS)** y del **PLAPIQUI**, en especial a Clarisa Cicchelli por facilitarme el uso del liofilizador y recibirme siempre con tanta calidez.

A los **integrantes del Área de Oceanografía Química del IADO**, por la ayuda desinteresada, las muchas consultas de laboratorio, los mates y el tiempo compartido dentro del laboratorio. A **Coty Bournod** por haberme acompañado en mis primeras salidas a Rosales, enseñarme a mirar lo que pasaba en los sedimentos donde estaban nuestras queridas matas microbianas y transmitirme todo lo que sabías del tema. Además por ayudarme con los gráficos y la interpretación de los resultados que iban surgiendo. A Naty, Meli y Sandra por haber sido siempre tan amables conmigo, préstame materiales y reactivos indispensables para llevar a cabo mi trabajo. Y un capítulo especial para las tres personas que conocí cuando arranque con la beca: **Pame, Ana, Paulita y Melinucha**, gracias por haber abierto sus corazones y brindarme una amistad sincera dentro y fuera del IADO. Por ser mis compañeras de aventuras en las campañas, cursos de posgrado, los mates, charlas, almuerzos en la cocina y esas ocurrencias que hacían reír a carcajadas rompiendo el silencio de la biblioteca.

A **Ana, John, Jessi y Marcelo** por abrirme siempre las puertas de su laboratorio en la universidad y ayudarme con los métodos nuevos y cualquier duda que me surgiera respecto al trabajo. Por las tan lindas horas de cátedra compartidas, mates y almuerzos en el buffet (con postre incluido).

A mis **compañeros de Qca Analítica**, Florcita, Vale, Cristina, Fabi, Susan, Caro, Carli, Andrés y Cali por tener siempre la mejor predisposición para trabajar, cubrirme en los momentos que necesité, los “asuntos”, las charlas y largas horas de corregir parciales.

A todos los compañeros de la **Biblioteca** con los que compartí diariamente mates, charlas académicas y las no tanto, por los especiales miércoles dulces y los divertidos after office. A Ceci, Javi, Noe y Cele por haber sido mis compañeros durante la mayor

parte del día dentro del “cuadrante” de escritorios, los mates, las charlas, las risas y las maldades. Además Ceci y Javi gracias por haberme ayudado y enseñado estadística con tanta paciencia. Y a todos aquellos con los que compartí tan lindos viajes a congresos.

A mis **amigas/os** Vani, Pau, Nelly, Anita, Belén, Yami, Juli, Lucas por acompañarme durante estos 5 años, estar pendientes y bancarse mis largas ausencias y locura de este último tiempo escribiendo la tesis.

A **mi familia**, porque sin su apoyo incondicional nada sería posible. Por escucharme y aconsejarme en los momentos en que el desánimo me invadía. Por haber confiado en mí, estar pendientes de los avances de mi trabajo y por esas palabras de aliento al teléfono que no tenían precio. Gracias por estar ahí siempre al pie del cañón!!

A **Luchito**, por estar SIEMPRE, por acompañarme, alentarme, ayudarme y tranquilizarme cuando las cosas no iban del todo bien, por escucharme tantas veces hablar de “mis matas microbianas” y el “espectrofotómetro” (según vos), bancarte este último tiempo de noches enteras sin dormir y la computadora encima todo el día. Pero sobre todo gracias por el plus que tiene la finalización de esta tesis. GRACIAS POR SER UN GRAN COMPAÑERO.

“La felicidad es interior, no exterior; por lo tanto no depende de lo que tenemos sino de lo somos”

Henry Van Dyke

Resumen

Las planicies de marea son ambientes altamente productivos y pueden proveer más del 50% de la productividad primaria y secundaria en los estuarios. Son sitios importantes donde se produce la acumulación, el procesamiento y re-mineralización de la materia orgánica tanto de origen autóctono como alóctono.

El microfitorbentos (MPB) es el mayor componente de la comunidad microbiana de los sedimentos intermareales en términos de biomasa y producción, constituyendo una fuente primaria para la fijación de carbono en la cadena trófica, y una fuente sustancial para los invertebrados bentónicos. Estos organismos pueden colonizar diferentes tipos de hábitats e interactuar unos con otros, formando comunidades más o menos complejas como *biofilms* y matas microbianas. Estos consorcios microbianos se desarrollan en una amplia variedad de ambientes marino-costeros incluyendo los sistemas estuariales. Se caracterizan por su capacidad para proteger y bioestabilizar los sedimentos de la erosión y desecación causadas por el viento, las olas y la marea, mediante la segregación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

El Estuario de Bahía Blanca (EBB) es un ambiente costero eutrófico, localizado en la zona sur la provincia de Buenos Aires (Argentina) y caracterizado por extensas planicies de mareas que tienen una gran importancia en los ciclos biogeoquímicos y principalmente en el ciclo del carbono (C), ya que el MPB que las conforma fija el C inorgánico a través del proceso de fotosíntesis y al mismo tiempo puede exudar enormes cantidades de EPS involucradas en diferentes procesos como la motilidad de los microorganismos.

En esta tesis se abordó el estudio de la dinámica de clorofila *a* (C_{la}), materia orgánica (MO) y de los nutrientes, conjuntamente con los parámetros fisicoquímicos que pueden influenciar dichas variables. Como zona de estudio se seleccionaron las planicies de marea de Puerto Rosales (zona media) dentro del EBB donde se desarrollan matas microbianas.

Se estudió la distribución espacial y temporal de la concentración de C_{la} y feopigmentos y fueron empleadas como un estimador de la biomasa del MPB y el estado fisiológico de los microorganismos. Los sedimentos de la zona media del EBB presentaron valores máximos de C_{la} principalmente durante la época invernal, al igual que en la columna de agua, donde el fitoplancton presenta un florecimiento.

Con el fin de analizar la variabilidad espacio-temporal de las EPS en la planicie de marea bajo estudio, se determinó la concentración del componente mayoritario de las EPS, que son los carbohidratos. Los carbohidratos coloidales (solubles en agua, *FC*) y los capsulares (solubles en EDTA, *FCAP*) representaron respectivamente el 43% y 57% en la capa superficial del sedimento, indicando una mezcla de carbono lábil y refractario, mientras que en la capa subsuperficial la *FCAP* fue la predominante (75%). La máxima concentración *FC* y *FCAP* fueron registradas cuando la concentración de Cl_a fue alta, indicando la estrecha relación que existe entre el MPB y la segregación de exopolisacáridos. Además, el alto contenido de humedad y el menor tamaño de grano favorecieron la producción de carbohidratos extracelulares.

Los nutrientes inorgánicos disueltos analizados fueron considerablemente mayores en agua intersticial que en agua superficial, sugiriendo que la planicie de marea podría estar aportando nutrientes desde los sedimentos hacia la columna de agua por difusión vía agua intersticial. Los nitratos (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) fueron el componente principal de los nutrientes nitrogenados.

La evaluación de los $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y relación C:N (~ 6,9) indicaron un origen principalmente autóctono de la MO de las planicies de marea de Puerto Rosales asociado a una alta producción primaria y excreción de las EPS.

La alta disponibilidad de nutrientes y materia orgánica que existe en el área estudiada conforma el ambiente propicio para el desarrollo de matas microbianas, las cuales pueden incorporar nutrientes de nitrógeno, fósforo y silicio para llevar a cabo la producción primaria.

Abstract

Tidal flats are highly productive environments and can provide more than 50% both primary and secondary productivity within estuaries. They are important sites where the accumulation, the processing and re-mineralization of the organic matter, both autochthonous and allochthonous, takes place.

Microphytobenthos (MPB) is the major component of the microbial community of intertidal sediments in terms of biomass and production, constituting a primary source for the fixation of carbon in the trophic chain; and a substantial source for benthic invertebrates. These organisms can colonize different types of habitats and interact among each other, forming rather complex communities such as biofilms and microbial mats. These microbial consortia are developed in a wide variety of marine-coastal environments including estuary systems. They are characterized by their ability to biostabilize and protect sediments from erosion and desiccation caused by wind, waves and tide, through the segregation of extracellular polymeric substances (EPS).

The Bahía Blanca Estuary (EBB) is an eutrophic coastal environment, located in the south of the province of Buenos Aires (Argentina) and characterized by extensive tidal plains that are of great importance in biogeochemical cycles and mainly in the carbon cycle (C), since their constituent MPB fixes the inorganic C through photosynthesis and at the same time exudes enormous quantities of EPS involved in different processes like the motility of microorganisms.

This thesis addresses the study of the dynamics of chlorophyll a (C_{la}), organic matter (OM) and nutrients, together with the physicochemical parameters that can influence them. As a study area, the tidal flats of Puerto Rosales (middle zone) were selected within the EBB where microbial mats are developed.

The spatial and temporal distribution of C_{la} and phaeopigments concentrations were studied and used as estimators of the microfitobentos biomass and the physiological state of the microorganisms. The sediments of the middle zone of the EBB presented maximum values of C_{la} mainly during the winter season, as well as in the water column, where the phytoplankton presents a bloom.

In order to analyze the spatial-temporal variability of EPS in the studied tidal flats, the concentration of the major ESP component, the carbohydrates, was determined. Colloidal (water soluble, *FC*) and capsular carbohydrates (EDTA soluble, *FCAP*) represented 43% and 57% respectively in the surface layer of the sediment, indicating a mixture of labile and refractory carbon, while in the subsurface layer the *FCAP* was the predominant one (75%). The maximum concentration of *FC* and *FCAP* were recorded when the *Cla* concentration was high, indicating a close relationship between MPB and segregation of exopolysaccharides. In addition, the high moisture content and the smaller grain size favored the production of extracellular carbohydrates.

The dissolved inorganic nutrients analyzed were considerably higher in interstitial water than in surface water, suggesting that the tidal flat could be providing nutrients from the sediments to the water column by diffusion via interstitial water. Nitrates (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) were the main component of nitrogenous nutrients.

The evaluation of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and C:N ratio ($\sim 6,9$) indicated a predominantly autochthonous origin of OM of the tidal flats from Puerto Rosales associated with high primary production and excretion of EPS.

The high availability of nutrients and organic matter in the studied area creates the appropriate environment for the development of microbial mats, which can incorporate nutrients of nitrogen, phosphorus and silicon to carry out the primary production.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del Director

Índice

Prefacio	I
Agradecimientos	II
Resumen	VI
Abstract	VIII

Capítulo 1 – Introducción

Primera parte: Introducción general.....	2
1.1. Ambientes estuariales.....	2
1.2. Planicies de marea.....	3
1.2.1. Importancia del Microfitobentos.....	4
1.3. Matas microbianas y <i>biofilms</i> en ambientes costeros.....	6
1.4. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS).....	13
1.5. Importancia de los nutrientes inorgánicos disueltos.....	17
Segunda Parte: Área de estudio y antecedentes.....	19
1.6. Estuario de Bahía Blanca.....	19
1.7. Puerto Rosales: Sitios de muestreo.....	21
1.8. Hipótesis.....	25
1.9. Objetivos.....	25
1.9.1. Objetivo General.....	25
1.9.2. Objetivos Específicos.....	25

Capítulo 2 – Materiales y Métodos

2.1. Parámetros fisicoquímicos.....	28
2.2. Toma de muestras.....	28
2.2.1. Sedimento.....	28
2.2.2. Agua de mar superficial.....	29
2.2.3. Agua intersticial.....	29
2.3. Procesamiento y preservación de las muestras.....	29
2.3.1. Sedimento.....	29
2.3.2. Agua de mar superficial e intersticial.....	30
2.4. Metodología Analítica.....	31
2.4.1. Contenido de humedad, materia Orgánica y granulometría del sedimento.....	31
2.4.2. Clorofila <i>a</i> , feopigmentos y carotenoides en sedimento.....	32
2.4.3. Extracción y determinación de carbohidratos extracelulares en sedimento.....	33
2.4.4. Determinación de la composición de monosacáridos neutros en el EPS.....	34
2.4.5. Determinación de la concentración isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$; y la composición de carbono y nitrógeno elemental.....	35
2.4.6. Determinación de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar.....	36
2.4.7. Determinación de Materia Orgánica Particulada (MOP).....	39
2.4.8. Determinación de clorofila <i>a</i> y feopigmentos en agua de mar superficial.....	39
2.4.9. Acondicionamiento del material.....	40

Capítulo 3 – Caracterización fisicoquímica de los sedimentos

3.1. Introducción.....	42
3.2. Objetivos e hipótesis.....	47
3.3 Metodología y análisis de los datos.....	47
3.4. Resultados.....	49
3.4.1. Temperatura, Eh y pH.....	49
3.4.2. Materia orgánica, humedad y granulometría.....	50
3.4.3. Frecuencia de Inundación de la planicie.....	56
3.5. Discusión.....	56
3.5.1. Variables fisicoquímicas de los sedimentos.....	56
3.5.2. Materia orgánica, humedad y granulometría.....	58
3.6. Conclusiones.....	59

Capítulo 4 – Dinámica anual de clorofila a y carbohidratos extracelulares (EPS)

4.1. Introducción.....	62
4.2. Objetivos e hipótesis.....	64
4.3 Metodología y análisis de los datos.....	64
4.4. Resultados.....	65
4.4.1. Distribución de clorofila a, feopigmentos y carotenoides.....	65
4.4.2. Distribución de carbohidratos coloidales (FC) y capsulares (FCAP).....	71

4.4.3. Relación entre Cla, FC, FCAP y las variables fisicoquímicas...	75
4.5. Discusión.....	77
4.6. Conclusiones.....	81

Capítulo 5 – Evaluación de nutrientes inorgánicos disueltos y el origen de la materia orgánica

5.1. Introducción.....	85
5.2. Objetivos e hipótesis.....	87
5.3 Metodología y análisis de los datos.....	87
5.4. Resultados.....	89
5.4.1. Parámetros fisicoquímicos de los sedimentos y de la columna de agua que cubre la planicie de marea.....	89
5.4.2. Nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar superficial e intersticial.....	94
5.4.3. Clorofila <i>a</i> , carbohidratos extracelulares y composición de monosacáridos.....	98
5.4.4. Composición elemental e isótopos estables de carbono y nitrógeno de la materia orgánica de los sedimentos.....	105
5.5. Discusión.....	112
5.6. Conclusiones.....	123
Consideraciones finales	126
Bibliografía	129

Capítulo 1

Introducción



Contenidos:

Primera Parte: Introducción general:

- Ambientes estuariales
- Planicies de marea y el microfitobentos
- Matas microbianas y *biofilms* en ambientes costeros
- Sustancias poliméricas extracelulares
- Importancia de los nutrientes inorgánicos disueltos

Segunda Parte: Área de estudio y antecedentes

- Estuario de Bahía Blanca
- Puerto Rosales
- Hipótesis y Objetivos

Primera parte: Introducción general

1.1. Ambientes estuariales

Desde el punto de vista geomorfológico, existen varias formas de definir un estuario, siendo una de las más simples y ampliamente utilizada la propuesta por Cameron y Pritchard (1963): *“Un estuario es un cuerpo de agua costero semicerrado con una conexión libre con el mar abierto, y en el cual el agua de mar es cuantitativamente diluida por el agua dulce derivada del drenaje continental”*. Sin embargo, una definición más actual de estos ambientes fue propuesta por Perillo (1995a), quien definió a un estuario como *“un cuerpo de agua costero semicerrado que se extiende hasta el límite efectivo de la influencia de la marea, dentro del cual el agua salada que ingresa por una o más conexiones libres con el mar abierto, o cualquier otro cuerpo de agua salino, es diluida significativamente con agua dulce derivada del drenaje terrestre, y puede sustentar especies biológicas eurihalinas ya sea por una parte o la totalidad de su ciclo de vida”*.

Los ambientes estuariales son altamente dinámicos con una estructura física, química y biológica caracterizada por una elevada variabilidad espacial y temporal. Las fluctuaciones temporales y los gradientes espaciales en estos sistemas, promueven una gran variabilidad en las propiedades químicas y biológicas, tanto del agua como de los sedimentos. Estos sistemas están sujetos a continuas variaciones en la velocidad y dirección del viento, la intensidad de la luz, las precipitaciones, el nivel del agua de mar y del agua dulce que llega por escorrentía (Mateus et al., 2008); por esta razón han sido reconocidos como sistemas únicos, complejos y altamente productivos, característicos de las zonas costeras marinas, y que son el escenario de fuertes procesos de interacción mar-continente (Chapman y Wang, 2001). En general, estos ambientes ocupan las áreas costeras menos expuestas a la acción del mar abierto, permitiendo el desarrollo de puertos, facilidades recreacionales o emprendimientos de acuicultura, y actúan como sumideros o sitios de transición de una amplia variedad de sustancias (Por ej., contaminantes y nutrientes) entre el agua dulce, la tierra y el mar abierto. Sin embargo, dentro de los estuarios los procesos dinámicos son significativos imponiendo un marcado *stress* sobre la biota (permanente o temporaria), la morfología y las construcciones (Perillo y Cuadrado, 2013).

La zona costera Argentina tiene una amplia variedad de estuarios que van desde uno de los más amplios del mundo, como el del Río de La Plata, a uno de los más pequeños y de difícil acceso como lo es el de Río Grande. Debido a los diferentes climas que caracterizan al territorio argentino, los estuarios muestran diferentes descargas. La amplitud de marea también varía significativamente, y existen estuarios *micromareales* (Por ej., el estuario del Río de La Plata o del Río Quequén Salado), *mesomareales* (Por ej., el estuario de Bahía Blanca o del Río Chubut); y *macromareales* (Por ej., algunos estuarios de la Patagonia, como el de Puerto Deseado o Río Gallegos) (Piccolo y Perillo, 1999).

En zonas costeras templadas, como el estuario de Bahía Blanca, los humedales predominantes son las marismas y las planicies de mareas, los cuales están muy influenciados por su flora y su fauna en diferentes niveles (Perillo y Cuadrado, 2013).

1.2. Planicies de marea

Los estuarios y otros ambientes de baja energía son caracterizados por la presencia de extensas planicies de marea, las cuales están compuestas por pequeñas partículas minerales (limos y arcillas) que se depositan cuando la energía de las mareas son bajas (Stal y de Brouwer, 2003). Sin embargo, el aporte de sedimento es significativo y los eventos de tormenta pueden causar erosión y transporte.

Las planicies de marea son ambientes de escasa pendiente con una morfología plana, formadas por una mezcla de sedimentos consolidados y no consolidados, y sin vegetación donde se produce una intensa mineralización de la materia orgánica y el reciclado de nutrientes. Son consideradas áreas dinámicas y altamente productivas, las cuales pueden proveer hasta un 50% de la producción primaria en los estuarios y por lo tanto mantener un gran *stock* de peces y crustáceos, entre otros (Underwood y Kromkamp, 1999).

Las planicies de marea se dividen en zonas, cada una definida por diferentes periodos de inundación y tiempos de exposición. La figura 1.1 muestra tres zonas, definidas por la línea de la marea baja y la línea de la marea alta:

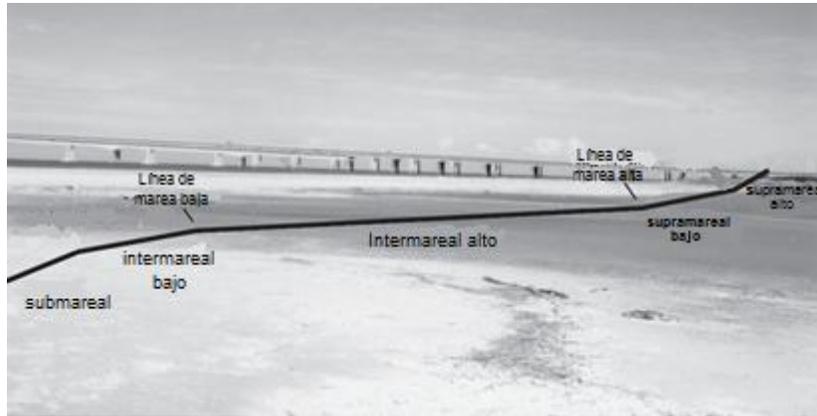


Fig. 1.1: Zonas de una planicie de marea (extraído de Noffke, 2010)

- Zona Supramareal: Es la zona más alta de la planicie de marea y está por encima de la línea normal de la marea alta. Se encuentra expuesta al aire la mayor parte del tiempo debido a que no está afectada por las mareas diariamente. A su vez, esta zona se divide en dos áreas: una *supramareal baja*, que se inunda aproximadamente cada 15 días y otra *supramareal alta*, la cual se inunda eventualmente en condiciones de sicigia (dos veces por mes) o durante eventos de tormentas.
- Zona Intermareal: Se encuentra entre las líneas de la marea alta y baja. Esta área se inunda una vez o dos veces al día dependiendo del régimen de marea y del viento. También se sub-divide en una zona inferior y otra superior, siendo ésta última la que se encuentra entre la línea de marea baja y la parte superior de la marea alta.
- Zona submareal: Se encuentra por debajo de la línea de marea baja. No se ve afectada por inundación y casi nunca permanece expuesta.

1.2.1. Importancia del microfitobentos

El microfitobentos (MPB, del inglés: *microphytobenthos*) es el mayor componente de la comunidad microbiana de los sedimentos intermareales en términos de biomasa y producción, constituyendo una fuente primaria para la fijación de carbono en la cadena trófica. El MPB está constituido generalmente por organismos fotosintéticos (algas eucariotas unicelulares y cianobacterias) que crecen dentro de los primeros milímetros iluminados de los sedimentos y aparecen típicamente como una sutil coloración verdosa-

amarronada. Los sedimentos superficiales son una zona de intensa actividad microbiana y geoquímica, y de considerable reprocesamiento físico. En ambientes poco profundos como los estuarios, la biomasa de las microalgas bentónicas normalmente excede a la biomasa del fitoplancton en la columna de agua (MacIntyre et al., 1996).

Cuando el microfitobentos es abundante, éste puede estabilizar la superficie de los sedimentos disminuyendo el espacio intersticial (Paterson et al., 1990) y bajo condiciones de crecimiento favorables (Por ej., luz, enriquecimiento de nutrientes, baja velocidad de sedimentación, entre otras) puede producir **matas microbianas** reconocibles macroscópicamente, generalmente dominadas por la cianobacteria filamentosa *Microcoleus chthonoplastes*, o **biofilms** de diatomeas epipélicas dominados por *Cylindrotheca closterium* en la mayoría de los casos (de Winder et al., 1999; Noffke et al., 2002; Pan et al., 2013a,b). Se estima que la producción anual en *biofilms* microfitobentónicos y matas microbianas en planicies de marea varía entre 29 y 314 g C m⁻² (Underwood y Kromkamp, 1999; Urmeneta et al., 1998), y puede tener un importante impacto en el flujo de carbono dentro las comunidades bentónicas y planctónicas (Decho, 1990; Guinder et al., 2015). La estructura del MPB está determinada por la variación de diferentes parámetros fisicoquímicos como temperatura, irradiancia, potencial redox (Eh), pH, y/o nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial (Frank y Stolz, 2009). Una adaptación significativa de estos organismos a su ambiente es la secreción de una amplia variedad de sustancias extracelulares, denominadas **sustancias poliméricas extracelulares (EPS)**, las cuales están constituidas en un 90% por polisacáridos (Hoagland et al., 1993) y otras sustancias como proteínas, lípidos y otros lipopolisacáridos (Stal, 2010; Underwood y Paterson, 2003). El crecimiento y metabolismo de los microorganismos fototróficos enriquecen los sedimentos con materia orgánica. La mayor parte de esa MO es producida por fijación de CO₂ y puede ser liberada al sedimento por procesos de fermentación, foto-respiración, expulsados como solutos o por secreción de EPS (Stal, 2002). Además, las cianobacterias, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂), pueden aportar nitrógeno orgánico a los sedimentos.

Los sedimentos de las planicies de marea son importantes sitios donde se produce la re-mineralización de la materia orgánica. Así, una vez que las poblaciones fototróficas declinan, aumenta la actividad catabólica de las bacterias heterótrofas sésiles, que tienen la capacidad de incorporar y metabolizar la materia orgánica a través de la secreción de enzimas que hidrolizan los sustratos liberados por el MPB o la materia orgánica disuelta

(MOD) y particulada (MOP) procedente del medio externo. Las bacterias fermentadoras inician el proceso catabólico liberando diversos ácidos y alcoholes que son rápidamente utilizados como sustratos por las bacterias acetogénicas. Los productos resultantes de la hidrólisis enzimática (nutrientes inorgánicos) pueden ser incorporados por diferentes organismos microbianos, quedar atrapados en la matriz polimérica extracelular o difundir a la columna de agua como sustancias inorgánicas disueltas (Lock, 1993). Se ha observado que el MPB produce mucho más productos extracelulares que el fitoplancton, y el carbono que fluye dentro del “*microbial loop*” (~ 50% del carbono fotosintético), a través de la degradación enzimática de estos productos extracelulares, en el sistema bentónico supera al del sistema pelágico de la columna de agua (Goto et al., 2001; Bhaskar y Bhosle, 2005).

1.3. Matas microbianas y *biofilms* en ambientes costeros

Los microorganismos tienen la capacidad de colonizar diferentes tipos de hábitats y de interactuar unos con otros, formando comunidades microbianas más o menos complejas, que pueden clasificarse en dos tipos: a) *biofilms* microbianos/biopelículas y b) matas microbianas/tapetes microbianos.

a) *Biofilms* microbianos/Biopelículas

Se definen como “*una asociación altamente compleja de bacterias y microalgas sobre una superficie sólida embebidos en una matriz mucilaginosa de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)*” (Costerton et al., 1995; Decho, 2000).

El primero en observar *biofilms* en los ambientes costeros fue Claude Zobell en 1943; mientras que, en 1995 el grupo del Dr. Costerton los estudió en ecosistemas de agua dulce. Dichas asociaciones microbianas crecen principalmente sobre sustratos sólidos como metales, vidrio, plásticos, madera, rocas, sedimentos gruesos y finos. En ambientes naturales, la mayoría de los organismos procariontes producen “*biofilms*” como resultado de una adaptación al ambiente e incluso como una etapa de crecimiento (Costerton et al., 1995).

Los microorganismos que constituyen el *biofilm* forman microcolonias distribuidas en un patrón controlado dentro de las EPS y no están estratificados. Esta matriz mucilaginosa contiene canales y espacios vacíos (Fig. 1.2) dispuestos de una manera que permite que los nutrientes y gases lleguen a todos los miembros del sistema (Lawrence et al., 1998). El agua puede formar hasta un 97% de la masa total del *biofilm* (Krumbein, 1994; Zhang et al., 1998).

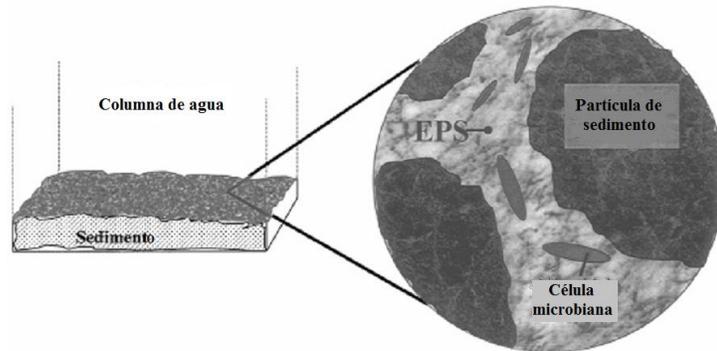


Fig. 1.2: Formación de canales en un biofilm (extraído de Decho, 2000)

En los *biofilms* los organismos celulares están en equilibrio con su ambiente, ya que el EPS funciona como un *buffer* contra los factores de *stress* externos y pueden moverse libremente dentro de la matriz mucilaginosa. Sin embargo, su motilidad depende de la viscosidad del EPS; así cuanto mayor sea la viscosidad, los organismos la irán perdiendo, y pueden llegar a quedar inmovilizados (Sutherland, 2001).

La formación y desintegración de un *biofilm* ha sido descrita por Stoodley et al. (2002) en 4 etapas (Fig. 1.3):

- 1) **Adsorción reversible:** Los microorganismos planctónicos se adhieren a la superficie de los sedimentos generando una pequeña cantidad de EPS. Si el contenido de nutrientes en la superficie es escaso, el *biofilm* adquiere una estructura simple y estará conformado por una especie celular. Este proceso se lleva a cabo bajo condiciones de calma, sin resuspensión del sedimento por la marea. En esta etapa los organismos adheridos inicialmente pueden volver a su condición planctónica.

- II) **Adsorción Irreversible:** Se caracteriza por una secreción rápida de EPS y la adhesión irreversible de los organismos a la superficie del sustrato, formando una monocapa y microcolonias (Danese et al., 2000). En esta etapa comienza a hacerse importante la comunicación química entre las células que conforman el *biofilm*, denominada “*Quorum sensing*”. La comunicación se activa cuando la densidad celular es suficientemente alta (Davies et al. 1998; Fuqua y Greenberg, 2002; Bassler y Losick, 2006). Actúan pequeñas enzimas (“moléculas señales”) que desencadenan la producción de EPS y coordinan la ubicación de los organismos dentro de la matriz exopolimérica.
- III) **Maduración:** Este proceso se da en ambientes donde la concentración de nutrientes es elevada, permitiendo la formación de *biofilms* altamente complejos. En esta etapa el EPS se reordena para permitir la formación de los canales y poros que sirven para el transporte de nutrientes, la cooperación metabólica, evacuación y eliminación de residuos. De esta manera los microorganismos se reproducen y generan más EPS, aumentando la superficie de intercambio iónico y el volumen de la comunidad microbiana que da lugar al *biofilm*.
- IV) **Desintegración:** En esta etapa se produce el desprendimiento de los microorganismos o incluso de partes del *biofilm*, que pueden ser transportadas y depositadas nuevamente en otra zona de la superficie de los sedimentos. Con este proceso los microorganismos pueden retomar su vida planctónica. La desintegración puede ser provocada por la falta de nutrientes, por una superpoblación o por cambios estacionales en el ambiente.

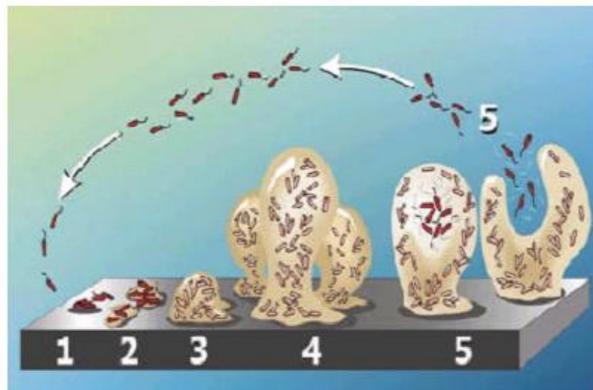


Fig. 1.3: Formación y desintegración de un biofilm. 1, 2 y 3 representan las etapas de adsorción (I y II); 4 representa la etapa de maduración (III) y 5 representa la etapa de desintegración (IV) (extraído de Sánchez Palacios y Torres-Alvarado, 2005).

b) Matas microbianas/ Tapetes microbianos

En la literatura existen varias definiciones y a continuación se enumeran solo dos de las más actuales:

“Las matas microbianas son diversas comunidades de biofilms altamente estructurados viviendo dentro de los confines de gradientes geoquímicos marcadamente definidos, que fluctúan predeciblemente durante un ciclo diurno (es decir, 24hs)” (Decho et al., 2010).

“Las matas microbianas pueden entenderse como etapas avanzadas del biofilm que forman láminas/estratos en las superficies de las planicies de marea, donde se reflejan la interrupción en la sedimentación, o en otros términos, en el tiempo de crecimiento, la condensación de la biomasa, y la sucesión biológica” (Gerdes, 2010).

Estas definiciones hacen referencia a la definición dada por Neu (1994): “*Las matas microbianas son por definición verdaderos biofilms*”. Sin embargo, a pesar de esta unificación existen algunas diferencias entre estos dos tipos de consorcios microbianos.

Stoodley et al., (2002) explicó la formación de las matas microbianas a partir del desarrollo de un *biofilm*, que rodea los granos de arena individuales y que se expande hacia los granos de sedimento adyacentes para formar una capa orgánica lateralmente continua y macroscópicamente visible. A medida que el biofilm ocluye gradualmente la superficie expuesta, diferentes especies comienzan a colonizarlo. En cuestión de días y en presencia de un alto contenido de nutrientes, una sucesión de microorganismos se desarrolla en un ecosistema microbiano complejo de varias capas en marismas y estuarios (Krumbein et al., 1977; Stal et al., 1985; Stal, 2010), que pueden extender su distribución uniforme a la zona intermareal alta y supramareal baja (Fig. 1.4)

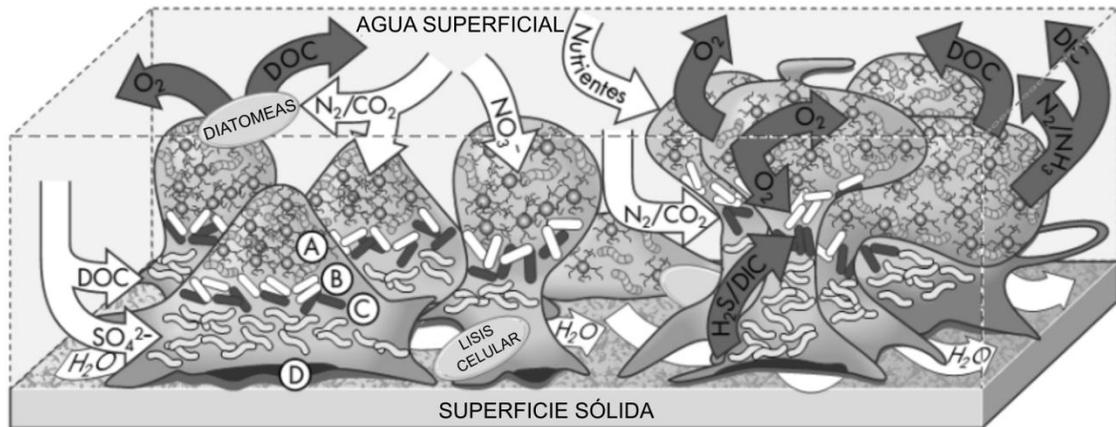


Fig. 1.4: Estructura hipotética de una mata microbiana en sedimentos superficiales constituida por un consorcio de diferentes microorganismos viviendo dentro de la matriz de EPS. Los productores primarios generan carbono orgánico disuelto (DOC, del inglés: dissolved organic carbon), el cual es reducido por la comunidad de heterótrofos a carbono inorgánico disuelto (DIC, del inglés: dissolved inorganic carbon). Se muestran canales de agua discretos. (A) Cianobacterias entremezcladas con organismos aeróbicos y bacterias reductoras de nitratos. (B) organismos fotosintéticos oxidantes de sulfuros y no coloreados. (C) Lisis celular y bacterias reductoras de sulfatos. (D) Minerales de sulfuro. Las flechas abiertas de color blanco representan los flujos dentro de la mata, mientras que las flechas cerradas de color gris representan los metabolitos excretados (extraído de Konhauser, 2007).

La biomasa de los microorganismos que conforman la mata puede representar hasta el 90% de la materia orgánica durante la etapa de formación inicial y disminuir hasta un 10% cuando está bien desarrollada (Christensen y Characklis, 1990). Las matas microbianas son sistemas vivos y por lo tanto temporales. En su estado final, la mata puede fragmentarse en pequeñas porciones que son transportadas por las corrientes y mareas. Estos fragmentos pueden disolverse completamente liberando las células individuales dentro de la columna de agua o re-depositarse en otro sitio, donde puede servir como núcleo para la formación de una nueva mata microbiana.

A nivel mundial, los dos tipos de comunidades microbianas descritas anteriormente se desarrollan sobre planicies de marea y playas, con baja pendiente y sedimentos finos (Stal, 2012). Cubren un gran número de superficies costeras, siendo las especies de cianobacterias dominantes *Coleofasciculus (Microcoleus) chthonoplastes* y *Lyngbya aestuarii* (Severin y Stal, 2008; Bolhuis et al., 2014). Estos organismos son los constructores de las matas microbianas costeras produciendo biomasa, EPS y materia orgánica, que forman la base de la red trófica y soportan una gran diversidad de grupos funcionales de los microorganismos (Stal et al., 1984; van Gemerden, 1993; Bebout y

García-Pichel, 1995; Guerrero et al., 2002; Abed et al., 2008; Dijkman et al., 2010; Severin et al., 2010; Bauersachs et al., 2011; Gobet et al., 2012).

Por lo general, las cianobacterias son consideradas los organismos pioneros en la formación de las matas microbianas, debido a que pueden adaptarse fácilmente a los cambios y fluctuaciones de las condiciones del ambiente y a su capacidad para usar el N₂ como fuente de nitrógeno (Gerdes, 2010; Noffke, 2010; Stal, 2012). Sin embargo, las diatomeas a menudo suelen estar presentes en las matas microbianas (Mir et al., 1991; Yallop et al., 1994; Stal, 2002; Bolhuis et al., 2013; Cuadrado et al., 2015).

Las áreas intermareales y supramareales son ambientes extremos por diferentes razones. Debido a que las planicies de marea son inundadas en forma irregular, ellas experimentan fuertes fluctuaciones en la salinidad (variando desde condiciones de agua dulce, después de las lluvias, a condiciones hipersalinas moderadas, luego de una desecación prolongada), así como grandes cambios en la temperatura. Como consecuencia de las extremas condiciones que experimentan los sedimentos, el rango de organismos capaces de vivir en este tipo de ambientes es limitado. La casi ausencia o exclusión de organismos superiores que puedan ejercer pastoreo sobre las matas y *biofilms* permite que las cianobacterias y las diatomeas se acumulen en la superficie de los sedimentos (Stal y Caummette, 1994; Fenchel, 1998; Stal, 2002; Seckbach y Oren, 2010).

La influencia del viento sobre las planicies de marea juega un rol fundamental en la dinámica de estos ambientes y las olas tienen una gran importancia en los procesos de erosión, transporte y deposición de los sedimentos en el sistema. Sin embargo, las matas microbianas se desarrollan durante períodos de “latencia”, es decir, cuando la erosión y la deposición de los sedimentos es baja (Noffke, 2010). Las matas ocurren en lugares donde generalmente las corrientes de marea son suaves y tienen poco efecto sobre la geomorfología del ambiente, y es favorecida por la presencia de granos de cuarzo finos, limpios y transparentes (Noffke et al., 2002).

Según Noffke (2010), las poblaciones microbianas descritas en la sección 1.3. y que se desarrollan sobre planicies de marea, pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a los cambios hidrodinámicos que las afectan. La distribución específica depende del rango de mareas y puede hallarse una sucesión lateral entre la zona intermareal baja y la zona supramareal alta.

Biofilms: Se desarrollan en la zona intermareal baja y no da lugar la formación de matas debido a que los sedimentos son constantemente removidos por la marea. Presentan estratificación cruzada y una laminación plana. Estas estructuras sedimentarias registran las condiciones dinámicas turbulentas y presentan restos de bioclastos y otros detritos de pequeños tamaños.

Matas microbianas endobentónicas: Ocurren en la zona intermareal alta estabilizando las ondulaciones que se forman sobre la superficie como producto de las mareas y pueden permanecer fijas durante dos meses aproximadamente. En esta zona la mata se desarrolla sobre los primeros milímetros del sedimento. Su presencia está dada por una coloración azul verdosa brillante de los sedimentos. Se ha observado que se desarrollan en primavera, florecen en verano y se descomponen hacia el otoño. Generalmente es dominada por las cianobacterias filamentosas *Lyngbya aestuarii* y *Oscillatoria limosa*.

Matas microbianas epibentónicas: Se desarrollan sobre la superficie de los sedimentos y pueden alcanzar un espesor de hasta 1,5 cm. Las planicies de mareas cubiertas por este tipo de matas presentan un aspecto plano. Son encontradas típicamente en la zona supramareal. Pueden permanecer intactas entre dos semanas, en la zona supramareal baja, y varios meses en la zona supramareal alta. Este tipo de matas es dominada usualmente por la cianobacteria *Microcoleus chthonoplastes* asociada a otras especies filamentosas como *Oscillatoria limosa*, *Lyngbya aestuarii* y *Phormidium* spp. y con menos frecuencia *Spirulina* sp. A diferencia de las matas endobentónicas, estas se desarrollan durante la primavera y el verano y se las considera perennes dado que no se descomponen durante el otoño.

Estas comunidades microbianas pueden desarrollarse en una amplia variedad de ambientes como estuarios, ambientes geotermales, playas y las grandes cubiertas de hielo de la Antártida. Asimismo, se han observado ensamblajes microbianos asociados a partículas orgánicas e inorgánicas suspendidas en el ambiente marino (nieve marina) (Bhaskar y Bhosle, 2005). Los *biofilms* y matas microbianas también se han desarrollado en zonas sujetas a la influencia de actividades antropogénicas, como los ambientes extremos que se forman en los drenajes ácidos de las minas, donde participan del ciclo

del azufre, y el tratamiento de aguas residuales, mantos acuíferos contaminados con petróleo y donde existe una alta actividad nitrificante.

1.4. Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS)

Las EPS son polímeros que se depositan fuera de la célula microbiana y constituyen un componente fundamental en los *biofilms* y las matas microbianas. Estos polímeros están compuestos principalmente por carbohidratos, pero muchos contienen otros componentes como proteínas, ADN y glicolípidos (Stal, 2011). Las EPS están involucradas en la adhesión de los microorganismos al sustrato, siendo el agente estructural primario de los ambientes microbianos, ya que constituyen la matriz en la cual los organismos se encuentran embebidos (Decho, 2000).

Muchos microorganismos, tanto fotótrofos como heterótrofos, pueden producir estos exopolisacáridos. Las diatomeas marinas bentónicas y las cianobacterias forman tres tipos de sustancias poliméricas:

- (i) **Endógenas:** son compuestos intracelulares que sirven de almacenamiento.
- (ii) **Capsulares:** polisacáridos que envuelven la pared celular.
- (iii) **Coloidales (mucilago o slime):** polisacáridos libres en el medio.

Los polisacáridos endógenos están formados por polímeros de glucógeno, que consisten en moléculas de glucosa α (1-4) y α (1-6) unidas. Los polímeros capsulares pueden sub-dividirse en: (a) polisacáridos bien estructurados que rodean la pared celular formando una vaina que refleja la forma de la célula y (b) polisacáridos menos estructurados, que se encuentran fuera de la vaina formando capas externas, pero que se mantienen asociados a los organismos y se los denomina glicolaxis. Están asociados al crecimiento y la síntesis celular. Los polisacáridos que forman el mucilago, se encuentran débilmente adheridos o no adheridos a los microorganismos e incluso pueden ser exudados libremente en el medio circundante. Es la fracción menos condensada y probablemente se produce como resultado de un crecimiento desbalanceado con el fin de disipar el exceso de energía y está conectada a vías metabólicas desasimilatorias. Los polímeros coloidales y los que forman el glicolaxis son considerados como polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos. Sin embargo, las diferentes fracciones generalmente no son bien definidas y dependen principalmente de los métodos de extracción utilizados

para determinar la concentración de las EPS (Staats et al., 2000a; Underwood y Paterson, 2003; de Brouwer et al., 2006; Stal, 2010; Rossi y De Philippis, 2015).

Las EPS son un componente ubicuo de los ecosistemas marinos. Su producción es altamente variable (Pierre et al., 2014) y depende de varios factores tales como, la fase de crecimiento celular, la fotosíntesis e irradiancia, la biomasa, los ritmos de migración vertical, temperatura, humedad, salinidad, el contacto con metales pesados y la disponibilidad de nutrientes (Staats et al., 2001; Wolfstein y Stal, 2002; Underwood y Paterson, 2003; Hanlon et al., 2006; Steele et al., 2014; Rossi y De Philippis, 2015).

Gran parte de los polisacáridos que forman las EPS son heteropolisacáridos compuestos por diferentes monosacáridos. Han sido reportadas EPS constituidas solamente por azúcares neutros (Taylor et al., 1999; de Winder et al., 1999; Bellinger et al., 2005; Urbani et al., 2012) y otras que contienen importantes cantidades de ácidos urónicos, como el D-galacturónico y D-Glucorónico (de Brouwer et al., 2003 y 2005; Pierre et al., 2012; Shniukova y Zolotareva, 2015) o aminoazúcares como la glucosamina (de Brouwer et al., 2005; Barnech Bielsa et al., 2016). De acuerdo a su composición y a los grupos funcionales presentes las EPS pueden poseer carácter hidrofóbico o hidrofílico (Decho, 1994).

Han sido descritas muchas funciones para las sustancias poliméricas extracelulares y algunas de ellas se detallan en la tabla 1.1:

Tabla 1.1: Descripción de las propiedades y funciones de las EPS

Función	Descripción
Adhesión/inmovilización	Depende de las características hidrofóbicas de las EPS, ayuda a los organismos a adherirse a superficies sólidas
Protección contra estresores ambientales	Protege a los organismos de la desecación, el pastoreo, las sustancias tóxicas, la radiación UV-A/B y las variaciones de pH y salinidad
Bioestabilización	Aumenta la resistencia de los sedimentos a la erosión
Motilidad	Ayuda al desplazamiento y propulsión de los organismos
Floculación	Entrampa partículas de arcillas y disminuye la turbidez del agua
Emulsión	Protege los sitios hidrofóbicos de la envoltura celular y le permite a la célula cambiar entre naturaleza hidrofóbica e hidrofílica
(Anti)-Calcificación	Puede inducir o no la precipitación de CaCO_3 (litificación)
Quorum sesing	Ayuda a la comunicación entre las células
Bioremediación	Actúan como biofloculantes de metales, radionucleídos y otros compuestos contaminantes
Reposición de nutrientes	Contribuye a la re-mineralización de nutrientes y sirve como fuente de C para organismos heterótrofos

Las EPS juegan un rol fundamental en la adhesión de los organismos celulares a la superficie del sustrato durante la formación del *biofilm* y/o mata microbiana, y en la bioestabilización de los sedimentos que colonizan (Paterson et al., 1994; Yallop et al., 1994).

Los organismos de estos ambientes a menudo están sujetos a la desecación. Las EPS pueden retener grandes cantidades de agua y formar un gel que estabiliza los componentes macromoleculares y la estructura de los microorganismos que las producen, ayudando a superar grandes períodos de sequía mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno con las proteínas y los lípidos y el ADN de la membrana celular. De esta manera sustituyen el agua que rodea las células (Caiola et al., 1996; Potts, 1994; Rossi y De Philippis, 2015).

Algunas de las EPS de las cianobacterias pueden ser hidrófobas debido a la presencia de grupos acetilos, restos de péptidos o desoxiazúcares que determinan las propiedades emulsionantes y reológicas de estas sustancias y mejoran la adhesión de estos organismos a las superficies sólidas (Neu, 1990 y 1992; Decho, 2010).

Las EPS con carácter hidrofílico incluyen grupos funcionales como carboxilo (R-COOH), hidroxilo (R-OH), amino /R-NH₂), sulfonatos (R-SO₃H), fosfatos (R-PO₄) y sulfatos (R-O-SO₃H) especialmente importantes en la interacción molécula-molécula y con las partículas de sedimento, en el enlace de metales y en la capacidad de conducir la precipitación órgano-mineral (Decho, 2010; Stal, 2012). Las EPS con mayor cantidad de ácidos urónicos son más eficientes en la estabilización del sedimento (Stal, 1994) y en la retención de agua (Decho, 1994). Las EPS funcionan como quelantes de cationes, ya que la presencia de grupos hidroxilo y/o carboxilo enlazan fuertemente al Ca²⁺ y otros cationes, tales como el Mg²⁺ inhibiendo la precipitación del CaCO₃.

Las cianobacterias bentónicas pueden secretar floculantes, exopolímeros que producen flóculos unidos a partículas de detritus y otros materiales que se encuentran en la columna de agua. Estos flóculos finalmente sedimentan, disminuyendo la turbidez del agua y, por lo tanto, mejoran las condiciones para los fotótrofos bentónicos (Bar-Or y Shilo, 1987 y 1988; Bender et al., 1994).

Se considera que las EPS que forman el mucilago son generalmente producidas debido a un crecimiento desbalanceado causado por deficiencia de nutrientes (Lange, 1976; Stal, 2010). Así por ejemplo, la escasez o déficit de nitrógeno y/o azufre resulta en el estancamiento de la síntesis de proteínas y aminoácidos, mientras que la capacidad

fotosintética y la fijación de CO₂ permanecen inalteradas. Bajo tales condiciones, las cianobacterias y las diatomeas pueden acumular grandes cantidades de glucógeno (Allen y Smith, 1969; Lehmann y Wöber, 1976). Debido a que la capacidad de almacenamiento de esta EPS endógena es limitada en los microorganismos, parte de las EPS es exudada al medio como compuestos extracelulares, quedando disponibles para el resto de la comunidad microbiana (Stal, 2010).

Existe una rápida transferencia del carbono fijado por fotosíntesis dentro de las EPS y luego dentro de los organismos heterótrofos (Goto et al., 2001; Bellinger et al., 2009; Oakes et al., 2010). Los polisacáridos de bajo peso molecular y otros carbohidratos son rápidamente degradados por las bacterias bajo condiciones aerobias, seguido por la utilización de los constituyentes mayores de las EPS coloidales y menos solubles de las EPS capsulares (Giroldo et al., 2003; Goto et al., 2001; Haynes et al., 2007; Hofmann et al., 2009). También se ha observado la presencia del carbono de las EPS en los fosfolípidos de ácidos grasos (Bellinger et al., 2009; Gihring et al., 2009; Middelburg et al., 2000) y en el ARN de varios grupos de bacterias (Taylor et al., 2013).

Por otra parte, esta matriz orgánica extracelular está en constante modificación y puede dejar los sedimentos mediante solubilización en agua, debido a cambios en los parámetros físico-químicos, la degradación bacteriana o por el consumo de invertebrados (Underwood y Paterson, 2003; Haynes et al., 2007). Algunos exopolisacáridos son recalcitrantes a la degradación microbiana, mientras que otros no. Decho et al. (2005) observó que las EPS de las matas microbianas, que son recientemente formadas pueden ser rápidamente transformadas (dentro de las 12 horas) por degradación de organismos heterótrofos, particularmente por las bacterias sulforeductoras. Estas bacterias degradan preferentemente compuestos orgánicos de bajo peso molecular como acetatos, lactatos y etanol, por lo que la degradación puede ser incompleta causando la acumulación de polímeros más refractarios enriquecidos en nitrógeno (Stal, 2012). Un modelo similar fue propuesto por Stal (2010) en *biofilms* de diatomeas, las cuales generan EPS enriquecidas en glucosa. Dado que este monosacárido es el componente principalmente utilizado y degradado, los *biofilms* se enriquecen con ácidos urónicos los cuales se acumulan y son más refractarios.

La producción de una mezcla de carbono lábil y refractario en *biofilms* y matas microbianas genera condiciones adecuadas que favorecen las interacciones bacterias-MPB en los sedimentos de las planicies de marea (Agogué, et al., 2014). Además, ha sido

reportado por McKew et al. (2013) que un diverso consorcio de microorganismos (incluyendo la coexistencia de reductores de sulfatos y metanógenos) puede degradar tanto el carbono lábil como el refractario derivado del MPB y que la degradación anaerobia es el principal destino de los componentes estructuralmente más complejos de las EPS producidas por el MPB.

La excreción de materia orgánica por estos consorcios microbianos claramente es crucial en el ciclo del carbono. El exceso de carbono liberado al medio como EPS también puede ser utilizado por las mismas cianobacterias y diatomeas, constituyendo un *pool* dinámico de los recursos extracelulares en matas microbianas (Taylor et al., 2013; Stuart et al., 2015).

1.5. Importancia de los nutrientes inorgánicos disueltos

Las microalgas bentónicas que colonizan la superficie de las planicies de marea, generalmente diatomeas y cianobacterias, son los productores primarios involucrados en la asimilación y el reciclado de nutrientes (McGlathery et al., 2004). La importancia de los nutrientes para el MPB radica en parte en el tipo de sedimento. Los sedimentos finos cohesivos generalmente presentan un alto contenido de materia orgánica, con elevadas velocidades de mineralización bacteriana y altas concentraciones de nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial (Heip et al., 1995; Underwood y Kromkamp, 1999). Gran parte de los ciclos biogeoquímicos, que son fundamentales para la descomposición de la materia orgánica, son controlados por las comunidades microbianas (Atlas y Bartha, 2002; Galloway, 2005), y la biomasa del MPB es la que regula la transformación y almacenamiento de nutrientes (Reddy y DeLaune, 2008). El proceso de fotosíntesis y la asimilación de nutrientes llevada a cabo por el MPB tiene un fuerte impacto en las vías de mineralización y regulan la magnitud de los flujos de nutrientes en la interfase agua-sedimento (Hochard et al., 2010).

Las matas microbianas y los biofilms que se desarrollan en ambientes costeros están íntimamente relacionados con los ciclos biogeoquímicos de los elementos, ya que todos los nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial pueden circular entre los canales y poros que se forman entre las partículas de sedimento y la matriz exopolimérica (Fig. 1.4). Los ciclos de los nutrientes en las matas microbianas son en gran medida cerrados, aunque pueden existir pequeños flujos de elementos que se intercambian con la geósfera,

biósfera y atmósfera (Stal y Noffke, 2011). Los nutrientes inorgánicos disueltos pueden ser transferidos desde la columna de agua hacia el agua intersticial y viceversa, a través de procesos de difusión. Esto se produce por medio de gradientes de concentración, desde la zona más concentrada a la zona de menor concentración. Sin embargo, el flujo vertical dentro de las matas puede verse dificultado dentro de los primeros milímetros, debido a que las EPS disminuyen la velocidad de difusión de los iones contribuyendo de esta manera a enlazar y almacenar los nutrientes necesarios para sostener la producción primaria (Jørgensen, 1994; Paerl y Pinckney, 1996). El proceso de difusión molecular se da a una pequeña distancia de la superficie de la mata (~ 1 ó 2 mm) y a esta delgada capa de la columna de agua, se la denomina *Capa difusiva límite*. La difusión de iones y de pequeñas moléculas dentro de la mata es significativamente menor cuando pasan a través de la matriz exopolimérica, comparada con la difusión de las mismas moléculas dentro de la columna de agua (Jørgensen, 1994).

Los flujos bentónicos de nutrientes y finalmente su distribución espacial y temporal pueden ser afectados por la concentración localizada de los iones, la composición de las EPS, las concentraciones de los aniones y cationes competitivos presentes, y por factores ambientales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, el contenido de materia orgánica y la granulometría de los sedimentos (Decho, 1994, Wilson y Brennan, 2004; Ospina-Alvarez et al., 2014).

El MPB regula los flujos por incorporación directa de nutrientes inorgánicos (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} y DSI) y orgánicos disueltos. En los sedimentos inter y supramareales, en donde la luz no es limitante, se desarrollan densas poblaciones de cianobacterias bentónicas fijadoras de nitrógeno que pueden contribuir con la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) (Stal, 2012). En matas microbianas se han reportado velocidades de fijación de N_2 que varían entre $0,8 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ y $76,0 \text{ g N m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ (Herbert, 1999).

Generalmente se asume que la producción primaria de los ambientes marino-costeros está limitada por nitrógeno y/o fósforo. En particular, las matas microbianas que presentan una biomasa densa y compacta a menudo experimentan escases de nitrógeno. Existen muy pocos estudios del fósforo (P) en estos ambientes. Sin embargo, el P es indispensable para el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos. Éste forma parte del ATP, ADP, los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y los fosfolípidos, y está involucrado en una gran variedad de reacciones geoquímicas que son importantes para los microorganismos (Stal, 2002). Tanto las cianobacterias como las diatomeas pueden

obtener el P del PO_4^{3-} o de un amplio rango de moléculas orgánicas, lo que depende además del tipo de especie (Whitton et al., 1991 y 2005).

La concentración y disponibilidad de nutrientes en este tipo de ambientes también influye en la producción de las sustancias poliméricas extracelulares. Varios autores han reportado que la limitación de nutrientes estimula la sobre-producción y/o acumulación de exopolisacáridos debido a un crecimiento desbalanceado de los organismos fototróficos (de Winder et al., 1999; Staats et al., 2000b; Aslam et al., 2012). Además, la limitación de nutrientes también afecta la composición de monosacáridos de las EPS (Underwood et al., 2004).

A pesar de la importancia que tienen los nutrientes, para que estos consorcios microbianos se desarrollen y prosperen, los estudios acerca de las concentración de nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial son aún muy escasos y recientes (Al-Raei et al., 2012; Spetter et al., 2015a; Fan et al., 2015). La mayoría de los estudios en matas microbianas se han centralizado en el ciclo del C, N y S (Stal y Caumette, 1994; Seckbach y Oren, 2010; Whitton y Potts, 2012).

Segunda Parte: Área de estudio y antecedentes

1.6. Estuario de Bahía Blanca

El estuario de Bahía Blanca (EBB, $38^{\circ} 45' - 39^{\circ} 40' \text{S}$; $61^{\circ} 45' - 62^{\circ} 30' \text{W}$) se encuentra ubicado en la zona suroeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Fig. 1.5). El mismo está formado por una serie de canales de marea orientados en dirección noreste a sureste, entre los cuales se destaca el Canal Principal de Navegación, y separados por extensas planicies de marea, parches de marismas e islas (Perillo, 1995b). La superficie total del sistema es de aproximadamente 2300 km^2 , de los cuales 1150 km^2 corresponden a zonas intermareales, 740 km^2 a zonas submareales y 410 km^2 son islas (Piccolo et al., 2008).

El EBB presenta una forma triangular o de embudo y es considerado un estuario mesomareal, con una amplitud media de marea que varía entre 2,2 m en la boca y 3,5 m en la cabecera (Perillo et al. 2001). Las mareas son la principal fuente de energía del estuario y se caracteriza por un régimen semidiurno, lo que implica que grandes extensiones de planicies de marea se encuentren expuestas a la atmósfera durante

muchas horas del día. El área cubierta durante la bajamar es de aproximadamente 400 km², mientras que durante la pleamar la superficie cubierta es aproximadamente tres veces mayor (~ 1300 km²).

Los sedimentos en el estuario son predominantemente limo-arcillosos y ha sido descrito como un sistema con un considerable transporte de sedimento en suspensión y que presenta un estado erosivo en su conjunto (Gelós et al., 2004; Piccolo et al., 2008). Los sedimentos más finos (limos y arcillas) se transportan en suspensión dentro de la columna de agua originando elevados valores de turbidez, mientras que las arenas son trasladadas por la acción de las corrientes mareales sobre el fondo (Cuadrado et al., 2004).

Respecto a la distribución de la salinidad, el estuario puede considerarse en términos generales como “verticalmente homogéneo” (del tipo C de acuerdo con la clasificación de Cameron y Pritchard, 1963; Freije et al., 1981), siendo la mezcla turbulenta de la marea el mayor factor de la ruptura de la estratificación (Piccolo y Perillo, 1990).

La región es caracterizada por un clima templado y seco-semiárido, con mayores precipitaciones en verano y menores en invierno. Sin embargo, la gran variabilidad temporal de las precipitaciones ha sido considerada como la principal característica climática de la región (Scian y Pierini, 2013). Los períodos secos y húmedos pueden durar décadas y se alternan en una oscilación cíclica, con valores de precipitación anual que pueden variar desde 300 mm año⁻¹ durante la fase árida hasta valores que exceden los 900 mm año⁻¹ en años extremadamente húmedos (Zotelo, 2011). El patrón de lluvias afecta el aporte de agua dulce al EBB, el cual es reducido y actualmente está representado principalmente por el río Sauce Chico (ubicado en la cabecera) y el arroyo Napostá Grande (próximo a Ing. White) con caudales medios anuales de 1,9 y 0,8 m³ S⁻¹ respectivamente (Perillo et al., 2004; Piccolo et al., 2008). Sin embargo el mayor aporte de agua dulce, nutrientes y contaminantes está dado por la descarga cloacal de las ciudades de Bahía Blanca, Ingeniero White y Punta Alta. En la costa norte del EBB, además de estas grandes ciudades, se encuentra uno de los sistemas portuarios más grandes de la Argentina, por lo cual el ambiente se ve sometido a una intensa actividad antrópica. Está rodeado por diferentes tipos de industrias: petrolera, petroquímica y química (PBB Polisur, Dow Chemical Company, Mega, Profertil SA y Solvay Indupa), donde se produce etano, gas oil, etileno y polietilenos, PVC, urea granulada, amoníaco líquido, hidróxido de sodio y cloro, entre otras materias primas; como así también de grandes cerealeras (Cargill SACI).

Históricamente, el EBB ha si considerado como naturalmente eutrófico, debido a su elevado contenido de nutrientes y altos niveles de productividad biológica (Freije y Marcovecchio, 2004; Spetter et al., 2013). El máximo valor de productividad primaria en la columna de agua ha sido estimado en $1260 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, asociado a una elevada concentración de clorofila *a* ($48,26 \text{ mg m}^{-3}$) (Freije et al., 1980; Fernández et al., 2014), mientras que en los sedimentos ha sido estimada en $104,7 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Lencina, 2007) . Este tipo de ambientes presenta importantes acoplamiento betónico-pelágico, como ha sido reportado para la zona interna del estuario por Guinder et al. (2015) y Zapperi et al. (2016).

1.7. Puerto Rosales: Sitios de muestreo

Los sitios de muestreo seleccionados para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis, están localizados en la zona media del estuario, en Puerto Coronel Rosales ($38^{\circ} 55'S$; $62^{\circ} 03'O$), situado en la costa noreste del EBB (Fig. 1.5 y 1.6) y donde, hacia fines del año 2012 comenzó a funcionar la denominada *Zona Franca Zona Sur*, que tiene como objetivo fomentar el comercio y la actividad Industrial Exportadora.

Ésta área se caracteriza por un clima templado seco, con una temperatura media anual del aire de $15,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (rango medio desde $22,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en enero a $8,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en Julio), una baja precipitación media ($460, 5 \text{ mm}$) y una alta velocidad de evaporación (Piccolo y Diez, 2004). El intercambio de agua con el estuario es regulado por un ciclo de marea semi-diurno, inundando las extensas planicies de marea dos veces al día. La radiación solar promedio acumulada en días nublados es de 28 MJ m^{-2} en verano y de 11 MJ m^{-2} en invierno (Beigt, 2006).

La zona de Puerto Rosales es un sistema deposicional silicoclástico con extensas planicies de marea ($\sim 1000 \text{ m}$ de ancho) y una pequeña pendiente (gradiente $\sim 0,4^{\circ}$). La superficie de los sedimentos muestra una distribución bimodal del tamaño de partícula que va desde arena fina-media a limo, compuesto principalmente por cuarzo y en menor cantidad por feldespatos (Cuadrado y Pizani, 2007).

Los vientos locales desde el Sureste al Noreste (con dirección noroeste) son comunes en esta área. La velocidad del viento es máxima en verano y mínima en otoño e invierno, alcanzando valores mensuales promedio entre $15,9$ y 32 Km h^{-1} (Piccolo y Diez, 2004). El nivel del agua es notablemente influenciado por la dirección del viento. En presencia de vientos fuertes con dirección SE, el agua puede alcanzar la zona supramareal durante la marea alta. Sin embargo, cuando predominan los vientos del norte y noroeste, la planicie

raramente se cubre con agua y el área permanece expuesta al aire. Además, la halófito *Spartina alterniflora* (Fig. 1.7a) coloniza la zona intermareal y atenúa parcialmente la energía hidrodinámica que alcanza la zona supramareal, donde también se observan pequeños parches de *Sarcocornia perennis* (Fig. 1.7b). Así, la zona intermareal de la planicie de marea estudiada es inundada diariamente por la marea, mientras que la zona supramareal es alcanzada por el agua solo eventualmente en condiciones de sicigia (dos veces por mes) o durante eventos de tormenta.

El microfitorobentos que coloniza los sedimentos de Puerto Rosales está constituido principalmente por una asociación de cianobacterias filamentosas y diatomeas. Dentro del primer grupo, la especie dominante es la *Microcoleus chthonoplastes* (cosmopolita y típica de matas maduras), sin embargo también están presentes *Oscillatoria* sp. y *Arthrospira* sp.. Las diatomeas observadas son principalmente pennadas, dominadas por los géneros *Nitzschia* y *Navicula*, junto con *Diploneis* y *Amphora* (rango más abundante: 40 – 100 µm). Otras diatomeas de mayor tamaño (> 100 µm) como *Pleurosigma*, *Gyrosigma* y *Cylindrotheca*, son menos frecuentes. Entre las diatomeas centrales fueron identificadas *Thalassiosira*, *Coscinodiscus* y las especies *Cyclotella meneghiniana* y *Paralia sulcata* (Pizani, 2008; Pan et al., 2013a,b). Esta asociación de microorganismos en los sedimentos forma una capa coherente de espesor variable, denominada mata microbiana epibentónica (tal y como se mencionó previamente). Dicha capa está compuesta por células embebidas en las EPS y filamentos que generan una especie de malla entrelazada o una red fibrilar condensada que contiene algunas partículas de minerales (Gerdes et al., 2000).

Dentro de una zona no vegetada, y en base a las características sedimentológicas y las observaciones de campo preliminares, se seleccionaron dos sitios de muestreo (ST1: 38° 55' 17" S, 62° 03' 42" W y ST2: 38° 55' 13" S; 62° 03' 54" O) localizados en la zona supramareal baja, y un tercer sitio (ST3: 38° 55' 07" S; 62° 03' 54" W) localizado en la zona supramareal alta (Fig. 1.5 y 1.8). El ST1 se encuentra a 210 m y a 430 m de distancia del ST2 y el ST3 respectivamente.

El ST1 se caracteriza por parches bioturbados por el cangrejo cavador *Neohelice granulata* y presenta sedimentos más gruesos que el ST3. Por otro lado, el ST3 presenta sedimentos más finos y no se ve afectado por el macrozoobentos. El ST2 es un sitio intermedio entre los otros dos, donde el macrozoobentos está ausente y presenta un tamaño de grano similar al ST1.

El sustrato de las planicies de marea de PR experimenta grandes fluctuaciones en el contenido de agua, salinidad y temperatura, resultando en condiciones extremas que limitan el rango de organismos capaces de vivir en este ambiente (Cuadrado et al., 2011; Pan et al., 2013a,b).

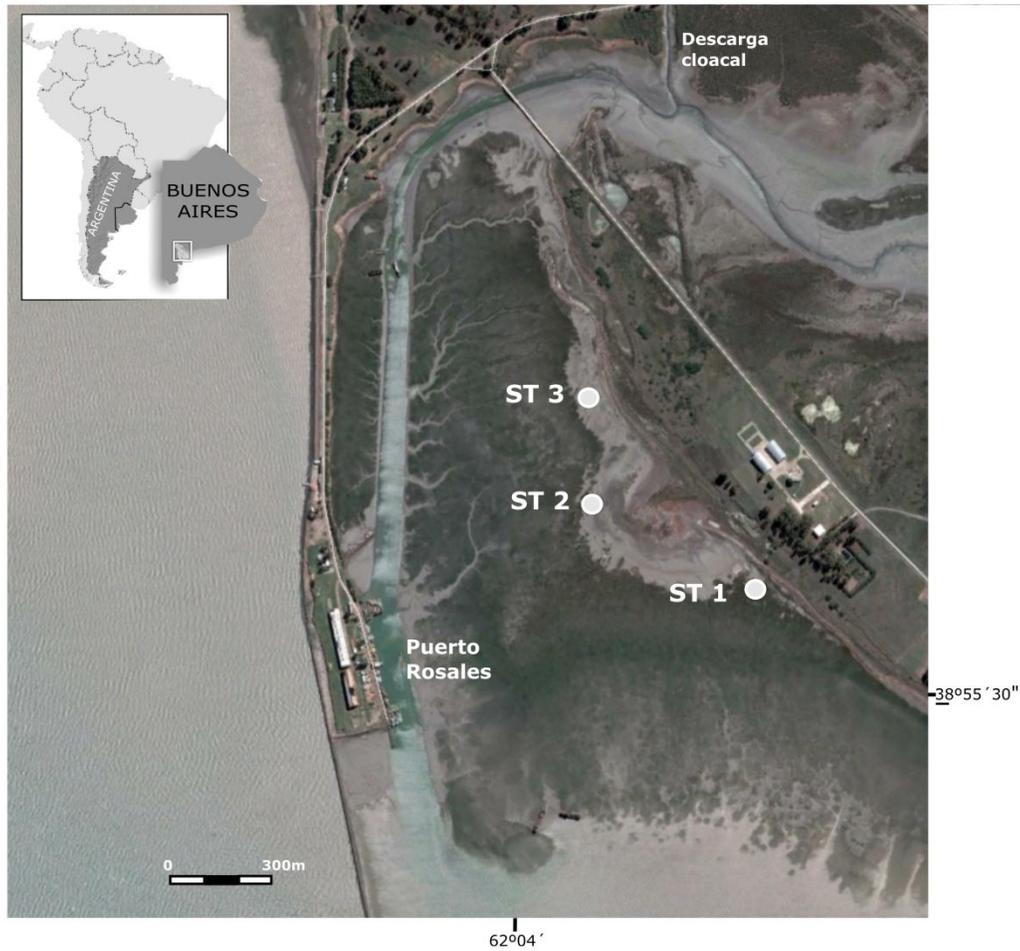


Fig. 1.5: Mapa general mostrando el estuario de Bahía Blanca, la ubicación de Puerto Rosales y los sitios de muestreo.



Fig. 1.6: Imágenes mostrando Puerto Rosales



Fig. 1.7: a) *Spartina alterniflora* y b) *Sarcocornia perennis*



Fig. 1.8: Matas microbianas y zona supramareal de las planicies de marea de Puerto Rosales (extraído de Bournod et al., 2013)

1.8. Hipótesis

- La dinámica de los parámetros físico-químicos, clorofila *a* y nutrientes regula el desarrollo de las matas microbianas en la planicie de marea costera.
- Las matas microbianas generan una planicie de marea rica en materia orgánica nueva.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivo general

Evaluar la dinámica de los parámetros oceanográficos (variables fisicoquímicas, nutrientes, clorofila *a*, materia orgánica) en agua y en sedimento de la planicie de marea con el fin de establecer las condiciones que hacen que éste sea el ambiente propicio para la proliferación de las matas microbianas.

1.9.2. Objetivos específicos

- Realizar una caracterización fisicoquímica de la planicie de marea bajo estudio.
- Evaluar la distribución de nutrientes inorgánicos de Nitrógeno, Fósforo y Silicio disueltos en agua de mar superficial e intersticial.
- Evaluar la dinámica de clorofila *a*, nutrientes inorgánicos disueltos y materia orgánica particulada en el agua superficial.
- Identificar el tamaño de grano y la composición de los sedimentos.
- Determinar la concentración de clorofila bentónica, carbono orgánico total (COT), Nitrógeno Total (NT) y Carbono Total (CT) en distintas fracciones del sedimento.
- Establecer relaciones entre la clorofila bentónica, el contenido de NT, fosforo total (PT) y nutrientes en el agua intersticial y de NT y CT en los sedimentos.
- Realizar comparaciones entre las relaciones Si:N:P obtenidas y la relación Si:N:P establecida por Redfield (1963) para detectar posibles desvíos del valor teórico (16:16:1).
- Analizar las variables climáticas (temperatura, precipitaciones, velocidad y dirección del viento, etc) que pueden modificar y/o condicionar la distribución de los parámetros a estudiar.
- Integrar la información obtenida en el marco de las condiciones ambientales determinadas.

Capítulo 2

Materiales y Métodos



Contenidos:

- Plan de muestreo
- Toma de muestras
- Procesamiento y preservación de las muestras
- Metodología Analítica
- Acondicionamiento de material

En este capítulo se resumen los parámetros medidos en las diferentes muestras, técnicas de muestreos y métodos analíticos aplicados durante el desarrollo de esta tesis.

En la siguiente tabla se detallan los muestreos y determinaciones realizadas de acuerdo al período analizado:

Tipo de Muestra	Variables	2012-2013	Invierno 2013
Sedimento	pH	X	X
	Eh	X	X
	Temperatura	X	X
	Humedad	X	X
	Materia Orgánica (MO)	X	X
	Granulometría	X	----
	Clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>)	X	X
	Feopigmentos (Feop)	X	X
	Carotenoides (Cart)	X	X
	Carbohidratos Coloidales (FC)	X	X
	Carbohidratos capsulares (FCAP)	X	X
	Isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$	----	X
	Composición de monosacáridos	----	X
Agua Superficial	Temperatura	----	X
	pH	----	X
	Conductividad	----	X
	Oxígeno disuelto (OD)	----	X
	Turbidez	----	X
	Nitrato (NO_3^-)	----	X
	Nitrito NO_2^-	----	X
	Fosfato (PO_4^{3-})	----	X
	Silicatos (DSI)	----	X
	Amonio (NH_4^+)	----	X
	Clorofila <i>a</i>	----	X
	Feopigmentos	----	X
Materia Orgánica particulada (MOP)	----	X	
Agua Intersticial	Nitrato (NO_3^-)	----	X
	Nitrito NO_2^-	----	X
	Fosfato (PO_4^{3-})	----	X
	Silicatos (DSI)	----	X
	Amonio (NH_4^+)	----	X

Los datos meteorológicos como altura de marea, velocidad y dirección del viento, precipitaciones, humedad relativa, presión y temperatura fueron extraídos *online* de la estación EMAC (<http://emac.criba.edu.ar>) ubicada en Puerto Rosales, Punta Alta (Bs.As., Argentina)

2.1. Parámetros Físicoquímicos

En los sedimentos superficiales se midieron *in situ* temperatura, pH y Eh empleando una sonda multisensor Hanna (modelo HI991003).

En agua de mar superficial, se midieron *in situ* temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD), turbidez y conductividad/salinidad utilizando una sonda multisensor Horiba U-10.

Ambos instrumentos fueron debidamente calibrados antes de cada campaña.

2.2. Toma de muestras

2.2.1. Sedimento

Para la determinación de **humedad, materia orgánica, granulometría, carbohidratos (CH), composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y contenido de carbono y nitrógeno elemental**, se tomaron muestras de sedimento sin disturbar y por duplicado utilizando tubos plásticos de PVC tipo *corer* (35 mm d.i y 120 mm de longitud), los cuales fueron introducidos en el sedimento hasta una profundidad de aproximadamente 5 cm, de forma tal que las paredes del tubo de plástico queden perpendiculares a la superficie del sedimento. Luego se tapó la parte superior de los mismos (con la mano o tapas de plástico), y con el vacío producido se los extrajo (USEPA, 2001; Zaixso, 2002; Simpson et al., 2005).

De la misma forma, para la determinación de **clorofila a (C_{la}), feopigmentos (Feop) y carotenoides (Carot)**, las muestras de sedimento fueron tomadas por triplicado usando mini *corers* (11 mm d.i y 40 mm de longitud) y mantenidas en oscuridad en sobres de papel aluminio.

En base a la información existente sobre la composición de las matas microbianas y las condiciones físicoquímicas en los primeros milímetros de sedimento (0-10 mm) del área de estudio, se decidió separar el sedimento *in situ* en dos fracciones o capas: una capa superficial (0-5 mm) y otra subsuperficial (5-10 mm).

Todas las muestras fueron inmediatamente transportadas al laboratorio en heladera portátil.

2.2.2. Agua de mar superficial

Las muestras de agua de mar superficial para la determinación de nitritos, nitratos, fosfatos, silicatos, clorofila *a*, feopigmentos y materia orgánica particulada se recolectaron usando una botella tipo Van Dorn de 2.5 L (Margalef, 1980; APHA-AWWA-WEF, 1998) y se transportaron en un recipiente plástico previamente acondicionado, en heladera portátil con gel frío hasta el laboratorio.

2.2.3. Agua intersticial

El agua intersticial se extrajo mediante un nuevo procedimiento denominado **squeezing**, que consiste en introducir en el sedimento un tubo tipo *corer* de PVC (d.i. 3.5 cm y longitud 15 cm) con poros de 500 μm (Martin et al., 2003), a la profundidad a la que se pretende muestrear, acoplado a una bomba de vacío manual (Adams, 1994; Simpson et al., 2005; Di Bonito, 2005; Di Bonito et al., 2008). A través del vacío producido por la bomba, el agua intersticial escurre por las paredes del *corer* y se deposita en el fondo del tubo. La muestra de agua intersticial así obtenida, se colocó inmediatamente en botellas plásticas previamente acondicionadas para su uso. Así, se transportaron hasta el laboratorio siendo refrigeradas en una heladera portátil con gel frío.

2.3. Procesamiento y preservación de las muestras

Una vez en el laboratorio cada muestra fue tratada adecuadamente de acuerdo a su tipo de conservación.

2.3.1. Sedimento

Las muestras de sedimento para la determinación de **humedad, materia orgánica y granulometría** fueron preservadas en heladera a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro del mismo *corer* con el cual se tomó la muestra hasta su posterior análisis (Zaixso, 2002; Simpson et al., 2005).

Para la determinación de **pigmentos** las diferentes fracciones de sedimento fueron conservadas en sobres de papel aluminio a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis (Wurl, 2009).

Para evaluar el contenido de **CH** las muestras de sedimento previamente fraccionadas y colocadas en cajas de Petri individuales, fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante no más de

dos semanas (Wurl, 2009). En otras ocasiones las muestras fueron liofilizadas y almacenadas en recipientes plásticos al abrigo de la luz y la humedad.

Las muestras de sedimento para la determinación de la **composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$; y la concentración de carbono y nitrógeno orgánico elemental**, fueron previamente fraccionadas y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de su análisis, las muestras fueron liofilizadas y almacenadas en recipientes plásticos en un desecador.

2.3.2 Agua de mar superficial e intersticial:

Las muestras de agua de mar para la determinación de nutrientes inorgánicos disueltos (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} y Silicatos) y materia orgánica particulada (MOP) se filtraron, a baja intensidad luminosa, a través de filtros de membrana de fibra de vidrio grado F (de 47 mm de diámetro y un tamaño de poro de $0.7\text{ }\mu\text{m}$) previamente muflados ($450 - 500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) a una presión de vacío controlada ($< 40\text{ mmHg}$). El volumen de muestra filtrado varió entre 250-400 mL dependiendo de la saturación del filtro.

Para la determinación de **NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y silicatos** las muestras se conservaron en botellas plásticas, previamente acondicionadas y enjuagadas con la misma muestra a -20°C hasta el momento de su análisis (Grasshoff, 1976; McDonald y McLaughlin, 1982; APHA, 1998 – SM 1060B, 1060C). Las mismas se pueden conservar durante varios meses congeladas (en *freezer*) sin preservante.

Para la determinación de **NH_4^+** las muestras (13 mL) se conservaron en tubos de plástico tipo Falcon, previamente acondicionados, a los cuales se les agregó 35 μL de HgCl_2 como conservante (Grasshoff et al., 1983). Estos tubos se conservaron en heladera ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de su análisis que debió realizarse dentro de los 28 días.

Posteriormente, a los filtros utilizados en este caso, con el contenido del filtrado y para un volumen mínimo de muestra de 250 mL, se les agregaron 4 mL de sulfato de sodio (Na_2SO_4) 0,32 M, se les volvió a colocar la presión de vacío controlada ($< 40\text{ mmHg}$) para extraer el líquido restante y luego se los plegó, se los colocó cuidadosamente en los mismos sobres de papel aluminio en los que fueron muflados y se guardaron en la heladera ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de la determinación analítica de MOP (Strickland y Parsons, 1968).

Para la determinación de **Cla y Feop**, se utilizaron filtros de membrana de fibra de vidrio grado F (de 47 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0.7 μm). Las muestras (volumen mínimo de 250 mL) se filtraron a baja intensidad luminosa y a una presión de vacío controlada (< 40 mmHg). Los filtros utilizados en este caso, fueron plegados, conservados en la oscuridad en sobres de papel aluminio y refrigerados en heladera hasta su análisis (APHA, 1998 – SM 10200 H).

El **agua intersticial** se filtró a través de filtros de membrana de fibra de vidrio grado F (47 mm de diámetro y 0.7 μm), y se procedió de la misma manera que en el caso del agua de mar (Grasshoff, 1976; APHA, 1998 - SM 1060B, 1060C).

Para ambos tipos de muestra la filtración se realizó en el laboratorio, inmediatamente después de la toma de muestra con el fin de minimizar los procesos de óxido-reducción que puedan variar la concentración de los analitos (sobre todo si no se trabaja bajo atmósfera de N_2).

2.4. Metodología Analítica:

2.4.1. Contenido de humedad, materia orgánica y granulometría del sedimento

El **contenido de humedad (%H)** fue calculado por diferencia de peso antes y después de secar las muestras a 105 ± 5 °C hasta peso constante (entre 12-24hs) (Christie et al. 2000).

El **contenido de materia orgánica (%MO)** fue calculado por pérdida de peso por ignición (LOI) calcinando las muestras previamente secas a 450 ± 50 °C durante una hora en un horno mufla (Dean, 1974; Buhl-Mortensen, 1996).

La **granulometría** del sedimento fue determinada por dispersión de luz láser empleando un analizador de partículas Malvern-Mastersizer-2000 (Laboratorio de Geología – IADO) para partículas cuyo tamaño varía entre 0,2-2000 μm , es decir desde coloides hasta arena. Antes del análisis las muestras fueron previamente tratadas con peróxido de hidrógeno para eliminar la materia orgánica presente.

2.4.2. Clorofila a, feopigmentos y carotenoides en sedimento

El contenido de pigmentos fotosintéticos fue analizado empleando el método de Strickland y Parsons (1968). Las muestras de sedimento húmedo fueron extraídas con acetona 90%, disgregadas con ayuda de un vortex y refrigeradas en oscuridad a -4 °C durante 24hs. Luego del período de extracción las muestras fueron sumergidas en baño ultrasónico durante 2 mín y centrifugadas durante 5 mín a 2000 rpm. Finalmente se filtró el sobrenadante para disminuir su turbidez. Para la determinación de feopigmentos las muestras fue acidificada con HCl 0,1 N.

La concentración de **Cla y Feop** fue obtenida por espectrofotometría (Jenway 6715 UV-V) utilizando las ecuaciones de Lorenzen (1967), mientras que para determinar el contenido de **Carot** se empleó la ecuación de Strickland y Parsons (1972). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ de sedimento seco.

$$\text{Cla } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{26,7 \cdot [(A_{665a} - A_{750a}) - (A_{665d} - A_{750d})] \cdot V_{\text{extracto}}}{m_{\text{sedimento}} \cdot b}$$

$$\text{Feop } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{26,7 \cdot [1,7 \cdot (A_{665d} - A_{750d}) - (A_{665a} - A_{750a})] \cdot V_{\text{extracto}}}{m_{\text{sedimento}} \cdot b}$$

$$\text{Carot } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{4,0 (A_{468} - A_{750a}) \cdot V_{\text{extracto}}}{m_{\text{sedimento}} \cdot b}$$

Dónde:

V_{extracto} : volumen de Acetona 90% usado para la extracción, ml

$m_{\text{sedimento}}$: masa de sedimento húmedo, g

b : paso óptico de la cubeta, cm

A_{665a} , A_{750a} , A_{665d} y A_{750d} Absorbancias antes (a) y después (d) de acidificar.

El factor 26,7 puede tener unidades: mg.cm.L^{-1} ó $\mu\text{g.cm.mL}^{-1}$.

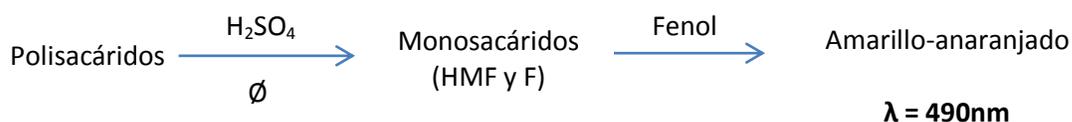
2.4.3 Extracción y determinación de carbohidratos extracelulares en sedimento

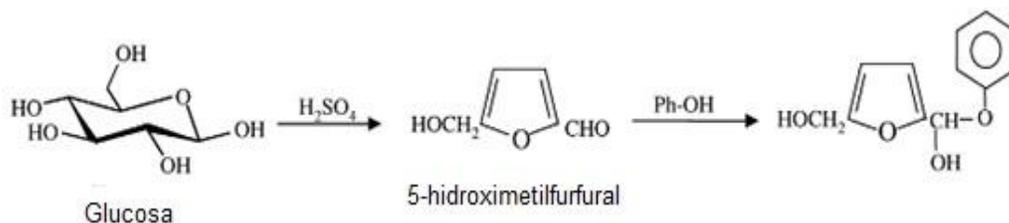
Los métodos de análisis de CH extracelulares involucran usualmente extracción, separación y cuantificación.

Para la extracción se pesó ~1 g de sedimento húmedo de cada fracción (ó ~0,5 g sedimento liofilizado), se homogeneizaron las muestras, se incubaron en agua destilada (1 ml) durante 1h a 30 °C y luego se centrifugaron durante 15 min. Los carbohidratos remanentes en el sobrenadante son denominados *Fracción Coloidal (FC)* (de Winder et al. 1999). A continuación, el sedimento remanente fue tratado con 1 mL de EDTA 100 mM durante 4 h a temperatura ambiente. Los carbohidratos presentes en el sobrenadante luego de centrifugar la muestra durante 15 min son denominados *Fracción Capsular (FCAP)* (de Winder et al. 1999).

La cuantificación de los carbohidratos presentes en las fracciones definidas operacionalmente (*FC* y *FCAP*) se llevó a cabo colorimétricamente, siguiendo el método descrito por Dubois et al. (1956). Este se basa en la hidrólisis y/o deshidratación de los polisacáridos que componen la muestra en presencia de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a alta temperatura, generando derivados del furfural (pentosas) o hidroximetilfurfural (hexosas). Luego por adición de fenol se produce una reacción de condensación generando compuestos de color amarillo-anaranjado que absorben en la región visible del espectro electromagnético. La intensidad del color producido a concentraciones constantes de fenol es proporcional a la cantidad de azúcares presentes en la muestra.

Reacción:





Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-visible, Jenway 6715, usando celdas de 1 cm de camino óptico, a una longitud de onda (λ) de 492 nm. Como estándar se empleó una solución de Glucosa de 11 mg L^{-1} y los resultados fueron expresados en μg equivalentes de glucosa ($\mu\text{g eqGlu}$) por g de sedimento seco. Las concentraciones de las curvas de calibrado variaron entre $0 - 100 \mu\text{g eqGlu ml}^{-1}$. Los límites de cuantificación (LC) del método fueron calculados como: $\bar{X}_{blanco} \pm 10 DS_{blanco}$, donde \bar{X}_{blanco} es el valor medio de la señal del blanco y DS_{blanco} es la desviación estándar del blanco. Los LC fueron similares para los extractos en agua y en EDTA:

Límite de cuantificación en Agua: $0,35 \mu\text{g eqGlu ml}^{-1}$

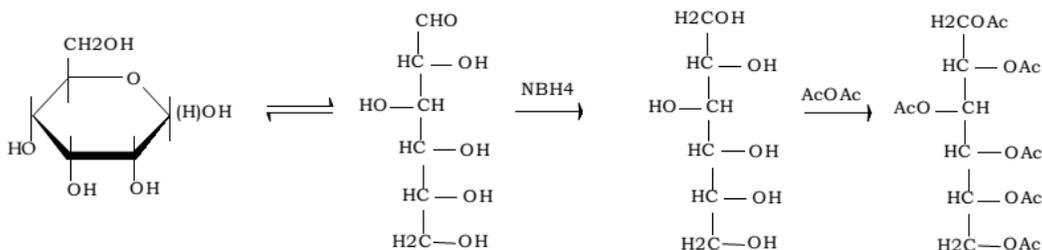
Límite de cuantificación en EDTA: $0,37 \mu\text{g eqGlu ml}^{-1}$

2.4.4 Determinación de la composición de monosacáridos neutros en las EPS

La composición de monosacáridos fue determinada por cromatografía gas-líquido (CGL) empleando el método de derivatización a acetatos de alditol. Este método se basa en la hidrólisis y conversión de los azúcares en compuestos volátiles. Los extractos liofilizados, de los carbohidratos extracelulares coloidales (solubles en agua), fueron rehidratados en agua destilada e hidrolizados con ácido trifluoroacético (TFA) 2M en viales de teflón a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. Luego se llevó a cabo la reducción con borohidruro de sodio (NaBH_4) y la acetilación con anhídrido acético (AcOAc). Finalmente, se realizó una extracción líquido-líquido con cloroformo (CCl_3) y los extractos fueron secados con NaSO_4 anhidro para su inyección en el cromatógrafo (Albersheim et al., 1967). La cromatografía CGL se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890^a equipado con una columna capilar ultra 2 (30 m x 0,32 mm d.i) y operando isocráticamente a $220 \text{ }^\circ\text{C}$. Cuando fue necesario, se llevaron a cabo análisis CGL-MS en un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC-17 equipado con una columna capilar SP-2330 y acoplado a un

espectrómetro de masas GCMSQP 5050 (Kyoto, Japón). El espectro de masas fue registrado en un rango de masas entre 30-500 Da.

Un esquema del tratamiento previamente descrito se muestra a continuación:



Finalmente el contenido de monosacáridos de la *FC* fue expresada en moles por ciento.

2.4.5 Determinación de la concentración isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$; y la composición de carbono y nitrógeno elemental

Las muestras de sedimento para la determinación de la concentración isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, y la composición de carbono y nitrógeno orgánico elemental fueron liofilizadas y pulverizadas empleando un mortero. Los polvos fueron pesados en cápsulas de estaño para la determinación de N elemental y $\delta^{15}\text{N}$. Para la determinación de C elemental y $\delta^{13}\text{C}$, los polvos fueron pesados en capsulas de plata y se les adicionó HCl 1M para remover el carbono inorgánico (Kennedy et al., 2005). Finalmente las muestras fueron analizadas por medio de espectrometría de masas de relaciones isotópicas (*Isotopic Ratio Mass Spectrometer*, IRMS).

Todos los datos isotópicos fueron expresados con la notación delta convencional (‰):

$$\delta = \left[\left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{referencia}}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

dónde: $R_{\text{muestra}} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ ó ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$, y $R_{\text{referencia}} =$ Pee Dee Belemnite (PDB) para $\delta^{13}\text{C}$ y N_2 atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$.

Este procedimiento estuvo a cargo de los integrantes del laboratorio de Ciencias Ambientales de la Universidad Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes (Río de Janeiro, Brasil).

2.4.6 Determinación de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar

La determinación de la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos se realizó en forma automática usando un analizador automático Autoanalyzer (AA) Technicon® II. Este equipo utiliza el método de Análisis en Flujo Segmentado (SFA) que, comparado con un método manual, presenta las siguientes ventajas: utiliza poca cantidad de muestra (5 mL) y bajo consumo de reactivos, mejora la reproducibilidad y el operador tiene un mínimo contacto con los materiales peligrosos. Este sistema está compuesto por un muestreador, una bomba peristáltica (que empuja los líquidos hacia el circuito analítico), un cartucho analítico (en donde se apoya el circuito analítico), un detector (fotocolorímetro) y un registrador (Fig. 2.1).

El analizador automático utilizado en este caso consta de cuatro canales para la determinación de nitrito, nitrato, fosfato y silicatos.

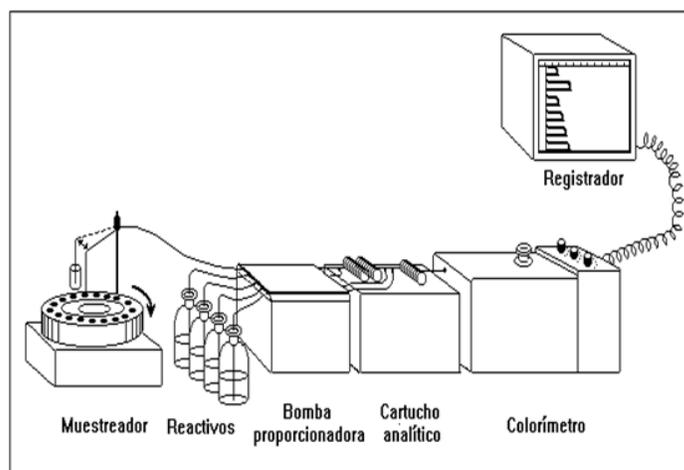


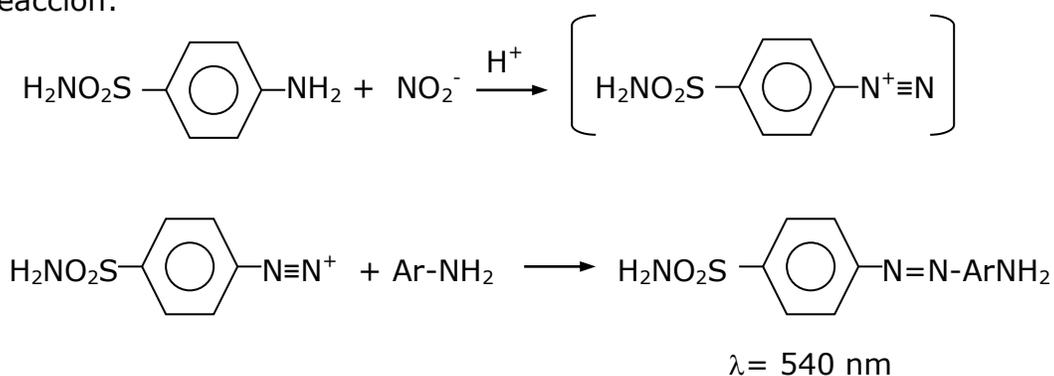
Fig. 2.1 Esquema del analizador automático utilizado para la determinación de nutrientes inorgánicos.

Nitrito (NO_2^-)

La determinación colorimétrica de la concentración de nitrito se realizó haciendo uso de una reacción de diazotación entre el nitrito y la sulfanilamida en medio ácido. El compuesto obtenido reacciona con la amina aromática, N-(1 naftil) etilendiamina, a través de una reacción de copulación para formar un compuesto azoico color rojo que presenta un máximo de absorción a 540 nm, según el método de Bendschneider y Robinson (1952). La automatización del método se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Grasshoff et al. (1983).

El límite de cuantificación del método es: 0,02 μM

Reacción:



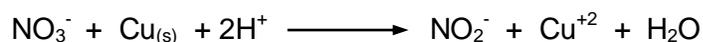
Ar-NH₂: N-(1 naftil) etilendiamina

Nitrato (NO_3^-)

Para determinar la concentración de nitrato se hizo pasar a la muestra por una columna de reducción compuesta de Cd metálico recubierta por Cu metálico, en donde el nitrato es reducido a nitrito con rendimientos estables y elevados (Treguer y Le Corre, 1975a). El nitrito allí formado se determina colorimétricamente según el método de Bendschneider y Robinson (1952) descrito anteriormente.

El límite de cuantificación del método es: 0,10 μM

Reacción:



Fosfatos (PO_4^{3-})

La determinación de la concentración de fosfato se realizó siguiendo método de Eberlein y Kattner (1987), basado en el método original de azul de molibdeno de Murphy y Riley (1962).

En este caso, los iones ortofosfatos reaccionan con el molibdato de amonio para formar un complejo color amarillo, el fosfomolibdato de amonio, que luego de la reducción da una coloración azul. Como agente reductor se utiliza ácido ascórbico pues se obtienen resultados reproducibles y brinda la ventaja de poder utilizar un único reactivo formado por: ácido sulfúrico (H_2SO_4), molibdato de amonio hidratado $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) y tartrato de antimonio y potasio $[\text{K}(\text{SbO})\text{-C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}]$. Al circuito analítico, además, se le agrega un agente de lavado que contiene 2,5 mL del “Aerosol 22” (Technicon GmbH, Bad Vilbel, FRG) en 1L de agua bidestilada.

La intensidad del color es medida a una longitud de onda (λ) de 885 nm.

El límite de cuantificación del método es: 0,01 μM .

Silicatos Disueltos (DSI)

El procedimiento automático para la determinación de silicatos solubles en agua de mar se basa en la reducción del silicomolibdato en solución ácida a “azul de molibdeno” por medio de ácido ascórbico (Technicon®, 1973). Se introduce ácido oxálico a la muestra antes del agregado del ácido ascórbico para eliminar la interferencia producida por los fosfatos.

La sensibilidad del método es de 50,00 μM

El límite de detección del método es: 1,00 μM

Amonio (NH_4^+)

La concentración de amonio se determinó en forma manual según el método de Koroleff (1969) descrito por Grasshoff (1976).

El amonio en medio moderadamente alcalino reacciona con el hipoclorito de sodio para dar cloroamina (NH_2Cl), la cual en presencia de fenol, nitroprusiato de sodio (catalizador) y un exceso de hipoclorito de sodio forma el complejo coloreado azul de indofenol.

La intensidad del color es medida a una longitud de onda (λ) de 630 nm.

El límite de cuantificación del método es: 0,01 μM .

2.4.7 Determinación de Materia Orgánica Particulada (MOP):

El contenido de Materia Orgánica en el material particulado en suspensión se determinó siguiendo el método descrito por Strickland y Parsons (1968), que consiste en una oxidación húmeda de la materia orgánica mediante dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido. El principio de este método es medir la disminución en la absorbancia del color amarillo del dicromato (Cr^{+6}) luego de su reducción (a Cr^{+3}) por la materia orgánica presente.

Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-visible, Jenway 6715, usando celdas de 1 cm de camino óptico, a una longitud de onda (λ) de 440 nm. El estándar usado fue glucosa.

Las determinaciones de MOP estuvieron a cargo de personal del Laboratorio de Química Marina del IADO.

2.4.8 Determinación de clorofila a y feopigmentos en agua de mar superficial:

El contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y Feopigmentos) se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico recomendado por APHA (1998) – SM 10200 H. Este método consiste en una extracción de los pigmentos con un solvente orgánico (acetona 90%) y el agregado de HCl 0,1 N para obtener la lectura de los feopigmentos. A los filtros conteniendo material particulado se los cubrió con 15-20 mL de acetona 90%, se los sometió a baño de ultrasonido durante 2mín y se los dejó extraer a - 4 °C y en oscuridad durante 20-24 hs. Luego se filtró la muestra a través de un filtro de membrana de fibra de vidrio grado C (1,2 μ m y 47 mm diám.), recolectando el filtrado en probetas de vidrio de 25,0 ml con tapón esmerilado. Se completó el volumen con sucesivos enjuagues con el mismo solvente.

Las lecturas de los extractos se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible Jenway 6715, utilizando celdas de 5 cm de camino óptico, a una longitud de onda (λ) de 750 y 665 nm.

2.5. Acondicionamiento del material

Todo el material necesario para la determinación de **nutrientes inorgánicos**, tanto el utilizado en la toma y el procesamiento de las muestras como el usado para realizar las determinaciones posteriores se acondicionó de la siguiente manera: se lo lavó con detergente no iónico al 1% (v/v), se lo enjuagó con agua de red, se lo dejó en HCl 10% (v/v) durante 24 h y finalmente se lo enjuagó 3 veces con agua destilada y se lo llevó a sequedad (Gardolinski et al., 2001; Monbet y McKelvie, 2007).

El material utilizado para la determinación de **materia orgánica particulada**, se lo lavó con detergente no iónico al 1%, se lo enjuagó con agua de red, se lo dejó en solución sulfocrómica durante varias horas, se lo enjuagó varias veces con agua destilada y se lo llevó a sequedad.

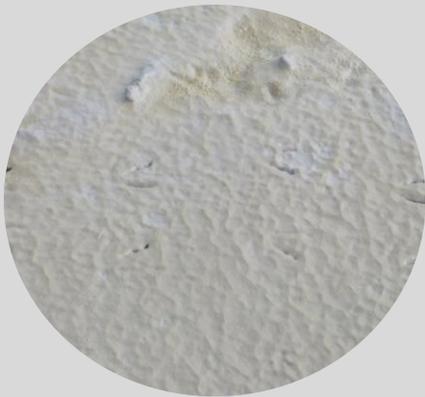
Filtros: Los filtros de membrana de fibra de vidrio utilizados para filtrar las muestras de agua de mar, para la determinación de los nutrientes y materia orgánica disuelta que luego se los empleó para la determinación de la materia orgánica particulada, fueron llevados a la mufla en sobres individuales de papel aluminio. Se sometieron a una temperatura de 450 – 500 °C durante 1 hora (Grasshoff, 1976).

El material utilizado para **clorofila y feopigmentos** se lavó con detergente no iónico al 1% (v/v), se lo enjuagó varias veces con agua de red, posteriormente con carbonato de magnesio ($MgCO_3$) al 1% para arrastrar los restos de ácido y por último con agua destilada. Luego, se dejó secar.

Para la determinación de **Carbohidratos** todo el material de polipropileno (plástico) se lavó con HCl al 10 % (V/V) durante aproximadamente 7 días y se lo enjuagó minuciosamente con agua ultra pura. Por otro lado, el material de vidrio utilizado para la reacción de color fue muflado a 450 ± 50 °C durante 4 horas cubriendo la boca de los tupos con papel aluminio y solo fueron destapados al momento de la determinación (Wurl, 2009).

Capítulo 3

Caracterización fisicoquímica de los sedimentos



Contenidos:

- pH
- Eh
- Temperatura
- Materia orgánica y humedad
- Composición granulométrica
- Frecuencia de Inundación

3.1. Introducción

Las matas microbianas fotosintéticas colonizan una amplia variedad de ambientes costeros pocos profundos como estuarios, playas arenosas, planicies de marea intermareales, marismas y lagunas hipersalinas (Hubas et al., 2011); y pueden estar constituidas tanto por organismos fotolitoautótrofos oxigénicos y anoxigénicos (ej: diatomeas, cianobacterias; bacterias sulforeductoras, bacterias púrpuras) como también por organismos quimilitoautótrofos (bacterias oxidantes de hierro, de sulfuros y bacterias nitrificadoras). La estructura de la comunidad microbiana a su vez está relacionada con parámetros *físicos* tales como: irradiancia, temperatura, presión, granulometría y densidad aparente, y *químicos* tales como: potencial redox (Eh), pH, salinidad, oxígeno, donores y aceptores de electrones disponibles, la presencia o ausencia de especies químicas específicas; y con la interacción entre las especies presentes.

Las matas microbianas son ecosistemas dinámicos y complejos que exhiben una elevada heterogeneidad espacial y temporal. El ambiente fisicoquímico se caracteriza por gradientes pronunciados y microambientes distintos que son generados y mantenidos por los mismos microorganismos (Bolhuis et al., 2014). Cada uno de estos microambientes soporta una diversidad de especies con una amplia gama de procesos metabólicos y funciones específicas que pueden dar lugar a reacciones acopladas y ciclos biogeoquímicos, generando productos finales tales como gases o precipitados minerales (Visscher y Stolz, 2005).

Las cianobacterias son características en diferentes tipos de matas microbianas debido a su gran flexibilidad y capacidad de adaptación a diferentes condiciones del ambiente. Se han encontrado matas microbianas en lugares donde las temperaturas son extremadamente bajas (~ -15 °C) como la región antártica, (Vincent et al., 1994; Vopel y Hawes 2006; Sumner et al., 2015) o en ambientes geotermales donde las temperaturas pueden alcanzar ~ 72 °C (Ward y Castenholz, 2002). También ha sido documentada la existencia de matas microbianas en ambientes templados, con temperaturas promedio intermedias ~ 20 °C (Esteve et al., 1992; Demergasso et al., 2003, Spetter et al., 2015a). A pesar de que se considera que las cianobacterias tienen una temperatura óptima de crecimiento de 20 °C, éstas pueden ser encontradas en distintos ambientes que van desde las regiones polares hasta los trópicos.

El efecto más importante de la temperatura es que determina la velocidad de diferentes reacciones metabólicas, como por ejemplo la fijación de N_2 . Las zonas costeras intermareales experimentan fuertes fluctuaciones en sus parámetros ambientales, incluyendo la temperatura. Las variaciones diarias y estacionales de la temperatura son comunes en ambientes templados y subtropicales, donde los organismos ocupan nichos de acuerdo a sus preferencias de temperatura y/o se adaptan a los regímenes del medio (Severin y Stal, 2010)

El pH del ambiente impacta en la composición de la comunidad microbiana ya que puede afectar la integridad de la pared celular y su capacidad para obtener determinados nutrientes (Frankz y Stolz, 2009). El pH de los sedimentos varía fuertemente entre condiciones de luz y oscuridad (Fig. 3.1). Al igual que en la columna de agua, los organismos bentónicos fotosintéticos producen material orgánico principalmente durante las horas del día, donde el pH puede alcanzar valores elevados (pH ~10) (Revsbech et al., 1983; Dupraz y Visscher, 2005, Borovec et al., 2010). Durante la noche las matas se vuelven completamente anóxicas siendo la fermentación el proceso metabólico principal. La formación de pequeñas cantidades de ácidos orgánicos durante este proceso puede disminuir el pH por debajo del valor neutro (pH~6) (Revsbech et al., 1983; Decho et al., 2010). El metabolismo microbiano puede alterar las características físicas y geoquímicas del ambiente por remoción de sustratos ácidos y/o producción de productos metabólicos alcalinos incrementando el pH y, si la plasticidad metabólica de la comunidad microbiana existente es inadecuada para prosperar con esos cambios, puede producirse una modificación en la composición de la comunidad. En las matas microbianas estos cambios responden a un ciclo diario; sin embargo, no se han documentado cambios diarios en la diversidad (Decho et al., 2010). El desarrollo de las matas microbianas ha sido documentado en ambientes donde prevalecen condiciones alcalinas como en las planicies de mareas supramareales del German Wadden (St. Peter-Ording) (Bühning et al., 2014) y en ambientes geotermales o cuevas sulfurosas con condiciones fuertemente ácidas donde el $pH \leq 4,5$ (Ward y Castenholz, 2002; Sarbu et al., 1994). El pH en las matas microbianas puede ser mayor o menor al pH en la columna de agua debido al consumo de CO_2 durante el proceso de fotosíntesis y a la liberación del mismo durante la respiración (Ward y Castenholz, 2002).

El potencial redox (Eh) provee información cualitativa de los procesos químicos que prevalecen en aguas naturales y sedimentos. El Eh regula gran parte de las reacciones

biogeoquímicas involucradas en el ambiente como la disponibilidad de metales y nutrientes (NO_3^- , NH_4^+ , silicatos, PO_4^{3-}) que pueden afectar la distribución y la actividad metabólica de los microorganismos que lo habitan. Las condiciones redox de los sedimentos están determinadas por el comportamiento y la actividad metabólica de los organismos bentónicos en respuesta a las concentraciones de materia orgánica y especies oxidadas presentes. Los organismos microbianos descomponen la materia orgánica, su fuente principal de energía, usando una serie de aceptores de electrones que son consumidos en una secuencia determinada por la energía libre de una reacción particular involucrada (Sundby, 1992; Teasdale et al., 1998). Inicialmente el oxígeno disuelto en el agua intersticial es el principal aceptor de electrones en estas reacciones a un potencial entre 400 y 700 mV. Una vez que el oxígeno se consume completamente, otras especies son empleadas como aceptores de electrones a diferentes potenciales siguiendo la serie que se muestra en la tabla 3.1:

Tabla 3.1: Adaptado de DeLaune y Reddy (2005)

Condición del sedimento	Condición redox	Aceptor de electrones	Metabolismo microbiano	Rango de Eh (mV)	
AEROBICA	Oxidado	O_2	Aerobio	+600	
				+500	
ANAEROBICA	Moderadamente reducido	NO_3^-	Facultativo	+400	
				Mn^{4+}	+300
					+200
	Reducido	Fe^{3+}	Facultativo	+100	
				SO_4^{-2}	0
					-100
Altamente Reducido		CO_2	Anaerobio	-200	
				-300	

El potencial redox de los sedimentos disminuye con el incremento de la profundidad, influenciando la distribución de una variedad de caminos metabólicos y respiratorios que involucran diferentes aceptores terminales de electrones (Fig. 3.1) (Hoehler, 2004). En base a esto podría esperarse un perfil vertical en la composición de los sedimentos, con una serie de capas o zonas donde el Eh disminuye progresivamente, desde la superficie a

las capas más profundas de sedimento, observándose respiración aeróbica, reducción de nitratos (denitrificación), reducción de manganeso, reducción de hierro, reducción de sulfatos y finalmente la metanogénesis (Hoehler, 2004). El espesor de las zonas puede ser variable, desde los pocos mm en zonas costeras ricas en materia orgánica hasta 10 cm en los sedimentos del mar profundo con muy bajo contenido de materia orgánica (Sundby, 1992). Sin embargo, este perfil puede ser modificado por la actividad de la macrofauna presente por bioturbación, bioirrigación y producción de *detritus*, lo que hace que estas regiones se encuentren verticalmente mezcladas formando un mosaico de microambientes biogeoquímicos (Aller, 1982). La estratificación del sedimento no es estricta y los procesos no necesariamente se excluyen unos a otros (De Beer y Stoodley, 2013). Así, por ejemplo en matas microbianas litificadoras y no litificadoras se ha observado que las bacterias sulfuroreductoras (BSR) toleran altos niveles oxígeno y pueden sobrevivir en la zona óxica (Baumgartner et al., 2006; Decho et al., 2010). La denitrificación es inhibida por la presencia de oxígeno; aun así, se han reportado excepciones (De Beer y Sweerts, 1989).

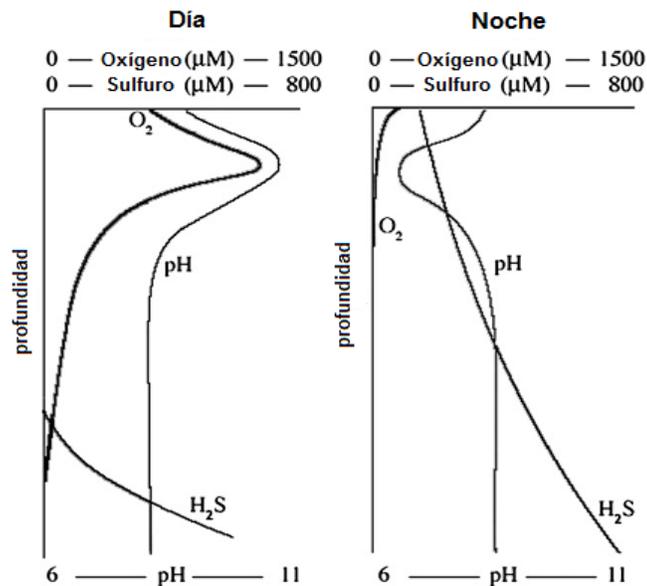


Fig. 3.1: Perfiles hipotéticos para la variación con la profundidad del sedimento en la concentración de Oxígeno, Sulfuro y pH durante el día y la noche (extraído de Franks y Stolz, 2009)

La materia orgánica (MO) formada a través de la producción primaria es la base de la cadena alimentaria microbiana. Esta MO comienza a estar disponible para otros microorganismos mediante una variedad de procesos (“*microbial loop*”) (Pomeroy et al.,

2007). En la oscuridad las cianobacterias y algas respiran su reserva de carbono endógeno y agotan el oxígeno de la mata. Estos organismos continúan degradando sus reservas de carbono bajo condiciones anóxicas por fermentación, resultando en la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes (Stal y Moezelaar, 1997). Estos productos de fermentación luego son oxidados por bacterias metanogénicas y BSR, a menudo en un modo sintrófico con otros microorganismos. Las BSR superan a las metanogénicas en matas microbianas marinas e hipersalinas debido a la alta concentración de sulfatos en el agua de mar pero son importantes en matas microbianas con baja concentración de sulfatos. Las BSR producen sulfuros, los cuales son oxidados a sulfatos por las bacterias oxidantes de sulfuros (BOS). Las bacterias quimioautotróficas incoloras oxidan los sulfuros aeróbicamente mientras que las bacterias fotoautotróficas anoxigénicas oxidan el sulfuro anaeróbicamente en la luz (van Gemerden, 1993). Éstas últimas, forman una capa color púrpura por debajo de las cianobacterias. Las bacterias de azufre incoloras no forman una capa definida y se distribuyen en toda la mata y, probablemente se aprovechan de las migraciones verticales de la capa oxigenada (Visscher et al., 1992). Las BSR tampoco forman una capa definida, por lo que diferentes especies pueden encontrarse a lo largo del gradiente vertical, dependiendo de la tolerancia al oxígeno (Canfield y DesMarais, 1991; Risatti et al., 1994).

El *grazing* (o pastoreo) ha sido poco estudiado en las matas microbianas. Si el pastoreo de la meio- y macrofauna estuvieran presentes destruirían la mata (Fenchel, 1998). Por lo tanto, se piensa generalmente que las matas microbianas sólo se desarrollan en ambientes que excluyen en gran parte el pastoreo de los organismos (es decir, ambientes extremos). Cuando el sedimento se encuentra periódicamente inundado, las matas microbianas costeras, pueden experimentar el pastoreo por parte de nematodos (Feazel et al., 2008), caracoles, e incluso peces. Se sabe que los organismos eucariontes, incluidos los metazoos, están presentes en este tipo de ambientes, pero su papel como herbívoros aún no ha sido observado (Bolhuis et al., 2013; Edgcomb et al., 2014).

3.2. Objetivos e hipótesis

Objetivos

- Evaluar y conocer los parámetros fisicoquímicos de los sedimentos que caracterizan la planicie de marea estudiada y su relación con la producción/degradación de la materia orgánica presente en los sedimentos.
- Identificar las condiciones de *stress* a las que está sometido el microfitobentos y sus posibles recursos de adaptación al ambiente.

Hipótesis

“Los sedimentos supramareales de los tres sitios seleccionados en la planicie de marea de Puerto Rosales poseen las mismas características fisicoquímicas debido a su proximidad”

“A pesar de la diferente granulometría que presentan los sitios de estudio seleccionados, las características fisicoquímicas de estos son las mismas”

3.3. Metodología y análisis de los datos

Durante el período Julio 2012 – Junio 2013 se llevaron a cabo muestreos, de manera mensual, alrededor del mediodía (12:00 – 16:00hs), durante la marea baja en los tres sitios de muestreo de la planicie de Puerto Rosales, descritos en el capítulo 1.

Se tomaron muestras de sedimento para la determinación del porcentaje de materia orgánica, porcentaje de humedad y composición granulométrica de los sedimentos, de acuerdo a las metodologías descritas en el capítulo 2 (sección 2.2.1 y 2.3.1). Los parámetros pH, Eh y temperatura fueron medidos *in situ* tal como se indicó en el capítulo 2 (sección 2.1).

Con el fin de analizar la diferencia espacial y estacional de los parámetros fisicoquímicos evaluados (Eh, pH y Temperatura) se aplicó un análisis de la varianza a dos vías (ANOVA doble) sin réplicas, seguido del test LSD de Fisher (*Least Significant Difference*). La variabilidad espacial (entre sitios y fracciones de sedimento) y estacional

(entre fechas) en el contenido de materia orgánica y humedad fue testeada siguiendo el diagrama de la figura 3.2. Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron evaluados gráficamente mediante el uso de Q-Q plots y diagramas de residuos vs predichos. Los datos fueron tratados estadísticamente con el programa InfoStat® (versión 2016), siguiendo Zar (1996).

Los datos presentados en las tablas y gráficos representan los valores medios y el error estándar (media \pm ES). El nivel de significación estadístico aceptable fue del 5%.

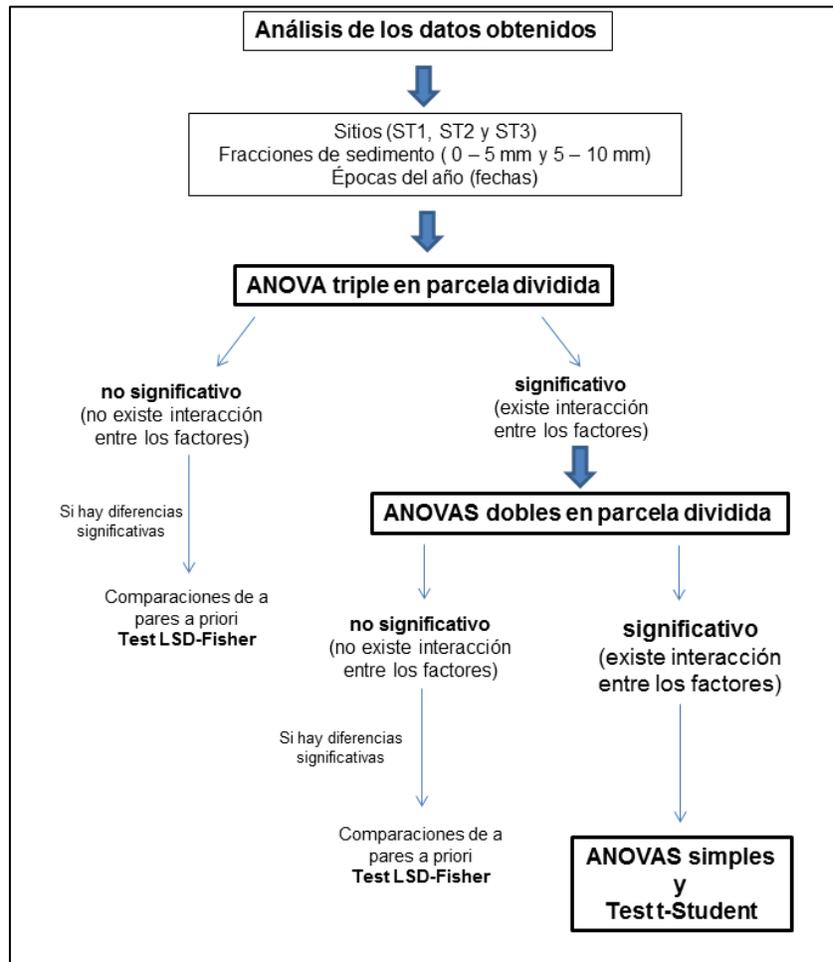


Fig. 3.2: Diagrama del análisis estadístico de los datos

3.4. Resultados

3.4.1. Temperatura, Eh, pH

Durante el periodo estudiado, la temperatura superficial de los sedimentos (0-5mm), para toda la planicie de marea varió entre 8,0 y 24,9 °C (tabla 3.II), con un valor promedio de $16,0 \pm 1,0$ °C. Se hallaron diferencias estacionales significativas ($p < 0,0001$), siendo los meses de Junio y Noviembre los que difieren del resto. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre sitios en el valor medio de temperatura ($p = 0,499$) durante el mismo periodo (tabla 3.III).

Los valores de pH en la superficie de los sedimentos (0 – 5mm) fueron similares en los tres sitios analizados (tabla 3.II). Considerando la planicie completa, el valor de pH promedio fue de $6,7 \pm 0,2$ y no se encontraron diferencias significativas entre los meses evaluados ($p = 0,186$) ni entre sitios de muestreo ($p = 0,693$) (tabla 3.III).

Los valores promedio de Eh de la capa superficial fueron positivos para los tres sitios (tabla 3.II). Sin embargo, se registraron valores negativos en los tres sitios durante Septiembre y Noviembre. En ST1 y ST2 los valores de Eh fueron mucho más variables que en ST3 y no presentaron un patrón definido. Este último sitio mostró valores bajos en otoño (-32 – 35 mV) y altos valores en invierno y primavera (300 – 389 mV). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre sitios ($p = 0,228$) y tampoco fueron observadas diferencias estacionales ($p = 0,140$) (tabla 3.III).

Tabla 3.II: Resumen de las características fisicoquímicas de los sedimentos de los tres sitios estudiados en la planicie de marea de Puerto Rosales, estuario de Bahía Blanca, Argentina (media \pm ES, n = 8).

Sitio	Localización	pH			Eh (mV)			Temperatura (°C)		
		Media \pm ES	mín	máx	Media \pm ES	mín	máx	Media \pm ES	mín	máx
1	38 ° 55'17 "S; 62 ° 03'42" O	6,8 \pm 0,4	5,5	8,5	86 \pm 38	-125	199	15,1 \pm 2,2	8,0	24,9
2	38 ° 55 '13' 'S; 62 ° 03' 54"O	6,5 \pm 0,5	5,6	7,3	120 \pm 36	-21	284	15,7 \pm 1,8	8,7	22
3	38° 55 '07 "S; 62° 03' 54 "O	6,8 \pm 0,2	6,3	7,8	183 \pm 57	-32	389	15,9 \pm 1,6	9,1	21,8

Tabla 3.III: Resumen de los resultados del análisis de varianza (ANOVA doble sin réplicas) en la capa superficial del sedimento (n = 24).

Variables	LSD	S	M	Abr	May	Jun	J	A	S	O	N
Temperatura	A	ST1									
	A	ST2	40,7**	DE	BC	A	B	B	C	D	E
	A	ST3									
pH	A	ST1									
	A	ST2	ns	A	AB	C	ABC	ABC	ABC	ABC	BC
	A	ST3									
Eh	A	ST1									
	A	ST2	ns	C	ABC	ABC	AB	ABC	A	BC	ABC
	A	ST3									

Factores: S, sitio; M, mes (Abr: Abril, May: Mayo, Jun: Junio, J: Julio, A: Agosto, S: Septiembre, O: Octubre y N: Noviembre). LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0.05; **P < 0.01. Letras iguales indican diferencias no significativas, estacionales o entre los sitios estudiados.

3.4.2. Materia orgánica, humedad y granulometría

El porcentaje de humedad varió entre 10,2 y 36,3% para el ST1, 14,0 y 38,5% para el ST2 y 19,0 y 40,7% para el ST3. El mayor contenido de humedad promedio fue registrado en el ST3 (tabla 3.IV). Los tres sitios difieren significativamente en la retención de humedad, donde los valores de %H indicaron el siguiente orden: ST3 > ST2 > ST1 (tabla 3.V, p = 0,0004). El %H promedio tendió a ser mayor en la capa de sedimento superficial (tabla 3.IV) y se hallaron diferencias estacionales significativas entre capas (p < 0,01). Esto fue observado durante la estación fría en ST1 (tabla 3.V, Fig. 3.3), el cual también presentó diferencias entre capas durante el mes de Enero donde %H fue mayor en la capa subsuperficial (5 – 10 mm) (Fig. 3.3). En ST2 el patrón de variación fue menos definido y mostró diferencias estacionales altamente significativas para los meses de Julio, Septiembre y Marzo (p= 0,0023, tabla 3.V, Fig. 3.3). Por el contrario, en ST3 la capa superficial y subsuperficial se comportan de misma manera para cada mes. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el %H entre las capas (p = 0,011; F = 9,07), como así también entre los meses estudiados, donde Julio, Agosto, Septiembre y Octubre difieren del resto (p < 0,0001, F = 53) (Fig. 3.3, tabla 3.V).

En general, el contenido de materia orgánica mostró la misma tendencia que el contenido de humedad, con valores menores en los sedimentos subsuperficiales durante la época fría y mayores durante la época cálida (Fig. 3.4). Para todo el período estudiado,

a diferencia del %H, los valores promedio de MO fueron mayores en la capa subsuperficial (tabla 3.IV). El contenido de materia orgánica mostró un patrón de variación estacional diferente para cada sitio (Fig. 3.4) y fue estadísticamente diferente entre los sitios de muestreo ($p < 0,0001$, tabla 3.V), siendo mayor en el ST3.

Durante la estación de primavera se registraron altos contenidos de MO en la capa superficial, alcanzando valores de $11,0 \pm 1,7\%$ (octubre), $17,9 \pm 0,9\%$ (noviembre) y $24,4 \pm 0,8\%$ (octubre) para ST1, ST2 y ST3 respectivamente. Se hallaron diferencias estacionales significativas ($p < 0,0001$), siendo los meses de enero (valor medio mínimo = $4,0 \pm 0,9\%$) y octubre (valor medio máximo = $12,9 \pm 0,9\%$) los que difieren del resto. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento ($p = 0,998$).

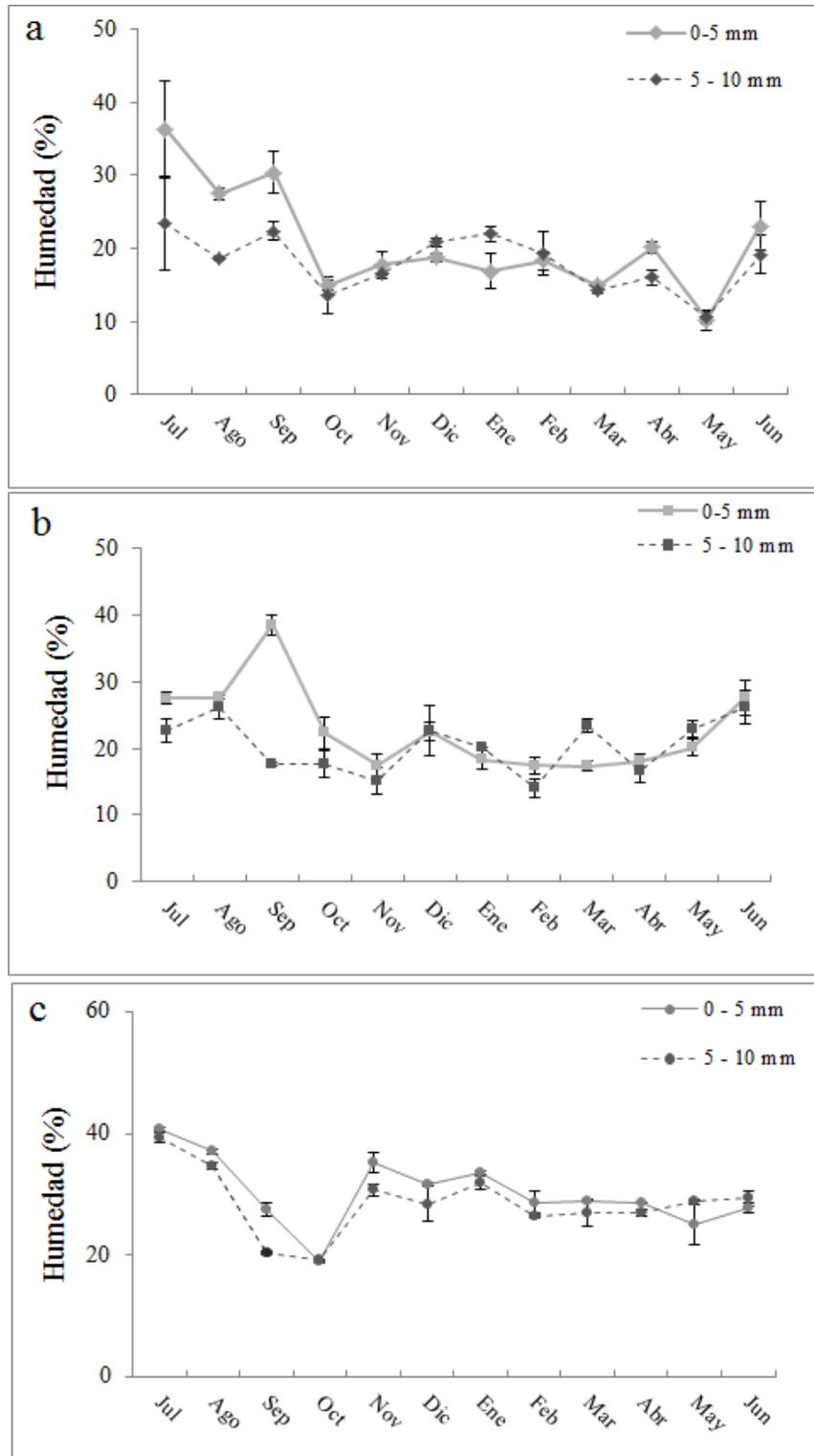


Fig. 3.3: Porcentaje de humedad de la capa superficial y subsuperficial para los tres sitios analizados, donde: a = ST1; b = ST2 y c = ST3.

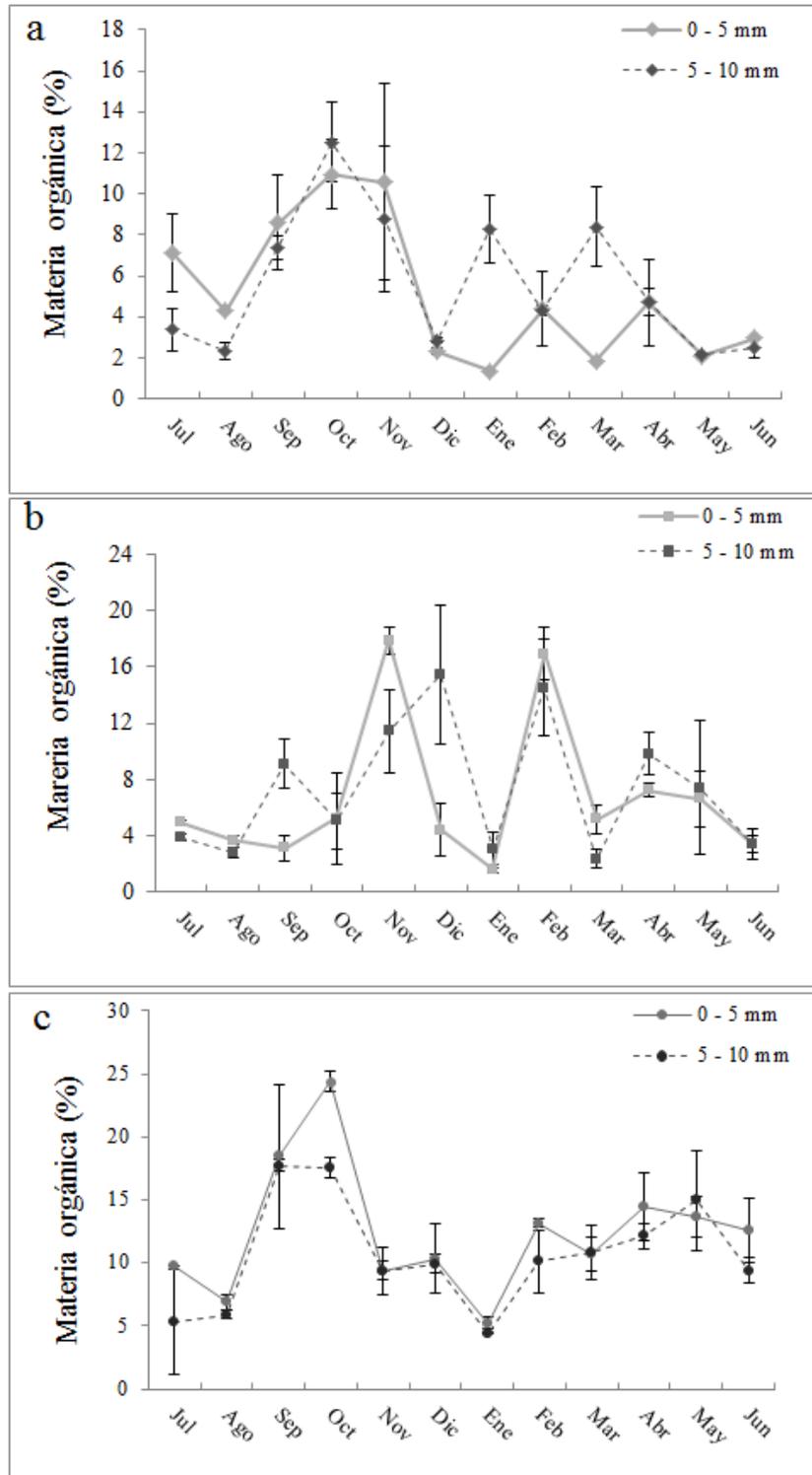


Fig. 3.4: Contenido de materia orgánica de la capa superficial y subsuperficial para los tres sitios analizados, donde: a = ST1; b = ST2 y c = ST3.

Tabla 3. IV Contenido de materia orgánica y humedad de los tres sitios de muestreo localizados en Puerto Rosales, estuario de Bahía Blanca (Argentina).

Sitio	Profundidad (mm)	Humedad (%)	Materia Orgánica (%)
		Media ± ES	Media ± ES
1	0 – 5	20,8 ± 2,1	5,1 ± 1,0
	5 – 10	18,1 ± 1,1	5,6 ± 1,0
2	0 – 5	22,9 ± 1,9	6,7 ± 1,5
	5 – 10	20,4 ± 1,2	7,3 ± 1,3
3	0 – 5	30,3 ± 1,7	12,4 ± 1,5
	5 – 10	28,6 ± 1,6	10,6 ± 1,3

Tabla 3.V Resumen de los resultados del análisis de la variancia (ANOVA triple) y test LSD.

Variables	MxFxS (F)	Sitio	LSD	M x F (F)	Diferencias mensuales significativas
					Superficial > Subsuperficial
%H	6.53**	ST1	A	21,1**	J > A > S
		ST2	B	14,8**	S > J
		ST3	C	ns	NMA
%MO	ns	ST1	A	-----	-----
		ST2	B	-----	-----
		ST3	C	-----	-----

Variables: humedad (%H) y materia orgánica (%MO)

Factores: F, fracción de sedimento; S, sitio; M, mes (J: Julio, A: Agosto, S: Septiembre, O: Octubre, Noviembre, D: Diciembre, E: Enero, Feb: Febrero, M: Marzo, Ab: Abril, May: Mayo, Jun: Junio.

NMA: Ninguno de los meses analizados.

Letras iguales indican diferencias no significativas entre sitios

LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

El análisis granulométrico de los sedimentos evidenció una composición unimodal de los sedimentos en el ST3, el cual fue vertical y espacialmente homogéneo presentando principalmente sedimentos finos (limos y arcillas) (tabla 3.VI, Fig. 3.5). En ST1 y ST2 los sedimentos superficiales y subsuperficiales mostraron una distribución de grano bimodal, sin embargo la capa superficial fue caracterizada por sedimentos finos mientras que la capa inferior fue caracterizada por sedimentos más arenosos (tabla 3.VI, Fig. 3.5).

Tabla 3.VI: Porcentaje de grano fino y arena en los sitios de estudio durante las estaciones de invierno y verano en el período estudiado.

Granulometría					
clasificación		Invierno		Verano	
Sitio	Capa (mm)	% Fino	% Arena	% Fino	% Arena
ST1	0 – 5	75,8	24,2	47,4	52,6
	5 - 10	54,5	45,5	15,3	84,7
ST2	0 – 5	77,0	23,0	46,6	53,4
	5 - 10	62,1	37,9	39,2	60,8
ST3	0 – 5	99,6	0,4	98,0	2,0
	5 - 10	98,1	1,9	97,4	2,6

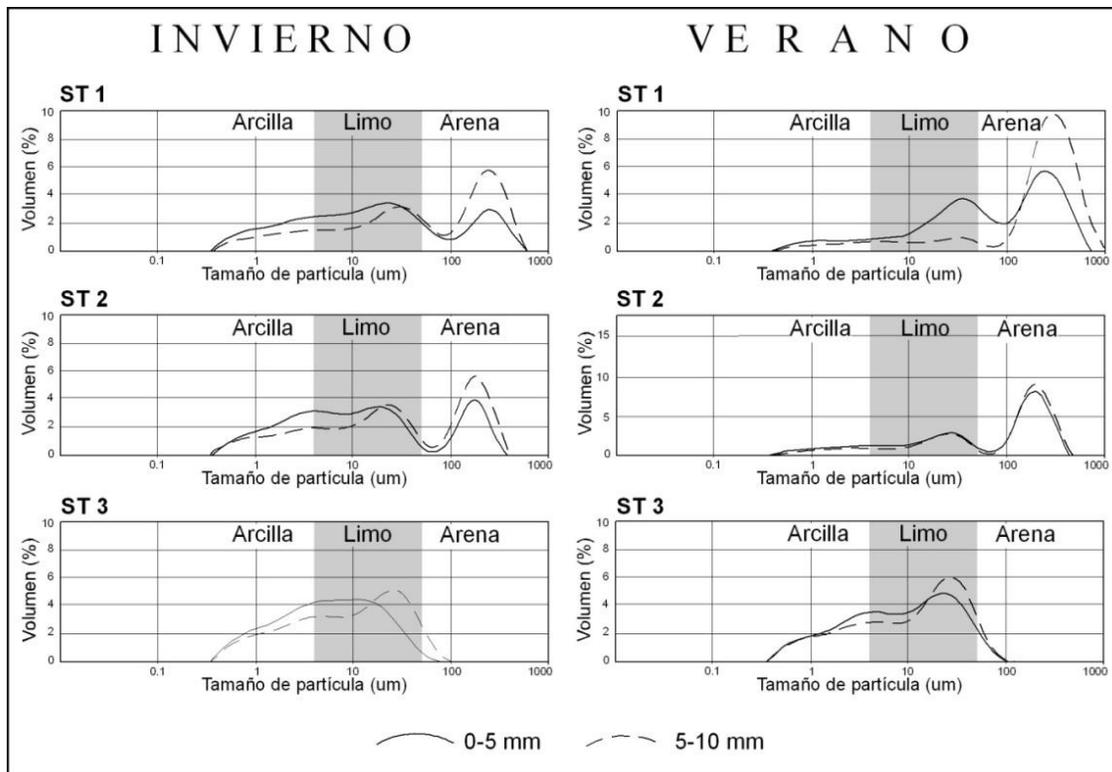


Fig. 3.5: Granulometría de los sedimentos para la capa superficial (0 – 5 mm) y subsuperficial (5 – 10 mm) de los sitios ST1, ST2 y ST3

3.4.3. Frecuencia de inundación de la planicie

En la figura 3.6 se muestran los días por mes que la zona supramareal alta de la planicie de marea de Puerto Rosales estuvo cubierta por agua de mar. El criterio utilizado para considerar un día sumergido fue cuando la altura de marea superó los 4,2 m, altura a la cual el ST3 se inunda. En base a esto, se observó que el ST3 mostró una menor frecuencia de inundación respecto a ST1 y ST2.

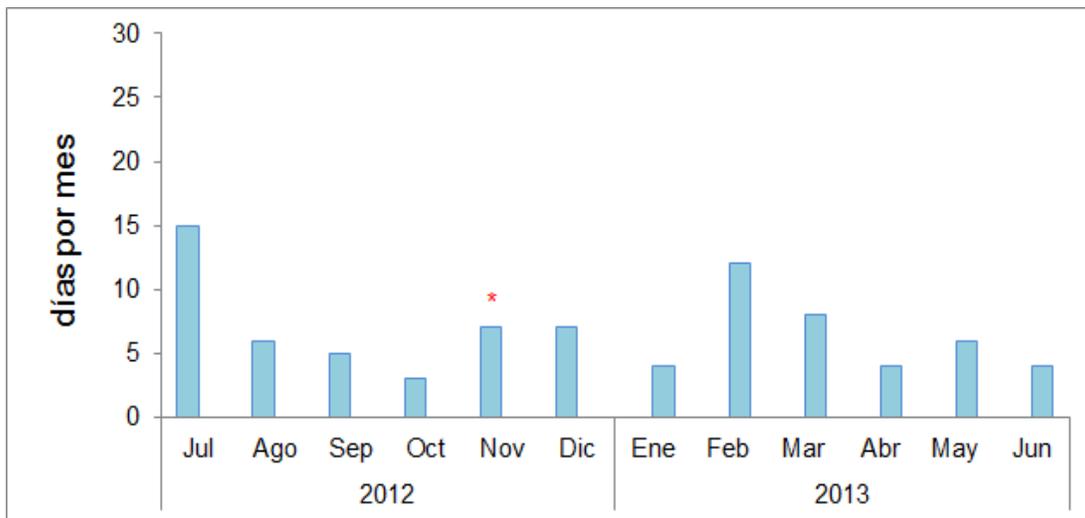


Fig. 3.6: Frecuencia diaria de inundación de la zona supramareal alta de la planicie de marea de Puerto Rosales, basada en los datos de la altura de marea semi-diurna obtenidos a partir del mareógrafo ubicado a 5 Km en la zona interna del estuario de Bahía Blanca desde la zona de estudio. Asterisco rojo: mes en el que la planicie fue inundada horas previas durante el mismo día de muestreo.

3.5. Discusión

3.5.1 Variables fisicoquímicas de los sedimentos

La ocurrencia y abundancia de las especies en las matas microbianas están fuertemente influenciadas por los diferentes parámetros fisicoquímicos a micro-escala (Franks and Stolz, 2009). La combinación de estos parámetros crea un ambiente único que sostiene a estas comunidades.

Los valores de pH reportados en este capítulo (pH: 5,5 – 8,5) no difieren entre los sitios estudiados y se encontraron próximos al valor neutral (~6,7). Valores similares han sido reportados por Spetter et al. (2015a) y Negrin et al. (2013) para esta misma área del estuario de Bahía Blanca. Por otro lado, los valores de pH registrados en este capítulo fueron coincidentes con los valores de pH reportados para otros sedimentos estuarinos (5-7) del mundo (Caçador et al., 2004; Reddy y DeLaune, 2008).

Si bien los rangos de Eh para cada sitio fueron diferentes, los potenciales en los tres casos corresponden a sedimentos reducidos (Cronk y Fennessy, 2001; Reddy y DeLaune, 2008). Como ya se mencionó anteriormente, el Eh de los sedimentos puede ser un buen indicador de la/s reacciones involucradas en la descomposición de la materia orgánica, que a su vez está relacionado con los aceptores de electrones disponibles. Los valores medios de Eh reportados para este capítulo sugieren que en los tres sitios la oxidación de la materia orgánica estaría siendo llevada a cabo por medio de la reducción del hierro (120 mV) (Cronk y Fennessy, 2001; Reddy y DeLaune, 2008), como ha sido reportado previamente para ésta área (Spetter et al., 2015a).

Las matas microbianas costeras bien desarrolladas generalmente presentan por debajo de la zona fótica, una capa de sedimento de color negro mate debido a la presencia de sulfuro de hierro sólido (FeS o pirita) y a que el Fe tiende a acumularse en los sedimentos (Herbert y Welsh, 1994; Stal, 1994). El potencial redox permite predecir la estabilidad de determinados minerales, así por ejemplo se ha observado que la hematita (Fe₂O₃) es estable bajo condiciones óxicas mientras que la pirita (FeS) está presente en ambientes reductores (Reddy y DeLaune, 2008). Estudios anteriores han mostrado la presencia de la cianobacteria *Microcoleus chthonoplastes* en el ambiente estudiado (Pizani, 2008; Pan et al., 2013a,b), la cual puede acumular Fe en los exopolisacáridos que recubren su vaina (Stal, 1994). Esto es consistente con los valores de Eh observados en este capítulo y con los estudios realizados por Cuadrado et al., (2011), quienes encontraron FeS en esta planicie.

En sistemas estuarinos costeros se ha observado que el potencial redox aumenta cuando la marea baja, debido probablemente a la acción de las olas que ayudan a oxigenar el agua intersticial, o bien debido a la difusión del O₂ atmosférico a través del sedimento (Teasdale et al., 1998). Así, los altos valores de Eh observados en el ST3 podrían deberse a su localización (área supramareal alta), donde la planicie de marea queda expuesta al aire durante varias horas del día y cuando se inunda el tiempo de duración es más corto; de esta forma los sedimentos de la planicie de marea permanecen

expuestos al aire por largos períodos de tiempo y el oxígeno puede penetrar fácilmente en los sedimentos.

La temperatura es otro factor fundamental que regula los procesos biogeoquímicos en sedimentos y suelos, influenciando el crecimiento, la actividad y la supervivencia de los microorganismos (Reddy y DeLaune, 2008). La temperatura de los sedimentos durante la realización de este estudio, siguió una marcada fluctuación estacional con bajos valores en invierno y valores más elevados en verano.

3.5.2 Materia Orgánica, contenido de humedad y granulometría

La cantidad y calidad de la materia orgánica en la superficie de los sedimentos es un factor importante que influye en la estructura y metabolismo del bentos (Graf et al., 1983; Mills, 1975).

Las planicies de marea juegan un rol muy importante en la producción y remineralización de la materia orgánica y su contenido está altamente asociado con la producción primaria y la respiración microbiana. Teniendo en cuenta que los sedimentos finos son ricos en materia orgánica, los elevados valores de MO registrados en el ST3 podrían estar asociados al menor tamaño de grano de los sedimentos y a la mayor productividad de las microalgas bentónicas (la cual se desarrolla en el capítulo siguiente). Por otro lado, la presencia de cangrejos cavadores *Neohelice granulata* podría influenciar el contenido de MO en ST1 y ST2. Estos organismos producen una intensa bioturbación, lo cual no solo afecta la estructura y geoquímica del sustrato, sino también genera grandes volúmenes de material disponible para ser redistribuido en la planicie, especialmente durante la época en la cual incrementa su actividad (verano-otoño) (Mendez Casariego et al., 2011). Además, las diferencias observadas entre sitios podrían, a su vez, ser atribuidas al hecho de que el ST3 estuvo inundado con menor frecuencia que los otros dos sitios (tal como se mencionó anteriormente) y habría una menor disolución de la materia orgánica soluble. Esto ha sido observado previamente en esta área por Spetter et al. (2015a). Los valores de MO registrados para los tres sitios son similares a los reportados por Herbert y Welsh (1994) en la Bahía Swanbister, Reino Unido (5 – 25 %) y Lovelock et al. (2010) en el estuario Golfo de Exmouth, Australia (24,3 ± 3,1 %) donde también se desarrollan matas microbianas. Además, el elevado contenido de MO registrado durante la primavera podría estar asociado al aporte de MO por parte de un “colchón” de *Spartina alterniflora* sobre la zona supramareal alta de la planicie de

marea, como producto de los fuertes vientos y sudestadas registradas durante el mes de Septiembre. El aporte de MO por parte de esta macrófita ha sido reportado por Negrin et al. (2011) en la marisma de Villa del Mar (zona media del estuario de Bahía Blanca). Sin embargo, los porcentajes de MO observados durante el periodo 2012-2013 fueron menores a los reportados por Pizani (2008) para la misma zona de estudio (~ 30%).

La retención de humedad en las diferentes capas del sedimento estuvo relacionada con el tamaño de grano. El ST3 mostró los mayores valores de humedad debido probablemente al mayor porcentaje de sedimentos finos. Las diferencias en el contenido de agua entre sitios, fueron detectadas a pesar de la menor frecuencia de inundación del ST3, tal como ya ha sido reportado anteriormente para esta área de estudio (Spetter et al., 2015a).

3.6. Conclusiones

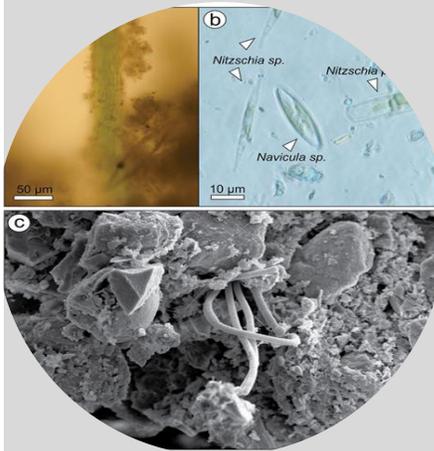
- ✓ El ST3 presentó un mayor contenido de materia orgánica en ambas fracciones de sedimento asociado al menor tamaño de grano de los sedimentos, a la menor frecuencia de inundación y a la mayor productividad de los microorganismos bentónicos presentes.
- ✓ El contenido de materia orgánica tendió a disminuir durante la época cálida probablemente debido a las mayores velocidades de evaporación/disección como producto de las temperaturas más elevadas. A diferencia del ST3, en ST1 se observó un marcado decaimiento de la materia orgánica lo cual podría deberse no sólo a las altas temperaturas sino también a la intensa actividad del cangrejo *Neohelice granulata* a partir del mes de Diciembre de 2012.
- ✓ La planicie de marea se comporta como un ambiente extremo con cambios importantes de temperatura a lo largo del año y la frecuencia de inundación a la que se ve sometida que provoca cambios en la salinidad. La planicie fue inundada con mayor periodicidad durante la época fría que durante los meses de la época cálida.

- ✓ A pesar de la proximidad que existe entre los sitios, se pudieron establecer claras diferencias entre los tres sitios evaluados, en base al porcentaje de humedad, al contenido de materia orgánica y tamaño de grano de los sedimentos.

- ✓ Al contrario de lo que se esperaba, el pH, el potencial redox y la temperatura de los sedimentos no marcaron diferencias entre los sitios. Los valores medidos indican que todos los sedimentos son reducidos, siendo probablemente el Fe (III) la especie aceptora de electrones.

Capítulo 4

Dinámica anual de clorofila *a* y carbohidratos extracelulares (EPS)



Contenidos:

- Clorofila *a*
- Feopigmentos
- Carotenoides
- Carbohidratos coloidales
- Carbohidratos capsulares
- Correlación Cla y CH
- Relación entre la concentración de pigmentos, carbohidratos y parámetros fisicoquímicos

4.1. Introducción

Existe una gran diversidad de matas microbianas y su composición depende de condiciones ambientales tales como la salinidad, la altura de marea y la duración de la exposición, la intensidad de la luz, el tamaño de grano de los sedimentos y el ingreso de materia orgánica. Además ellas son sensibles a algunos efectos de la acción antropogénica como la eutroficación o la liberación de medicamentos en el ambiente (Passarelli et al., 2015 y referencias allí citadas)

El MPB se desarrolla en la zona intermareal y supramareal de las planicies de marea y es considerado un importante productor primario. Además la comunidad que constituye el MPB presenta una distribución heterogénea tanto en tiempo como en espacio y se ha sugerido que la biomasa de los microorganismos es controlada por factores tales como la resuspensión, la disponibilidad de nutrientes y luz, el *grazing* y la desecación (Underwood y Kromkamp, 1999; Cartaxana et al., 2006)

El contenido de clorofila *a* es una medida de la biomasa del MPB en el sedimento al igual que lo es para el fitoplancton en la columna de agua y ha sido ampliamente utilizado (Farooq y Siddiqui, 2011). A su vez, la estimación de la biomasa microalgal bentónica es una medida del potencial fotosintético y es un precursor fundamental para evaluar los procesos manejados por la fotosíntesis bentónica. Tales procesos incluyen la producción de una mezcla de materia orgánica lábil y refractaria que es producida por fijación de CO₂ y puede ser liberada al sedimento por procesos de fermentación, foto-respiración, expulsados como solutos o por secreción de EPS (Stal, 2002).

Las EPS secretadas por estos organismos son sustancias mucilaginosas compuestas principalmente de carbohidratos y otros compuestos tales como proteínas, lípidos y poliliposacáridos (Stal, 2010; Underwood y Paterson, 2003). En base esto, la mayoría de los estudios de las EPS en sedimento han sido llevados a cabo en función del componente predominante de dicha matriz polimérica (Underwood et al., 1995).

Los métodos utilizados para analizar la producción de carbohidratos extracelulares en los sedimentos de las planicies de marea, se basan en la extracción de los analitos de la muestra. Sin embargo, no existe un método universal dado que diferentes autores han propuesto diferentes protocolos para la extracción de los carbohidratos tanto en medios de cultivos como en muestras de sedimento naturales (Underwood et al., 1995; de Winder et al., 1999; de Deckere et al., 2002; Stal y de Brouwer, 2003; de Brouwer et al., 2006;

Klock et al., 2007, Takahashi et al., 2009; Stal, 2010; Lembre et al., 2012; McKew et al., 2013 y referencias allí citadas).

La concentración de carbohidratos extracelulares se determinó en esta tesis de acuerdo al método descrito en el capítulo 2 (sección 2.4.3). Las dos fracciones obtenidas y analizadas fueron la fracción coloidal (*FC*) y la fracción capsular (*FCAP*), cuyas localizaciones en el sedimento se esquematizan en la figura 4.1:

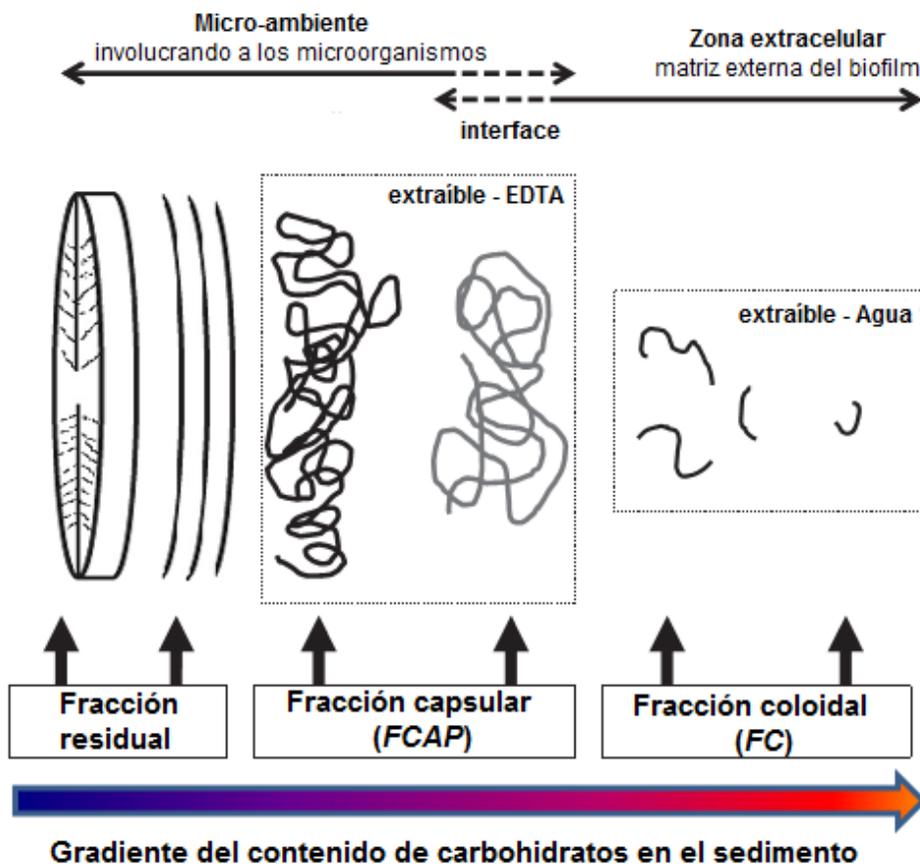


Fig. 4.1: Tipos de carbohidratos extracelulares y su localización en el sedimento, basado en el modelo conceptual de Underwood y Paterson (2003) para las EPS de diatomeas bentónicas (adaptado de Pierre et al., 2014). La fracción residual representa las EPS endógenas o intracelulares, la fracción capsular las EPS que rodean a la pared celular y la fracción coloidal representan las EPS excretadas libremente en el medio.

4.2. Objetivos e hipótesis

Objetivos

- Determinar la concentración de clorofila *a* y feopigmentos de los sedimentos para estimar la biomasa presente en la planicie de marea.
- Evaluar la distribución espacial y temporal del contenido de los carbohidratos extracelulares.
- Evaluar la relación entre la biomasa y la cantidad de carbohidratos extracelulares excretados.
- Examinar la relación o dependencia de Cla y carbohidratos con los parámetros fisicoquímicos de los sedimentos.

Hipótesis

“La concentración de carbohidratos extracelulares varía con las condiciones ambientales y depende de la biomasa presente en los sedimentos”

4.3. Metodología y análisis de los datos

Durante el período Julio 2012 – Junio 2013 se llevaron a cabo muestreos de manera mensual, alrededor del mediodía (12:00 – 16:00hs), durante la marea baja en los tres sitios de muestreo de la planicie de Puerto Rosales, descritos en el capítulo 1.

Se tomaron muestras de sedimento para la determinación de la concentración de clorofila *a*, feopigmentos, carotenoides y carbohidratos extracelulares de acuerdo a las metodologías descritas en el capítulo 2 (sección 2.2.1 y 2.3.1).

Para evaluar la variabilidad espacial y estacional en la concentración de clorofila *a*, feopigmentos, carotenoides y carbohidratos extracelulares se siguió el diagrama de la Fig. 3.2 presentado en el capítulo 3 (sección 3.3). Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron evaluados gráficamente mediante el uso de Q-Q plots y diagramas de residuos vs predichos. Debido a la falta de homocedasticidad y normalidad los valores de clorofila *a*, feopigmentos y carotenoides fueron transformados a $\ln(x+1)$, mientras que los valores de los carbohidratos extracelulares fueron transformados a $\log(x)$. Además, se llevaron a cabo análisis de correlación entre las variables presentadas en el capítulo 3 y la concentración de clorofila *a* y de carbohidratos extracelulares empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

Los datos fueron tratados estadísticamente con el programa InfoStat® (versión 2016), siguiendo a Zar (1996). Los datos presentados en las tablas y gráficos representan los

valores medios y el error estándar (media \pm ES). El nivel de significación estadístico aceptable fue del 5%.

4.4. Resultados

4.4.1. Distribución de clorofila *a*, feopigmentos y carotenoides

La concentración de Cla presentó un comportamiento diferente en cada sitio de muestreo y en cada capa de sedimento durante el periodo estudiado.

En el ST1, el contenido de Cla de la capa superficial del sedimento disminuyó desde la época invernal del 2012 a la estación verano del mismo año, volviendo a regenerarse durante el invierno 2013 (Fig. 4.2). Por el contrario, para el mismo sitio la concentración de Cla de la capa subsuperficial se mantuvo prácticamente constante y presentó un máximo durante el mes de enero ($4,1 \pm 1,4 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) (Fig. 4.2). En el ST2, la concentración de Cla superficial incrementó desde la estación de invierno hasta alcanzar su valor máximo en primavera ($20,4 \pm 2,2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) y tendió a disminuir hacia la estación de verano (Fig. 4.2). El ST3 presentó mayor concentración de Cla que el ST1 y ST2 (Fig. 4.2) y mostró un patrón de variación irregular, con valores medios que variaron entre $5,9 - 21,3 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ y $0,60 - 18,1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ para la capa superficial y subsuperficial respectivamente.

Para los tres sitios el contenido de Cla fue mayor en la capa superficial ($nd - 21,3 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) que en la capa subsuperficial ($nd - 18,1 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) del sedimento ($p < 0,0001$; $F = 86,5$). En cada sitio de estudio, se hallaron diferencias estacionales significativas en las concentraciones de Cla entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento ($p < 0,0001$) (Fig. 4.2; tabla 4.I). También se hallaron diferencias significativas entre sitios en la concentración de Cla de la capa superficial ($F = 38,5$; $p < 0,0001$); mientras que el ST3 difirió significativamente de ST1 y ST2 con respecto a la capa subsuperficial ($F = 38,9$; $p < 0,0001$).

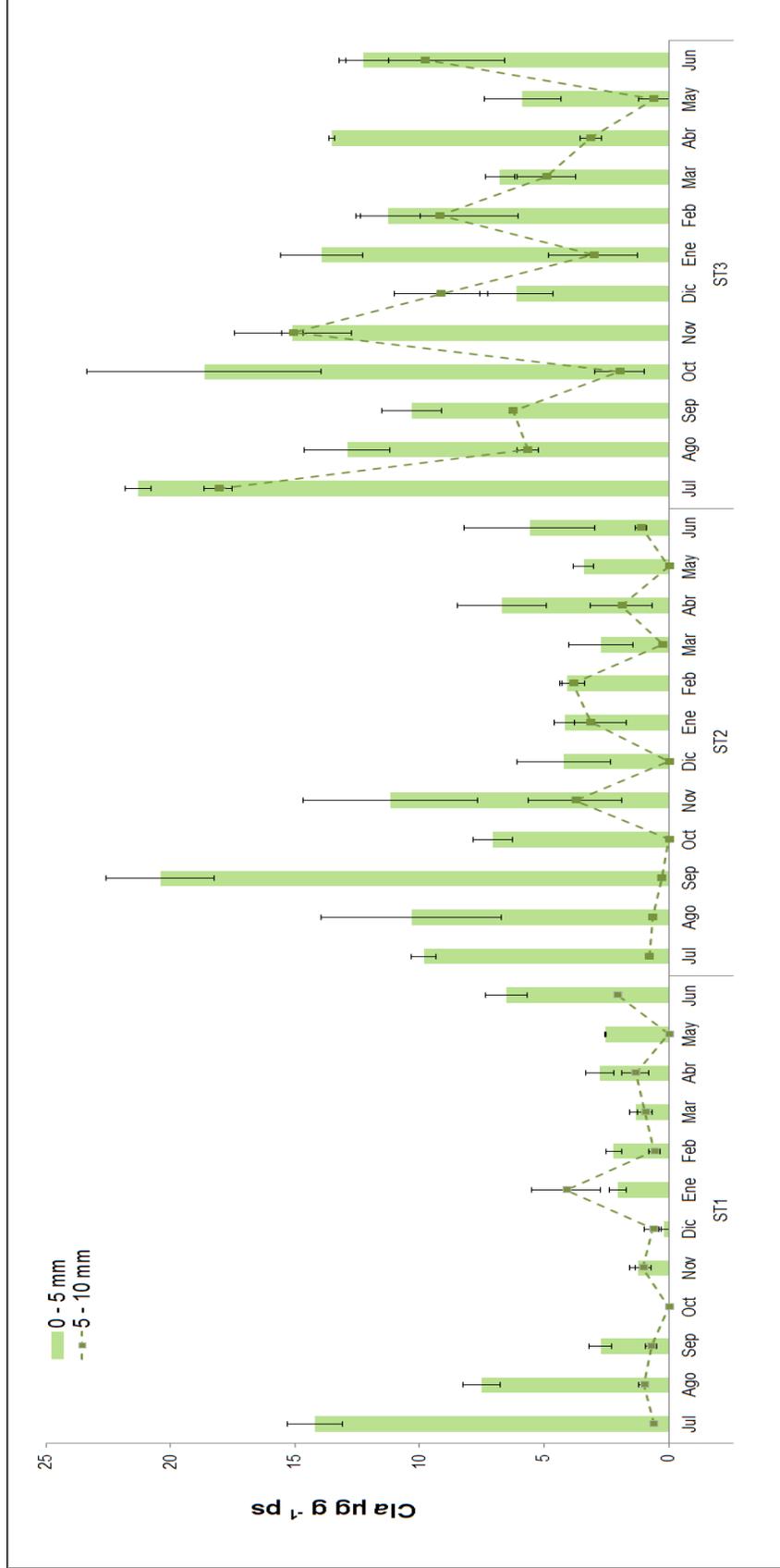


Fig. 4.2. Variación de la concentración de clorofila *a* en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2012-Junio 2013 (media \pm SE; $n=3$)

En la figura 4.3 se muestra la distribución mensual del contenido de Feop para los tres sitios de estudio seleccionados, la cual siguió una tendencia similar a la de Cla tanto en la capa superficial (0- 5 mm) como subsuperficial (5 – 10 mm) del sedimento.

Las concentraciones de Feop encontradas fueron mayores a las concentraciones de Cla en cada sitio con valores que variaron entre nd – 22, 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps, nd – 24, 7 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps, 4,6 – 26, 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps en la capa superficial y entre nd – 7,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps, nd – 19,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps, 3,4 – 29, 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps en la capa subsuperficial, para el ST1, ST2 y ST3 respectivamente.

En ST1 y ST2 se hallaron diferencias estacionales altamente significativas entre las capas consideradas para la concentración de Feop y se resumen en la tabla 4. I. Mientras que en ST3 no se hallaron diferencias significativas entre capas ($p > 0,05$), pero si entre los meses analizados, donde ambas capas de sedimento se diferencian del resto para los meses de octubre y abril ($p < 0,0001$).

Considerando todo el periodo estudiado, se observó que los sitios difieren significativamente en el contenido de Feop ($p < 0,0001$; $F = 522,1$) y se ordenaron de la siguiente manera: ST1 < ST2 < ST3. Además se hallaron diferencias altamente significativas entre capas ($p = 0,0007$; $F = 522,1$), siendo menor el contenido en la capa subsuperficial.

Se evaluó la relación entre concentración promedio de Cla y Feop (Cla/Feop) en la capa superficial (0 – 5 mm) para cada mes del año en ST1, ST2 y ST3. Los valores de Cla/Feop fueron menores a uno para casi todos los meses analizados, excepto para los meses de noviembre, enero y abril donde se registraron las menores concentraciones de feopigmentos (Fig. 4.4).

Tabla 4.I Resumen de los resultados del análisis de la variancia (ANOVA triple) y test LSD.

Variables	MxFxS (F)	Sitio	LSD	M x F (F)	Diferencias significativas mensuales Superficial > Subsuperficial
Cla	5,57**	ST1	----	51,9**	J > A > May > Jun > Feb
		ST2	----	195,1**	S > O > A = J > D > May > Abr > N > M > Jun
		ST3	----	45,9**	O > E = May > Abr > A
Feop	2,81 **	ST1	A	17,3**	A > D > J > Feb
		ST2	B	21,3**	Jun > S > A
		ST3	C	ns	-----
Carot	3,15 **	ST1	A	14,5**	J > A > Jun
		ST2	B	72,2**	A > S > J > N > Jun > O > D = Abr > M
		ST3	C	56,3**	May > E > A = Abr > O > Jun

Variables: clorofila a (Cla), feopigmentos (Feop) y carotenoides (Carot).

Factores: F, fracción de sedimento; S, sitio; M, mes (J: Julio, A: Agosto, S: Septiembre, O: Octubre,

N: Noviembre, D: Diciembre, E: Enero, Feb: Febrero, M: Marzo, Abr: Abril, May: Mayo, Jun: Junio).

Letras iguales indican diferencias ns entre sitios.

LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

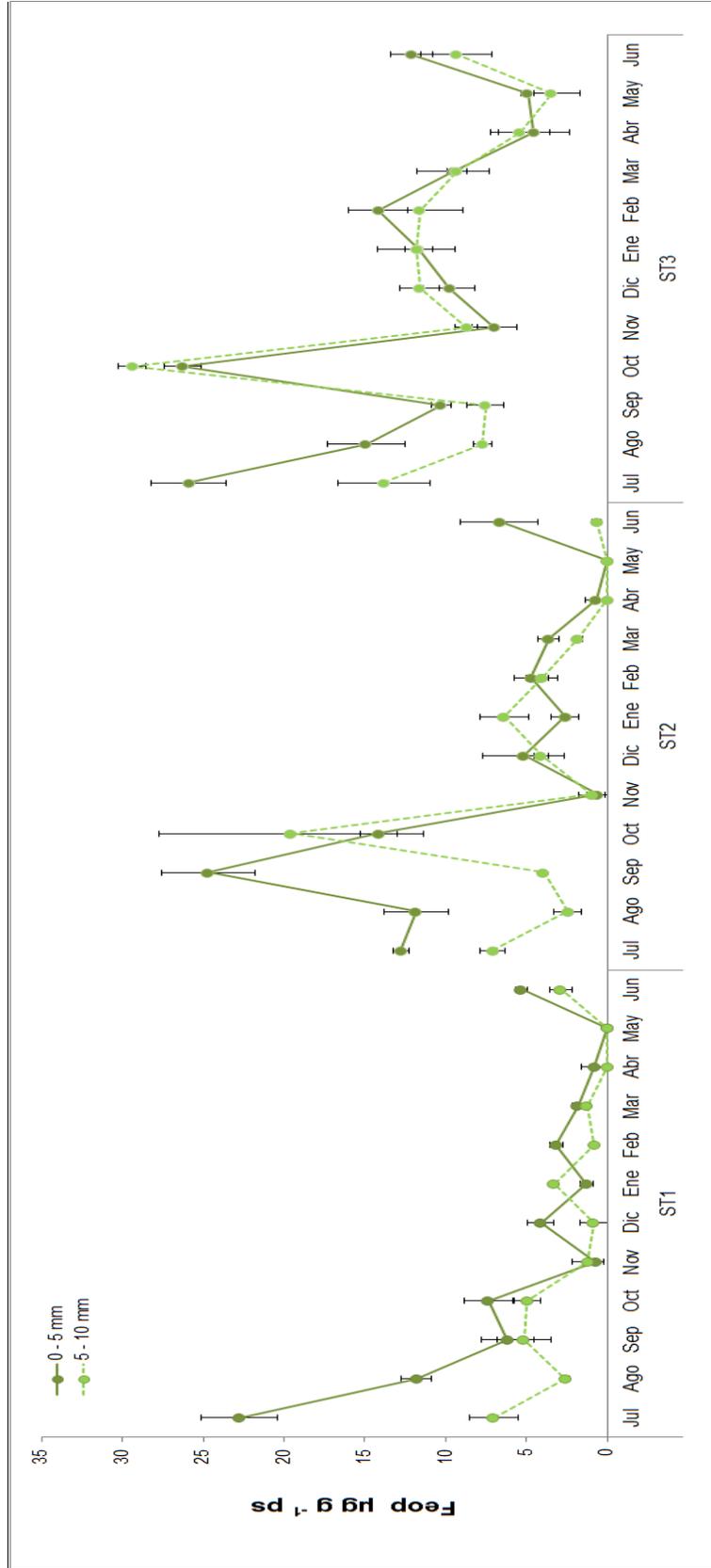


Fig. 4.3: Variación de la concentración de feopigmentos en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2012 - Junio 2013 (media \pm SE; n=3)

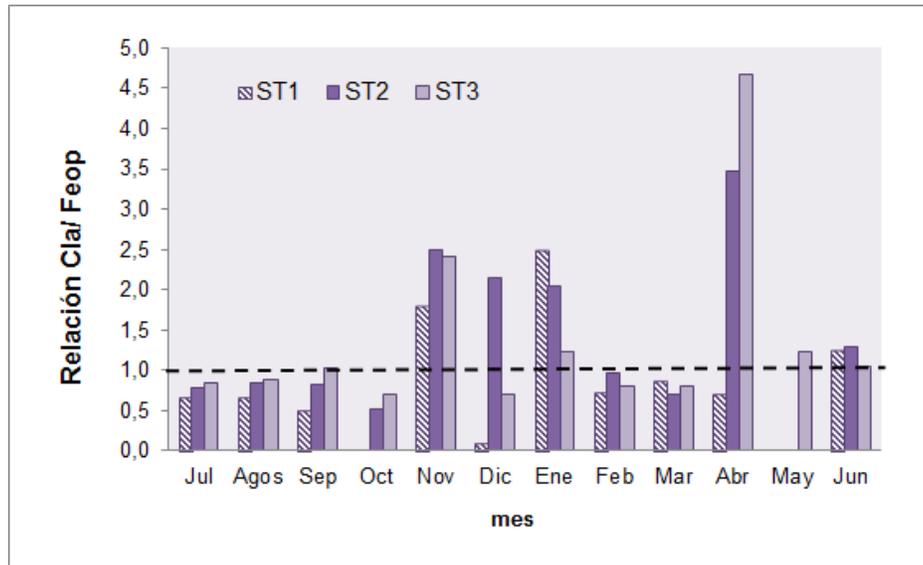


Fig. 4.4: Relación entre concentración de Cla y Feop (Cla/Feop) en la capa superficial (0 – 5 mm) para ST1, ST2 y ST3 durante el periodo Julio 2012 -

La concentración de Carot siguió la misma dinámica estacional que la concentración de Cla para los tres sitios de estudio (Fig. 4.5).

Del análisis de los resultados se observó la existencia de diferencias estacionales altamente significativas entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento, y diferencias altamente significativas entre sitios ($p < 0,0001$) (Fig. 4.5; tabla 4.I).

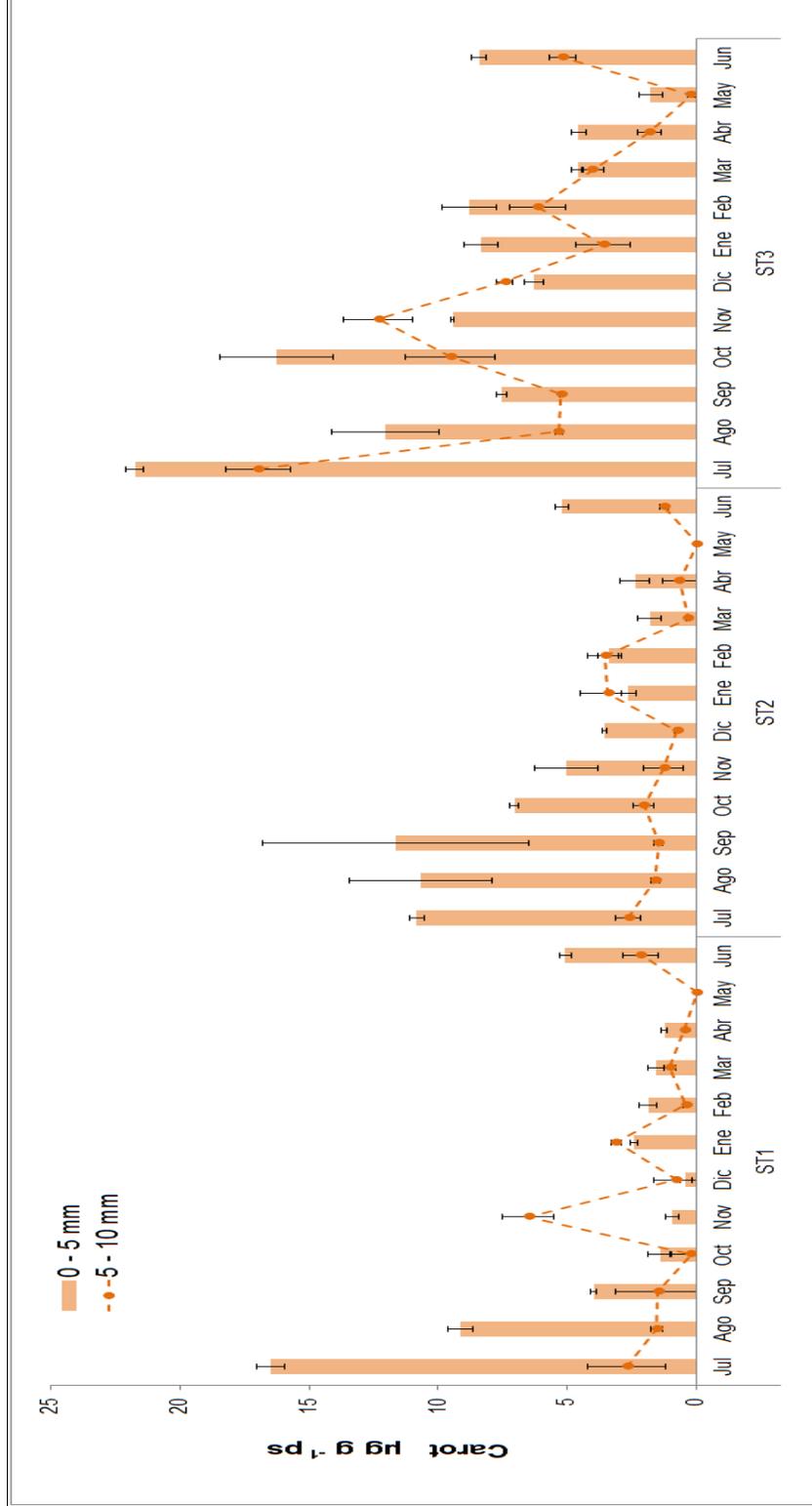


Fig. 4.5: Variación de la concentración de carotenoides en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2012-Junio 2013 (media \pm SE; n=3)

4.4.2. Distribución de carbohidratos coloidales (*FC*) y capsulares (*FCAP*)

La producción de carbohidratos en los sedimentos mostró una variación estacional diferente para cada sitio y para cada fracción de sedimento analizada (Fig. 4.6). Para el ST1 la concentración de *FC* y *FCAP* en la capa superficial, aumentó durante el invierno (Julio-Agosto) y disminuyó durante la primavera, manteniéndose prácticamente constante hasta el otoño donde comienza a aumentar levemente su concentración (Fig. 4.6 a y d). Un comportamiento similar se observó en el ST3 para la capa superficial, con elevadas concentraciones de carbohidratos durante el otoño-invierno y bajas en primavera-verano (Fig.4.6 b y e). A diferencia de estos dos sitios, el ST2 fue más irregular presentando un patrón menos claro (Fig. 4.6 c y f). Para cada sitio de estudio, se hallaron diferencias estacionales significativas en las concentraciones de *FC* y *FCAP* entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento ($p < 0,01$) (Fig. 4.6; tabla 4.II).

En la capa superficial la *FC* varió desde 14,0 a 459,4 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$, 19,3 a 546,8 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$ y 40,7 a 893,8 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$ para el ST1, ST2 and ST3, respectivamente. Por otro lado, la *FCAP* varió desde 40,4 a 335,7 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$, 12,7 a 269,2 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$ and 112,3 a 818,5 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}\text{ps}$ para ST1, ST2 y ST3, respectivamente. Contrariamente, en la capa subsuperficial el contenido de la *FC* y *FCAP* fue menor y se mantuvo prácticamente constante en todos los sitios (Fig. 4.6). Sin embargo, considerando todo el periodo estudiado se hallaron diferencias significativas en el contenido de *FC* y *FCAP* entre las capas de sedimento, siendo mayor en la capa superficial que en la subsuperficial ($p < 0,01$) (tabla 4.II; Fig. 4.6).

Los resultados mostraron que el ST3 difiere significativamente del ST2 y ST1 en el contenido de carbohidratos capsulares ($p = 0,0007$) (tabla 4.II), mientras que ST1, ST2 y ST3 difieren significativamente en el contenido de carbohidratos coloidales ($p = 0,0002$) (tabla 4.II). Para la capa superficial, los máximos valores de *FC* y *FCAP* fueron hallados en Agosto ($459,4 \pm 21,7 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$ y $335,7 \pm 1,3 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$) y Septiembre ($546,8 \pm 66,6 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$ and $269,2 \pm 62,7 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$) para el ST1 y ST2 respectivamente (Fig. 4.6). Sin embargo, en el ST3 ambas fracciones mostraron concentraciones máximas en Julio ($818,5 \pm 0,4 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$) para la *FCAP* y en agosto ($893,8 \pm 67,9 \mu\text{g eqGlu g}^{-1} \text{ps}$) para la *FC* (Fig. 4.6).

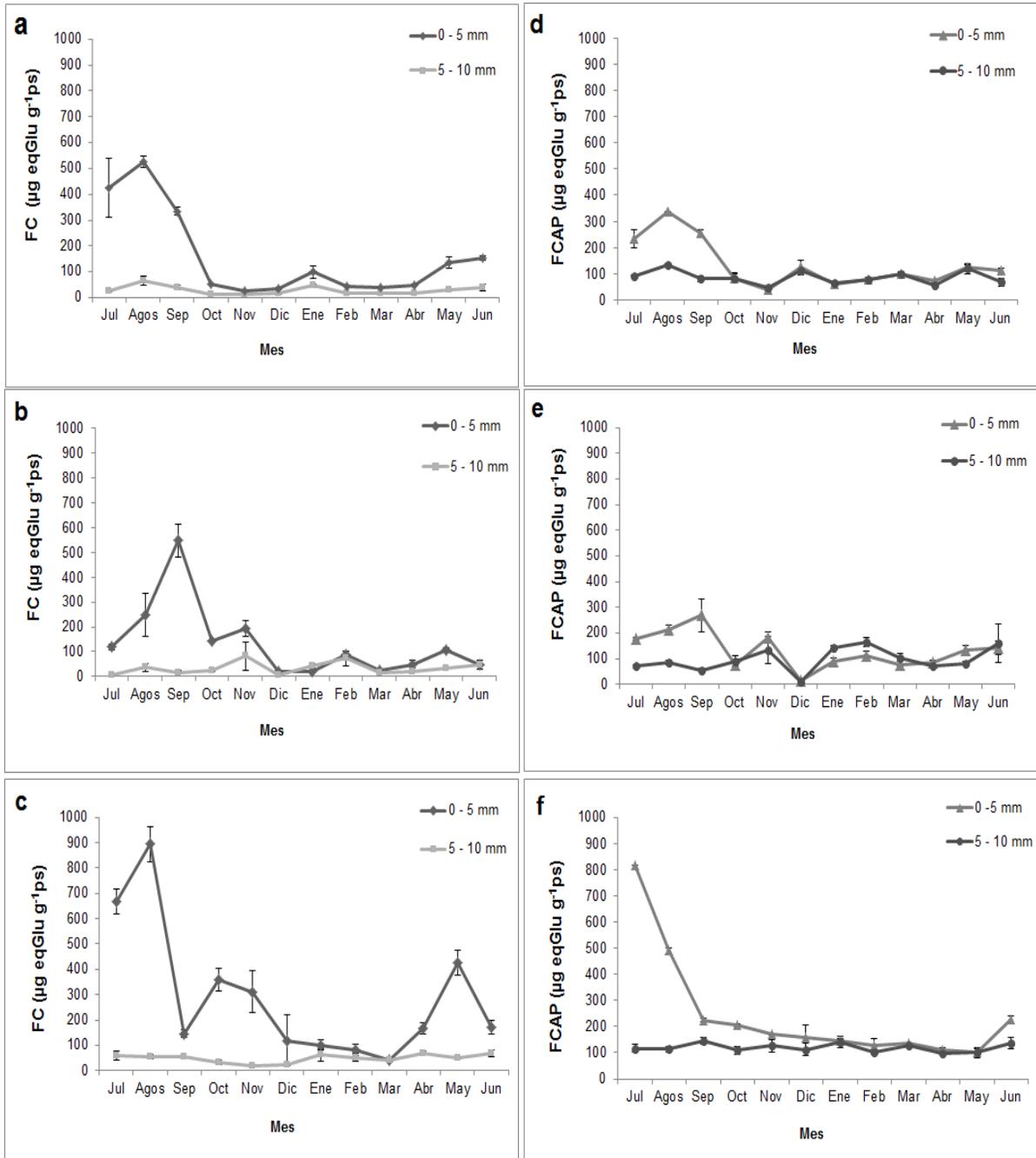


Fig. 4.6: Variación estacional de carbohidratos coloidales (FC) y capsulares (FCAP) en la capa superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) del sedimento para los tres sitios estudiados. ST1: a y d; ST2: b y e; ST3: c y f (media \pm SE; n=2)

Tabla 4.II Resumen de los resultados del análisis de la variancia (ANOVA triple) y test LSD.

Variables	MxFxS (F)	Sitio	LSD	M x F (F)	Diferencias significativas mensuales Superficial > Subsuperficial
FC	2,53**	ST1	A	121,9**	J > A = S > May > Jun > O
		ST2	B	71,9**	S > J > A > O > N = May
		ST3	C	144,6**	A > N > J = O > May > S = D = Jun
FCAP	3,70 **	ST1	A	80, 1**	S > A = J > Jun > Abr
		ST2	A	15,6**	S > A = J
		ST3	B	350,9**	J > A > O > Jun > S > N = D > F

Variables: carbohidratos coloidales (FC), carbohidratos capsulares (FCAP).

Factores: F, fracción; S, sitio; M, mes (J: Julio, A: Agosto, S: Septiembre, O: Octubre, N: Noviembre, D: Diciembre, E: Enero, Feb: Febrero, M: Marzo, Abr: Abril, May: Mayo, Jun: Junio).

NMA: Ninguno de los meses analizados.

LDS al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

Las letras iguales indican diferencias no significativas entre sitios

Los carbohidratos extracelulares totales fueron calculados como la suma de la FC y FCAP. La contribución de estas dos fracciones se muestra en la Fig. 4.7. La FCAP fue predominante en la capa subsuperficial de los sedimentos (74%), mientras que en la capa superficial la FC y FCAP representaron el 43% y 57% del total de carbohidratos en la planicie de marea a lo largo de todo el período estudiado. Se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de FC y FCAP entre las capas de sedimento ($p < 0,0001$). El % FC fue mayor en la capa superficial, mientras que el % FCAP fue mayor en la capa subsuperficial. Además, se encontraron diferencias significativas entre sitios en el % FC y % FCAP ($p < 0,05$) siguiendo para ambas fracciones el siguiente orden: ST1 < ST2 < ST3.

Cuando se graficó FCAP vs FC, considerando todo el periodo estudiado y ambas capas de sedimento (0 – 5 mm y 5 – 10 mm), los sitios aparecieron agrupados dentro de la planicie de marea (Fig. 4.8).

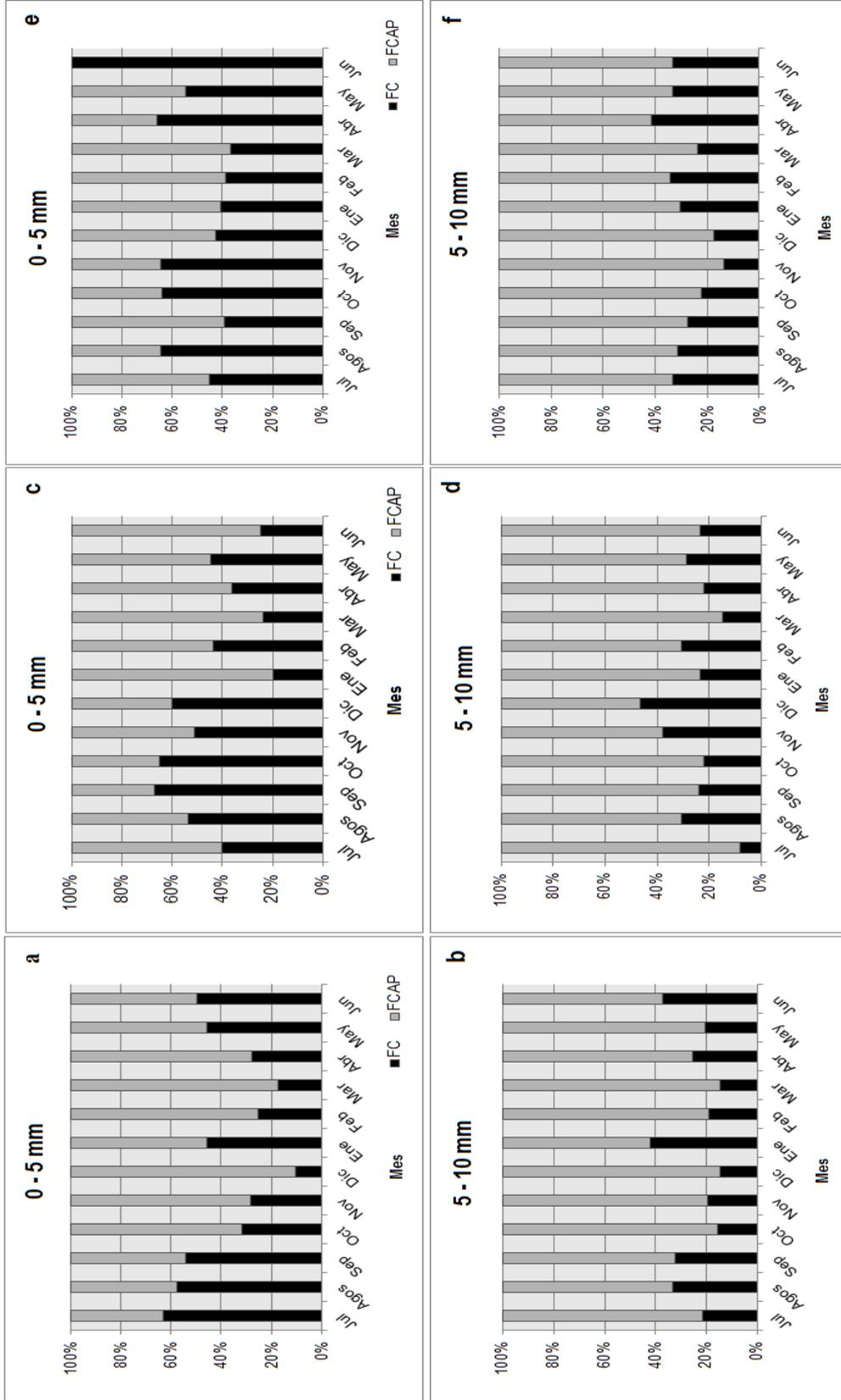


Fig. 4.7: Contribución de las fracciones extraídas secuencialmente al total de carbohidratos estimados en la planicie de marea de Puerto Rosales. Figuras a, c y e corresponden a la capa superficial del sedimento; b, d, and f corresponden a la capa subsuperficial del sedimento. ST1: (a y b); ST2: (c y d); ST3: (e y f).

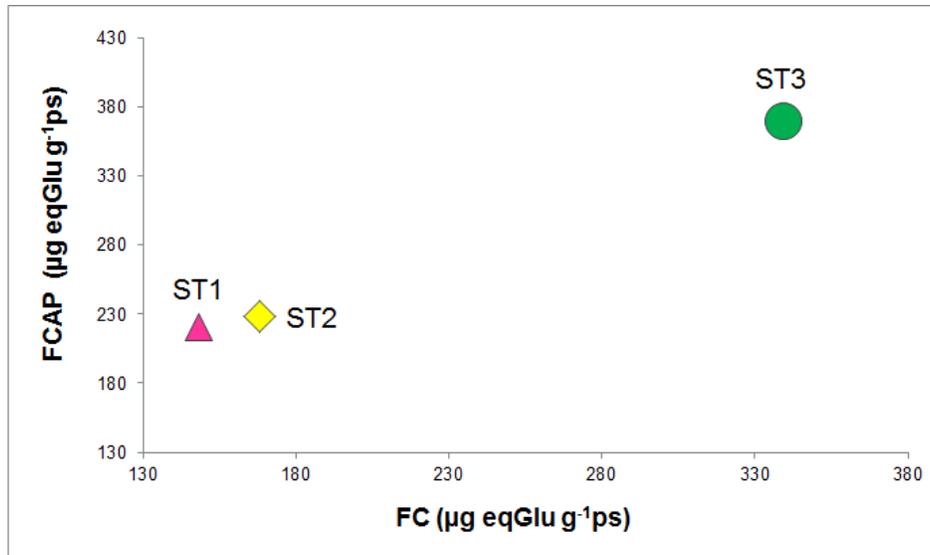


Fig. 4.8: Relación entre la concentración promedio de los carbohidratos coloidales (FC) y los capsulares (FCAP) para la capa superficial y subsuperficial de los sedimentos de los sitios estudiados

4.4.3. Relación entre Cla, FC, FCAP y las variables fisicoquímicas

La relación entre la concentración de Cla, FC, FCAP y algunas de las variables fisicoquímicas analizadas en el capítulo 3 fueron marcadamente diferente para cada sitio y para cada fracción de sedimento.

Para cada sitio de muestreo y cada capa de sedimento (0 - 5 mm y 5 - 10 mm), se evaluó la correlación entre el contenido de las distintas fracciones de carbohidratos analizadas y la concentración de Cla. Se observó que la FC correlacionó significativamente con Cla en ST1 ($r = 0,78$; $p = 0,003$) y ST2 ($r = 0,94$; $p < 0,0001$) para la capa superficial de sedimento; mientras que en ST3 no hubo correlación ($p = 0,16$). Para la misma capa de sedimento no se encontró correlación entre FCAP y Cla en ST1 ($p > 0,05$) y ST3 ($p > 0,05$), pero si hubo correlación en el ST2 ($p = 0,001$). Para la capa subsuperficial del sedimento se encontró una correlación positiva entre la concentración de Cla y el contenido de FC ($r = 0,80$; $p = 0,002$) y FCAP ($r = 0,69$; $p = 0,01$) solo en ST2.

Por otro lado, para evaluar la correlación entre Cla, FC, FCAP, %H, %MO, pH, Eh y temperatura, el análisis estadístico se llevó a cabo considerando los datos de la capa superficial de sedimento de los tres sitios de estudio y los meses correspondientes a las épocas de invierno, otoño y primavera. La estación de verano no se consideró debido a la falta de información de los parámetros fisicoquímicos (equipo en reparación). La matriz de los coeficientes de correlación se muestra en la tabla 4.III.

Además, se consideró la relación entre la concentración promedio de Cla y la materia orgánica (Cla/MO: mg g⁻¹) en ST1, ST2 y ST3 para el periodo de estudio completo. Los valores de Cla/MO variaron entre 0,09 y 0,17 mg g⁻¹ y entre 0,02 y 0,09 mg g⁻¹ para la capa superficial y subsuperficial respectivamente (Fig. 4.9).

Tabla 4.III. Matriz de correlación de Pearson para la concentración de clorofila a (Cla), carbohidratos coloidales (FC) y capsulares (FCAP) y parámetros fisicoquímicos de los sedimentos superficiales de ST1, ST2 y ST3. Nivel de significación: *P < 0,05; **P < 0,01.

	pH	Eh	Temp	Cla	FC	FCAP	%H	%MO
pH	1							
Eh	-0,39	1						
T	-0,09	0,32	1					
Cla	0,23	0,04	-0,16	1				
FC	0,23	-0,22	-0,30	0,65**	1			
FCAP	0,19	-0,31	-0,39	0,65**	0,82**	1		
%H	0,28	-0,20	-0,33	0,81**	0,76**	0,69**	1	
%MO	0,03	0,18	0,35	0,13	-0,02	0,06	-0,01	1

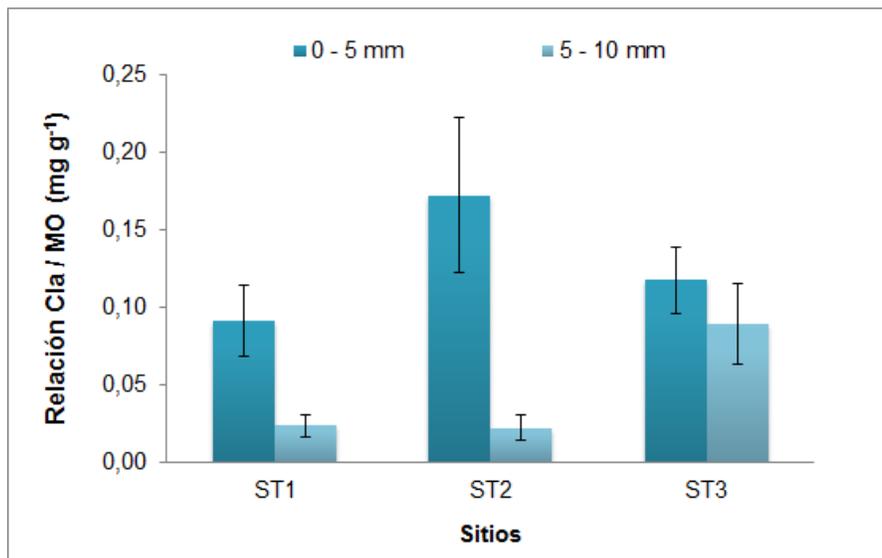


Fig. 4.9: Relación entre concentración de Cla y materia orgánica para ST1, ST2 y ST3 durante el periodo Julio 2012 - Jun2013.

4.5. Discusión

La concentración de pigmentos fotosintéticos fue utilizada como una estimación de la biomasa de la población. Alrededor del 63%-85% de los pigmentos estuvieron concentrados en la capa superficial del sedimento, debido a que el proceso de fotosíntesis es llevado a cabo en una fina capa fótica, la cual se define como la profundidad a la cual la intensidad de la luz se reduce hasta el 1% de la intensidad incidente (Pinckney 1994; de Winder et al., 1999).

Se hallaron diferencias significativas entre los sitios en la concentración de Cla de la capa superficial y subsuperficial, donde la capa superficial presentó valores $ST3 > ST2 > ST1$. Las concentraciones de Cla registradas en este estudio fueron mayores a los reportados para la zona intermareal en otros estuarios donde las matas microbianas están ausentes (de Deckere et al., 2002; de Brouwer et al., 2003; Moreno y Niell, 2004; Stal, 2010). Sin embargo, fueron menores a los reportados para otras planicies de marea donde se desarrollan *biofilms* y matas microbianas (de Winder et al., 1999; Staats et al., 2001; Dijkman et al., 2010; Pierre et al., 2014). Dentro del estuario de Bahía Blanca los contenidos de Cla fueron similares a los valores reportados por Spetter et al. (2015a) para la misma zona media y por Dupré (2012) para la zona interna (donde se desarrollan *biofilms* de diatomeas). Sin embargo, estos valores de Cla fueron mucho menores a los reportados por Pizani (2008) en la zona inter y supramareal de Puerto Rosales.

Durante el período de estudio se observó una variación estacional en la concentración de Cla, con concentraciones reducidas en verano. Con respecto a esto, Pan et al. (2013a) ha reportado que la temperatura y la radiación que incide sobre la superficie de los sedimentos, controla la variación estacional del MPB y no depende del tamaño de grano de los sedimentos a pesar de la diferente granulometría que presentan los sitios. Así, una posible explicación reside en el incremento de las velocidades de evaporación/disección en la planicie de marea. Esto a su vez es consistente con el elevado coeficiente de correlación encontrado entre la concentración de Cla y el %H en la capa superficial del sedimento para este estudio. Sin embargo, el ST3 presentó elevadas concentraciones de Cla a lo largo del todo el periodo de estudio probablemente relacionado al alto contenido de humedad y a la ausencia de predadores. Es más, una dinámica estacional similar fue observada por Spetter et al. (2015a) para el ST1 y el ST3.

La evaluación del contenido de feopigmentos es especialmente importante en sedimentos debido a que son compuestos de degradación que provienen de fuentes

variadas. Son mayoritariamente producidos *in situ* por la muerte celular del MPB, el grazing y tienen una gran contribución de material detrítico presente en la columna de agua, y por lo tanto de clorofila detrítica. Las concentraciones de Feop mostraron un amplio rango de variación y fueron mayores a las concentraciones de Cla de los tres sitios analizados. La relación Cla/Feop puede ser utilizada como un indicador del estado fisiológico de los microorganismos autotróficos (Dell' Anno et al., 2002; Brito et al., 2009) o como una medida indirecta de la actividad del *grazing* cuando existe una correlación directa entre esta relación y la concentración de Cla (Sin et al., 2009). La relación de Cla/Feop fue < 1 para los tres sitios de estudio durante casi todo el periodo estudiado, indicando la prevalencia de detrito en la capa superficial del sedimento y fue similar a los valores reportados por Venturini et al. (2012) en el estuario del Río de la Plata. De acuerdo a Dell' Anno et al. (2002) la prevalencia de feopigmentos puede ser atribuida a la alta turbidez, la contaminación química y a otros factores que afectan el potencial fotosintético de los productores primarios.

No se observó una correlación directa entre la concentración de Cla y la relación Cla/Feop. Esto estaría indicando la ausencia de un control del tipo “*top-down*” sobre la biomasa del MPB de la planicie de marea de Puerto Rosales como ha sido reportado por Pan et al. (2013a,b) debido a la ausencia de predadores en este tipo de ambientes.

Los carotenoides son los pigmentos que cumplen un rol fotoprotector de la comunidad principalmente contra la radiación UV-A y UV-B (Stal y Caummette, 1994) y mediante el *quenching* de especies tóxicas de oxígeno generadas durante reacciones de fotooxidación bajo radiación UV (Konhauser, 2007). Estos pigmentos estables permiten que las cianobacterias, sometidas a condiciones de *stress* debido a cambios en el contenido de agua, salinidad o limitación de nutrientes, toleren una alta exposición a la luz incluso cuando se encuentran en una fase inactiva o estacionaria y no puede reparar o sintetizar componentes de la célula dañados o destruidos (Castenholz, 1994). En base a esto se podría esperar que las concentraciones de carotenoides totales sean mayores durante la época verano, donde la intensidad de la luz es mucho mayor. Sin embargo, en este estudio el contenido de Carot siguió el mismo patrón de variación que el de Cla para todos los sitios de estudio, lo que estaría indicando que su concentración es influenciada por otros factores ambientales. Las concentraciones encontradas fueron similares a las reportadas por Dupré (2012) para la zona interna del estuario de Bahía Blanca.

La extracción de carbohidratos extracelulares de cultivos y sedimentos naturales es altamente dependiente del protocolo usado, como así también del estatus fisiológico de las células y las propiedades bioquímicas de los carbohidratos (Underwood y Paterson, 2003).

Las concentraciones de carbohidratos en los tres sitios estudiados mostraron una marcada variación estacional en los tres sitios. La *FCAP* fue predominante en la capa subsuperficial de los sedimentos, mientras que en la capa superficial la *FC* y *FCAP* representaron el 43% y 57% del total de carbohidratos en la planicie de marea a lo largo de todo el período estudiado. Esto concuerda con lo observado por de Winder et al. (1999), quien reportó que las matas de cianobacterias contienen mayor contenido de carbohidratos capsulares que coloidales en los primeros 5 mm de los sedimentos, mientras que en *biofilms* de diatomeas este patrón es inverso.

Los muestreos fueron llevados a cabo durante el día y en marea baja, cuando los microorganismos migran a la superficie de los sedimentos y ocurre una máxima producción de polisacáridos extracelulares. de Brouwer et al. (2003) reportaron que durante un periodo de emersión los carbohidratos coloidales pueden incrementar su concentración entre 2 y 10 veces. Para esta planicie de marea, Pan et al. (2013a) indicaron que el contenido de carbohidratos coloidales puede variar hasta 5 veces a través de la mitad de un ciclo de marea.

Más aun, de Brouwer et al. (2003) mostraron que los carbohidratos coloidales en *biofilms* de diatomeas correlacionan con *Cla*, pero no con los carbohidratos capsulares. Por otro lado, los mismos autores mostraron que ni los carbohidratos coloidales ni los capsulares correlacionan con el contenido de la *Cla* en matas microbianas dominadas por cianobacterias. En esta tesis, para la capa superficial (0-5 mm) del sedimento, sólo en ST1 y ST2 se encontró una correlación significativa entre *FC* y la *Cla*, mientras que la *FCAP* no correlacionó con la *Cla* en ST1 y ST3. Otros autores han observado un comportamiento diferente de la *FC* y la *FCAP* en *biofilms* y matas microbianas. Así, Staats et al. (2001) hallaron que ambas fracciones de carbohidratos correlacionaban con el contenido de *Cla* en sedimentos colonizados por diatomeas como fue observado para este estudio para el ST2 en la capa superficial (0 – 5 mm) y subsuperficial (5 – 10 mm).

Además, la *FC* y *FCAP* estuvieron positivamente correlacionadas indicando que ambas fracciones de carbohidratos extracelulares obtenidas en este estudio podrían resultar de procesos metabólicos similares (Orvain et al., 2014).

Muchos autores han empleado el modelo de Underwood y Smith (1998) para evaluar la relación entre la Cla y los carbohidratos coloidales. Con este modelo, se puede predecir la concentración de carbohidratos extracelulares ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps) en planicies intermareales, a partir del contenido de Cla ($\mu\text{g g}^{-1}$ ps) de los sedimentos (Staats et al., 2001; Kelly et al., 2001; Thornton et al., 2002; de Brouwer et al., 2003; Bellinger et al., 2005) usando la siguiente relación:

$$\text{Log (contenido carbohidratos coloidales + 1)} = 1,40 + 1,02 \text{ Log (contenido de Cla + 1)}$$

Esta correlación es válida para planicies de marea intermareales donde las diatomeas epipélicas constituyen más del 50% del microfítobentos. Los ensamblajes dominados por cianobacterias no muestran este patrón (Underwood, 1997).

El modelo fue testeado con las concentraciones de FC y Cla de la capa superficial para todo el periodo estudiado y se halló una relación comparable:

$$\text{Log (contenido carbohidratos coloidales + 1)} = 1,10 + 1,09 \text{ Log (contenido Cla + 1)}$$

La cual explica el 55% ($\beta \neq 0$, $p < 0,0001$, $R^2 = 0,546$, $n = 36$) de la variabilidad de la FC en la capa superficial. Todo esto sugiere que más de la mitad de la FC determinada en los sedimentos de la planicie de marea de Puerto Rosales es excretada por las diatomeas epipélicas presentes. Esto podría estar asociado a lo reportado por Pan et al. (2014), quienes observaron que en la planicie de marea de Puerto Rosales la colonización inicial es llevada a cabo por diatomeas pennadas, mientras que las cianobacterias filamentosas requieren más tiempo para colonizar el sedimento desnudo, apareciendo luego de 10 días. Además, estos mismos autores reportaron la ausencia de cianobacterias indicadoras de matas maduras.

Por otro lado, las variaciones estacionales observadas en la FC podrían estar asociadas a la frecuencia de inundación de la planicie de marea, debido a que los carbohidratos coloidales son solubles en agua y son rápidamente metabolizados por los microorganismos (Stal y de Brouwer, 2003). En la capa subsuperficial FCAP fue la fracción predominante (75%) probablemente debido a que este tipo de carbohidratos se une más fuertemente a los sedimentos a través de sus grupos cargados negativamente y

a que no son lavados durante la inundación. Los carbohidratos extraíbles en EDTA no son o están solo débilmente sujetos a la degradación; por lo tanto pueden acumularse en el sedimento y son recalcitrantes a la descomposición (de Winder et al., 1999).

Cuando la *FCAP* fue graficada versus *FC*, el ST3 mostró claramente un comportamiento diferente al ST1 y ST2, lo cual podría estar asociado al menor tamaño de grano de los sedimentos y al elevado contenido de humedad ya que los sedimentos más finos retienen mejor los carbohidratos y cuando la humedad aumenta, se estimula la síntesis de carbohidratos (Stal, 2010; Rossi y De Philippis, 2015). En los tres sitios de estudio se observó una correlación altamente significativa entre el %H y el contenido de FC y FCAP, mostrando menores concentraciones de ambas fracciones de carbohidratos durante los meses de primavera - verano donde la humedad de los sedimentos disminuye. Como ya se mencionó en el capítulo 1, estas sustancias extracelulares pueden retener grandes cantidades de agua y ayudan a estabilizar los componentes macromoleculares y la estructura de los microorganismos que las producen durante los períodos donde la velocidad de evaporación/disección es elevada.

La relación Cla/MO puede ser empleada como indicador de la calidad de los sedimentos (Niell, 1980). En este estudio la relación fue < 1 tanto en la capa superficial como en la subsuperficial, sugiriendo una baja calidad del sedimento y un posible origen refractario y alóctono de materia orgánica. Esto está relacionado a la influencia de la descarga cloacal proveniente de la localidad de Punta Alta como ha sido previamente reportado por Spetter et al. (2015a) para la misma zona de estudio.

4.6. Conclusiones

De acuerdo a los datos analizados en este capítulo se pudieron establecer las siguientes conclusiones:

- ✓ Los sedimentos de la zona media del EBB presentaron valores máximos de Cla principalmente durante la época invernal (Julio 2012 – Jun 2013), al igual que en la columna de agua, donde el fitoplancton presenta un florecimiento invernal.

- ✓ El contenido de Cla, feopigmentos, carotenoides y carbohidratos extracelulares presentó una elevada heterogeneidad espacial y temporal tanto a micro- como a macro-escala.
- ✓ La menor concentración de Cla hallada durante Julio 2012-Junio 2013 comparada a las observadas por Pizani (2008) durante el año 2004 indican un cambio en el funcionamiento del sistema.
- ✓ Las máximas concentraciones de carbohidratos extracelulares fueron registradas cuando las concentraciones de Cla fueron elevadas, lo que demuestra la estrecha relación que existe entre el proceso de fotosíntesis llevado a cabo por el MPB y la excreción de estos productos extracelulares.
- ✓ Dada la correlación entre la *FC* y *FCAP*, ambas fracciones podrían ser producidas a través de procesos metabólicos similares.
- ✓ Las diferentes correlaciones halladas entre el contenido de Cla y las diferentes fracciones de carbohidratos extracelulares en ST1, ST2 y ST3, refleja la existencia de diferentes poblaciones microbianas en los sedimentos de cada sitio y con respecto a otras planicies de marea.
- ✓ La *FCAP* fue predominante (75%) en la capa subsuperficial del sedimento para los tres sitios a lo largo de todo el período estudiado mientras que en la capa superficial existe una mezcla de carbono lábil (*FC*) y refractario (*FCAP*).
- ✓ La relación entre los parámetros fisicoquímicos, el tamaño de grano, la frecuencia de inundación, la concentración de pigmentos y el contenido de carbohidratos extracelulares permitió definir tres diferentes áreas a pesar de su proximidad y a que los tres sitios estudiados se encuentran en la zona supramareal. El ST3, localizado en la zona supramareal alta se comportó de manera diferente al ST1 y ST2, ubicados en la zona supramareal baja. Principalmente, el tamaño de grano y el contenido de humedad actúan contribuyendo a la mayor producción de carbohidratos.

- ✓ El ST3 es el único sitio que mantiene el comportamiento de una mata microbiana epibentónica, las cuales son perennes y no se descomponen durante las estaciones cálidas (primavera-verano). Esto se debe a que ST1 y ST2 han sido progresivamente colonizados por cangrejos cavadores, los cuales tienen una intensa actividad en verano, produciendo la remoción de sedimento y la desintegración de las matas.
- ✓ De acuerdo a las dos relaciones utilizadas, $Cl_a/Feop$ y Cl_a/Mo , los sedimentos de la planicie de marea contienen un elevado contenido de detritos provenientes de la columna de agua y estarían recibiendo aportes externos de materia orgánica (descarga cloacal).

Capítulo 5

Evaluación de nutrientes inorgánicos disueltos y origen de la materia orgánica



Contenidos:

- Parámetros fisicoquímicos en agua superficial y sedimentos
- Nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar superficial e intersticial
- Clorofila *a*, carbohidratos extracelulares y composición de monosacáridos
- Composición elemental e isótopos estables de carbono y nitrógeno de la materia orgánica de los sedimentos

5.1. Introducción

La fuente y dinámica de la materia orgánica en estuarios y sistemas costeros son de gran importancia ecológica, siendo de particular interés las contribuciones relativas de la columna de agua y el bentos, y la interacción entre los componentes pelágicos y bentónicos dentro de estos sistemas (Lessen, 2006).

Las planicies de marea se encuentran entre los componentes más productivos debido a que una gran variedad de procesos biogeoquímicos son llevados a cabo en ellas, incluyendo deposición, remoción de nitrógeno y fósforo y el reciclado de la materia orgánica de origen marino-terrestre y de los nutrientes (DeBusk, 1999).

Las fuentes de materia orgánica de los sedimentos tanto autóctonas como alóctonas son múltiples y diversificadas, entre las cuales podemos mencionar: detritos orgánicos, aportes fluviales/terrestres, pastos marinos, macroalgas y bacterias bentónicas, MPB, fitoplancton, epífitas, aportes antropogénicos, entre otras. La discriminación de la contribución de las diferentes fuentes de materia orgánica dentro de las planicies de marea es de especial interés desde punto de vista biogeoquímico para entender su importancia dentro de los ambientes costeros. Los isótopos estables de carbono y nitrógeno y su relación elemental (C:N) han sido ampliamente utilizados como trazadores naturales para identificar las fuentes y destinos de la materia orgánica en ambientes estuariales y marino costeros (Cook et al., 2004; Zhou et al., 2006; Faganeli et al., 2009; Rumolo et al., 2011; Gao et al., 2012). El uso de estos trazadores se basa en la existencia de una marcada diferencia entre las abundancias naturales de los isótopos estables de carbono y nitrógeno, y la relación C:N provenientes de diferentes fuentes.

Tal como se mencionó en el capítulo 1, las matas microbianas y los *biofilms* que se desarrollan en ambientes costeros están íntimamente relacionados con los ciclos biogeoquímicos de los elementos, ya que todos los nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial pueden circular entre los canales y poros que se forman entre las partículas de sedimento y la matriz exopolimérica. Además, las características fisicoquímicas del ambiente donde estos sistemas microbianos se desarrollan condicionan la cantidad, calidad y composición de la materia orgánica de los sedimentos que colonizan. La producción de una mezcla de carbono lábil y refractario en *biofilms* y matas

microbianas genera condiciones adecuadas que favorecen las interacciones bacterias-MPB en los sedimentos de las planicies de marea y puede ser degradada por un diverso consorcio de microorganismos.

Una gran variedad de autores han reportado la composición de monosacáridos de los carbohidratos excretados por diatomeas y cianobacterias principalmente en trabajos realizados en cultivos (de Winder et al., 1999; Underwood y Paterson, 2003; Underwood et al., 2004; de Brouwer et al., 2006; Bellinger et al., 2005, 2009; Stal, 2010) y en menor medida en trabajos sobre muestras de sedimentos naturales (de Brouwer et al., 2003; Hanlon et al., 2006, Passarelli et al., 2015). Dicha composición depende del tipo de especies que constituyen el MPB y de las condiciones del medio (por ejemplo: condiciones de luz-oscuridad, frecuencia de inundación, salinidad, entre otras) donde se desarrollan las matas microbianas y *biofilms*, como así también de los métodos de extracción empleados para obtención de los carbohidratos extracelulares. En los *biofilms* las diatomeas presentes secretan carbohidratos constituidos por glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, fucosa, ramnosa y ácidos urónicos (Underwood y Paterson, 2003). En las matas microbianas donde las cianobacterias constituyen el grupo dominante, frecuentemente los carbohidratos están compuestos además por ribosa, fructuosa y aminoazúcares como glucosamina y galactosamina (Stal, 1994; Rossi y De Phillips, 2015).

5.2. Objetivos e hipótesis

Objetivos

- Determinar la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar superficial e intersticial y evaluar posibles fuentes y sumideros.
- Evaluar la concentración de Clorofila *a*, feopigmentos, humedad y materia orgánica de los sedimentos para conocer el estado de la planicie de marea durante el periodo de estudio.
- Evaluar la relación entre la biomasa y la disponibilidad de nutrientes inorgánicos disueltos
- Evaluar diferentes trazadores naturales ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y relación C:N) para examinar posibles fuentes de materia orgánica de los sedimentos supramareales de Puerto Rosales.

Hipótesis

“La dinámica de nutrientes inorgánicos disueltos regula el desarrollo de las matas microbianas en la planicie de marea costera”

“Las matas microbianas actúan como degradadoras de la MO produciendo así una recirculación de nutrientes al sistema”

5.3. Metodología y análisis de los datos

Considerando que la biomasa y la actividad de las matas microbianas fueron mayores en la época invernal (capítulo 4), durante el período Julio 2013 – Septiembre 2013 (Invierno 2013) se llevaron a cabo los muestreos de manera quincenal, alrededor del mediodía (12:00 – 16:00hs) y en marea baja, en los tres sitios de muestreo de la planicie de marea de Puerto Rosales descritos en el capítulo 1.

Se tomaron muestras de sedimento para la determinación del porcentaje de materia orgánica, porcentaje de humedad, clorofila *a*, feopigmentos, carbohidratos extracelulares, composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y el contenido de carbono y nitrógeno elemental de acuerdo a las metodologías descritas en el capítulo 2 (sección 2.2.1 y 2.3.1).

Además, se tomaron muestras de agua superficial e intersticial para la determinación de los nutrientes inorgánicos disueltos, materia orgánica particulada, clorofila *a* y feopigmentos de acuerdo a las metodologías descritas en el capítulo 2 (secciones 2.2.2, 2.2.3, 2.3.2 y 2.3.3). Los parámetros fisicoquímicos en agua superficial (pH, temperatura,

turbidez, oxígeno disuelto y conductividad/salinidad) y en el sedimento superficial fueron medidos *in situ* tal como se indicó en el capítulo 2 (sección 2.1).

Con el fin de analizar la diferencia espacial y temporal de los parámetros fisicoquímicos evaluados en la capa superficial del sedimento (Eh, pH y temperatura) se aplicó un análisis de la varianza a dos vías (ANOVA doble) sin réplicas, seguido del test LSD de Fisher (*Least Significant Difference*). La variabilidad espacial (entre sitios y fracciones de sedimento) y temporal (entre fechas) en el contenido de materia orgánica, humedad, clorofila *a*, feopigmentos y carbohidratos extracelulares se siguió el diagrama de la Fig. 3.2 presentado en el capítulo 3 (sección 3.3). Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron evaluados gráficamente mediante el uso de Q-Q plots y diagramas de residuos vs predichos. Debido a la falta de homocedasticidad y normalidad los valores de Clorofila *a* y feopigmentos fueron transformados a $\ln(x+1)$, mientras que los valores de los carbohidratos extracelulares fueron transformados a $\log(x)$. La variabilidad entre sitios de muestreo y las distintas capas de sedimento (0 – 5 mm y 5 – 10 mm) de la composición elemental y de los isótopos estables de carbono y nitrógeno, fue evaluada combinando los datos para el periodo de estudio completo (es decir, ignorando las diferencias temporales) mediante un análisis de la varianza a dos vías. No fueron analizados estadísticamente aquellos parámetros que representaron datos puntuales. Los datos fueron tratados estadísticamente con el programa InfoStat (versión 2016), siguiendo Zar (1996).

5.4. Resultados

5.4.1. Parámetros físico-químicos de los sedimentos y de la columna de agua que cubre la planicie de marea

En la tabla 5.I se muestran los valores de los parámetros fisicoquímicos, la concentración de clorofila *a*, feopigmentos y materia orgánica particulada (MOP) determinados en agua de mar superficial durante la estación de invierno de 2013.

Los valores de pH y salinidad no mostraron grandes fluctuaciones durante el periodo estudiado. Los valores de temperatura fueron típicos para la estación del año, presentando un máximo el 11/09/13 y un mínimo el 12/08/13. Se observaron altas concentraciones de oxígeno disuelto (OD) ($7,54 - 11,0 \text{ mg L}^{-1}$) y porcentajes de saturación de OD (%Sat OD) mayores al 100%, registrándose los máximos valores el 12/08/13 (tabla 5.I).

La concentración de Cla fue más variable, presentando un pico el 16/07/13 y otro de menor intensidad el 28/08/13 (tabla 5.I). El valor mínimo fue registrado el 12/08/13, donde además se observó el máximo valor de turbidez, OD y %Sat OD. Por el contrario, la concentración de feopigmentos fue no detectable para todo el periodo de estudio (tabla 5.I). El contenido de MOP fue elevado en el agua de mar de Puerto Rosales ($2,34 - 4,02 \text{ mgC L}^{-1}$). El valor máximo de MOP registrado el 16/07/13 fue coincidente con el máximo de Cla detectado. Sin embargo, se produjo un segundo pico de MOP de menor intensidad el 12/08/13 que fue coincidente con el mínimo valor de Cla (tabla 5.I).

Los parámetros fisicoquímicos registrados en la capa superficial (0 – 5 mm) de los sedimentos supramareales de la planicie de marea de Puerto Rosales se detallan en la tabla 5.II. Durante el periodo estudiado, la temperatura de los sedimentos mostró una importante variabilidad y fue mayor a la observada en la columna de agua (tabla 5.II). Se hallaron diferencias altamente significativas entre las fechas de estudio (tabla 5.III) presentándose el mínimo valor medio el 5/07/13 ($8,8 \pm 0,5 \text{ °C}$) y el máximo el 11/09/13 ($18,5 \pm 0,5 \text{ °C}$). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre sitios ($p = 0,863$, tabla 5.III). Los valores de pH fueron similares en los tres sitios analizados (tabla 5.II) con valores medios cercanos al valor neutro: $7,0 \pm 0,4$, $6,5 \pm 0,4$ y $6,2 \pm 0,4$ para ST1,

ST2 y ST3 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre las fechas evaluadas ($p = 0,146$) ni entre los sitios de muestreo ($p = 0,395$) (tabla 5.III).

Los valores de Eh de la capa superficial fueron positivos para los tres sitios durante todo el periodo estudiado variando entre 33 y 299 mV (tabla 5.II). No se hallaron diferencias significativas entre sitios ($p = 0,589$, tabla 5.III). Sin embargo, ST1 presentó el mayor valor medio (193 ± 49 mV) respecto de ST2 (129 ± 49 mV) y ST3 (127 ± 49 mV). Tampoco fueron observadas diferencias significativas entre las fechas de estudio ($p = 0,974$, tabla 5.III).

El porcentaje de humedad fue significativamente diferente entre los sitios analizados, con valores medios de $20,6 \pm 3,1\%$ para ST1, $26,1 \pm 8,5\%$ para ST2 y $28,6 \pm 2,9\%$ para ST3 (Fig. 5.1, tabla 5.IV). La retención de humedad tendió a ser mayor en la capa de sedimento superficial para ST1 y ST2 (Fig. 5.1a y b), mientras que en ST3 el %H fue similar en ambas capas (Fig. 5.1c). La misma tendencia fue observada en el capítulo 4 y se hallaron diferencias significativas entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento (tabla 5.IV). Es importante destacar que en los tres sitios se observaron valores elevados de %H en la capa superficial para la fecha del 16/07/13. Además, se encontraron diferencias significativas entre las fechas analizadas presentando el valor medio máximo el 16/07/13 ($28,9 \pm 0,6\%$) y el mínimo el 28/08/13 ($21,1 \pm 0,6\%$) (Fig. 5.1, tabla 5.IV) para toda la planicie de marea.

Para todo el período estudiado, en general, el contenido de materia orgánica mostró la misma tendencia que el contenido de humedad, con valores mayores en los sedimentos superficiales para los tres sitios (Fig. 5.2). Además, las diferencias entre las capas de sedimento fueron significativas (tabla 5.IV). El %MO se comportó de manera diferente durante las fechas de estudio para cada sitio (Fig. 5.2 a, b y c) y fue estadísticamente diferente entre los sitios de muestreo (tabla 5.IV), presentando un valor medio mayor en ST3 ($13,0 \pm 0,6\%$). A diferencia de lo observado en el %H, para la fecha 16/07/13 se registraron los mínimos valores de MO en ST1, ST2 y ST3 (Fig. 5.2 a, b y c). También se detectaron diferencias significativas entre las fechas de estudio, donde el valor del %MO registrado el 16/07/13 ($3,9 \pm 0,6\%$) difiere del observado el 11/09/13 ($10,2 \pm 0,6\%$) (tabla 5.IV).

Tabla 5.I: Resumen de los parámetros oceanográficos determinados en agua de mar en Puerto Rosales, zona media del estuario de Bahía Blanca, Argentina.

Fecha	pH	Temp. (°C)	Salinidad (psu)	Turb. (UNT)	OD (mg L ⁻¹)	%Sat. OD	Cla (µg L ⁻¹)	Feop. (µg L ⁻¹)	MOP (mgC L ⁻¹)
05/07/13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16/07/13	8,2	9,5	36	88	-----	-----	8,01±0,16	nd	4,02
31/07/13	8,3	8,5	35	48	7,54±0,44	92	3,34±0,22	nd	2,34
12/08/13	8,2	8,4	36	141	11,0±0,18	134	2,40±0,80	nd	3,30
28/08/13	8,1	8,7	35	121	8,67±0,69	107	4,23±1,56	nd	2,94
11/09/13	8,2	16,6	34	-----	8,67±0,69	123	2,84±1,17	nd	2,37

Tabla 5.II: Resumen de las características fisicoquímicas de los sedimentos de los tres sitios estudiados en la planicie de marea de Puerto Rosales.

Sitio	Fecha	pH	Eh	Temperatura
ST1	05/07/13	7,5	299	8,7
	16/07/13	5,9	260	13,5
	31/07/13	-----	-----	-----
	12/08/13	-----	-----	-----
	28/08/13	7,8	137	19,0
	11/09/13	6,7	75	18,4
ST2	05/07/13	7,1	46	8,7
	16/07/13	6,1	116	14,7
	31/07/13	-----	-----	-----
	12/08/13	-----	-----	-----
	28/08/13	5,77	185	16,6
	11/09/13	7,07	168	18,2
ST3	05/07/13	7,8	168	9,1
	16/07/13	5,48	33	13,8
	31/07/13	-----	-----	-----
	12/08/13	-----	-----	-----
	28/08/13	5,07	108	16,9
	11/09/13	6,39	198	18,8

Tabla 5.III: Resumen de los resultados del análisis de varianza (ANOVA doble sin réplicas) para los parámetros fisicoquímicos en la capa superficial del sedimento (n = 12).

Variables	LSD	Sitio	Fechas	05/07/13	16/07/13	28/08/13	11/09/13
Temperatura	A	ST1					
	A	ST2	80,7**	A	B	C	C
	A	ST3					
pH	A	ST1					
	A	ST2	ns	A	A	A	A
	A	ST3					
Eh	A	ST1					
	A	ST2	ns	A	A	A	A
	A	ST3					

Las letras iguales indican diferencias no significativas, tanto estacionales como entre sitios analizados.

LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

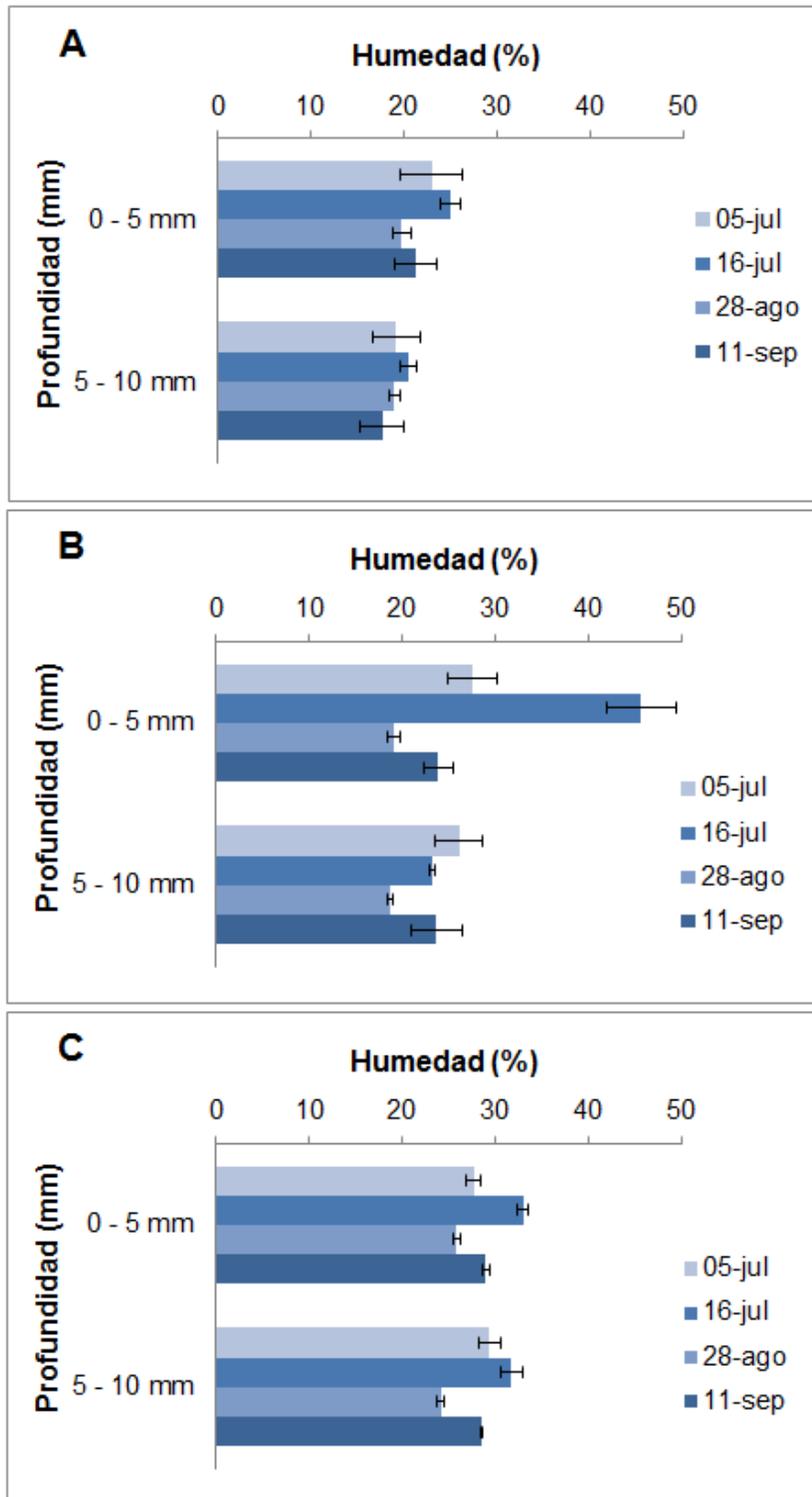


Fig. 5.1: Porcentaje de humedad de la capa superficial (0 – 5 mm) y subsuperficial (5 – 10 mm) para los tres sitios analizados. A: ST1, B: ST2 y C: ST3.

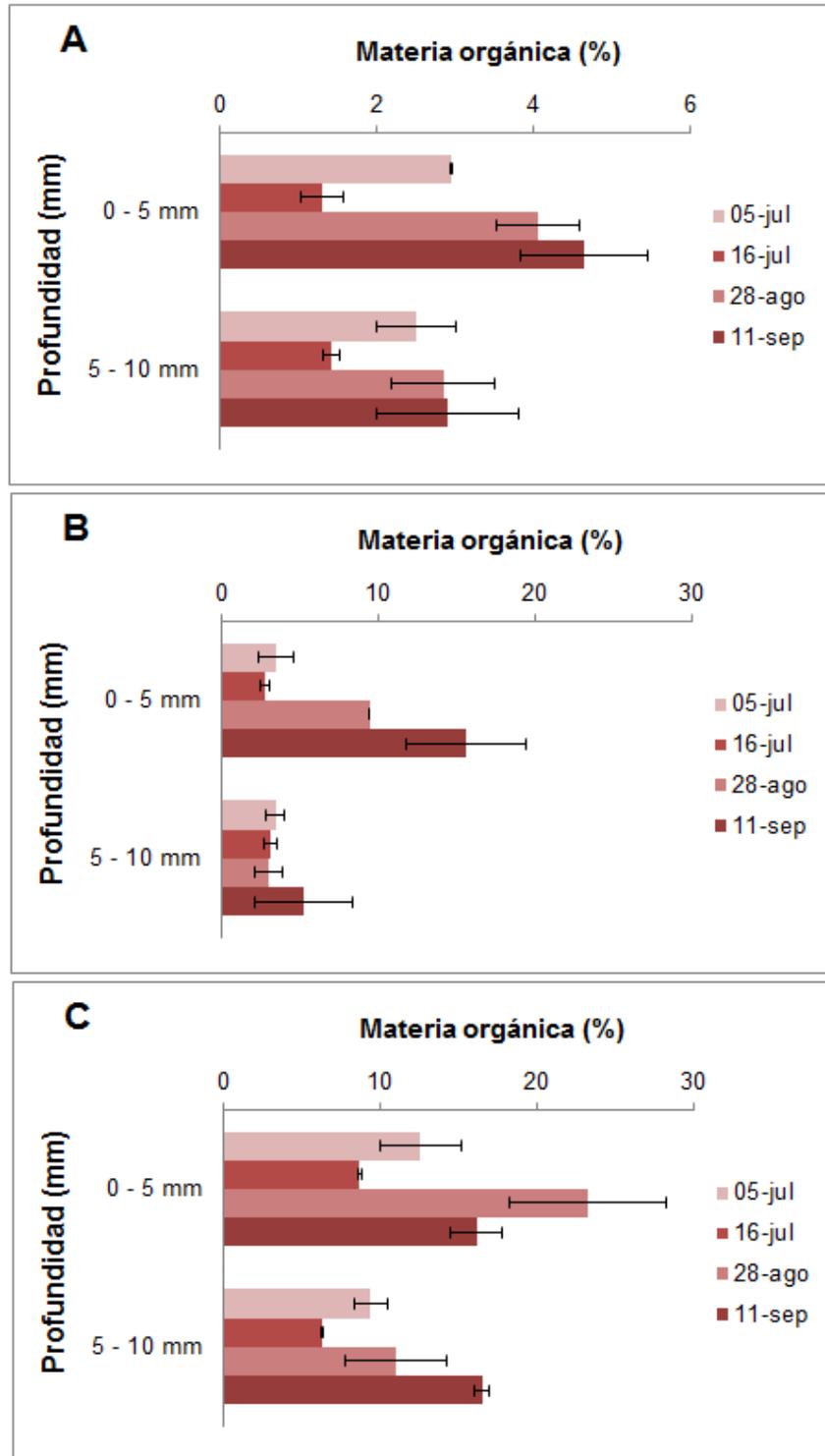


Fig. 5.2: Contenido de materia orgánica de la capa superficial (0 – 5 mm) y subsuperficial (5 – 10 mm) para los tres sitios analizados. A: ST1, B: ST2 y C: ST3.

Tabla 5.IV Resumen de los resultados del análisis de la variancia (ANOVA triple) y test LSD.

Variables	MxFxS (F)	Sitio (F)	LSD	Fracción (F)	LSD	Fechas	Mín. y Máx.
%H	ns	56,9**	A	16,8**	S > SS	34,9**	28/08/13 16/07/13
			B				
			C				
%MO	ns	91,3**	A	15,7**	S > SS	20,7**	16/07/13 11/09/13
			B				
			C				

Variables: humedad (%H) y materia orgánica (%MO). Factores: F, fracción de sedimento; S, sitio; F, fechas. S: capa de sedimento superficial y SS: capa de sedimento subsuperficial.

LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

Las letras iguales indican diferencias no significativas entre sitios.

5.4.2. Nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar superficial e intersticial

La concentración de los nutrientes inorgánicos disueltos en agua de mar y los valores mínimos y máximos correspondientes se muestran en la tabla 5.V. Además, se muestra la concentración del nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) calculada como la suma de la concentración de nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+).

Durante el período estudiado se observó que la concentración de NO_3^- y de fósforo reactivo soluble (PO_4^{3-}) siguió la misma tendencia con valores máximos registrados para el 16/07/13, 12/08/13 y 11/09/13 (Fig.5.3). Por otro lado, el contenido de NO_2^- y silicatos (DSi) mostraron un comportamiento similar, manteniéndose prácticamente constantes a lo largo de todo el periodo (Fig.5.3 y Fig. 5.4), mientras que la concentración de NH_4^+ fue mucho más variable (Fig. 5.4)

Además, en la distribución temporal se puede observar que la máxima concentración de Cla se detectó junto con la mayor concentración de todos los nutrientes disueltos analizados. El 12/08/13 se detectó el valor mínimo de Cla ($2,40 \pm 0,80 \mu\text{g L}^{-1}$), el cual estuvo acompañado por un aumento en la concentración de todos los nutrientes, a excepción del NH_4^+ , con valores de $1,02 \mu\text{M}$, $8,33 \mu\text{M}$, $1,58 \mu\text{M}$ y $37,72 \mu\text{M}$ para NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y DSi respectivamente (tabla 5.I; Fig. 5.3 y 5.4). A su vez, el mínimo valor de Cla detectado fue coincidente con los máximos valores de turbidez, OD, %Sat OD y una elevada concentración de MOP (tabla 5.I).

Por otro lado, se observó que la máxima concentración de NH_4^+ fue coincidente con el máximo valor de MOP detectado el 16/07/13 ($105,91 \mu\text{M}$ y $4,02 \text{ mgC L}^{-1}$, respectivamente), y fue seguida por una brusca caída de su concentración. Desde el

12/08/13 al 11/09/13 la concentración de MOP y NH_4^+ presentaron un patrón inverso (tabla 5.I y Fig. 5.4).

Tabla 5.V: Concentración de nutrientes en agua de mar superficial e intersticial en la zona media del estuario de Bahía Blanca durante el periodo Julio – Septiembre 2013 (Superficial: n = 5; Intersticial: n = 3)

	Nitritos (μM)	Nitratos (μM)	Amonio (μM)	Fosfatos (μM)	DSi (μM)	DIN	N:P	Si:N	Si:P	
Superficial	Media (ES)	0,94 (0,14)	7,00 (1,31)	42,5 (17,3)	1,61 (0,24)	31,6 (3,0)	50,5 (18,3)	31,3 (7,3)	0,6 (0,3)	19,6 (1,5)
	Mín	0,58 (31/07)	3,14 (28/08)	10,70 (31/07)	1,24 (11/09)	23,14 (11/09)	16,5 (31/07)	12,5 (31/07)	0,3 (16/07)	15,3 (16/07)
	Máx	1,40 (16/07)	10,77 (16/07)	105,91 (16/07)	2,54 (16/07)	38,92 (16/07)	118,1 (16/07)	46,5 (16/07)	1,8 (12/08)	23,8 (12/08)
Intersticial										
ST1	16/07	3,95	565,76	237,91	6,21	163,66	807,6	130,1	0,2	26,4
	28/8	2,37	15,02	273,22	6,18	114,35	173,7	34,7	0,3	10,6
ST3	28/8	2,33	41,89	169,74	7,16	111,56	214,0	29,9	0,5	15,6
Planicie	Media (ES)	2,75 (0,40)	159,42 (135,60)	238,52 (55,04)	6,43 (0,54)	125,98 (28,00)	400,7 (114,9)	62,3 (23,1)	0,3 (0,1)	19,6 (3,7)

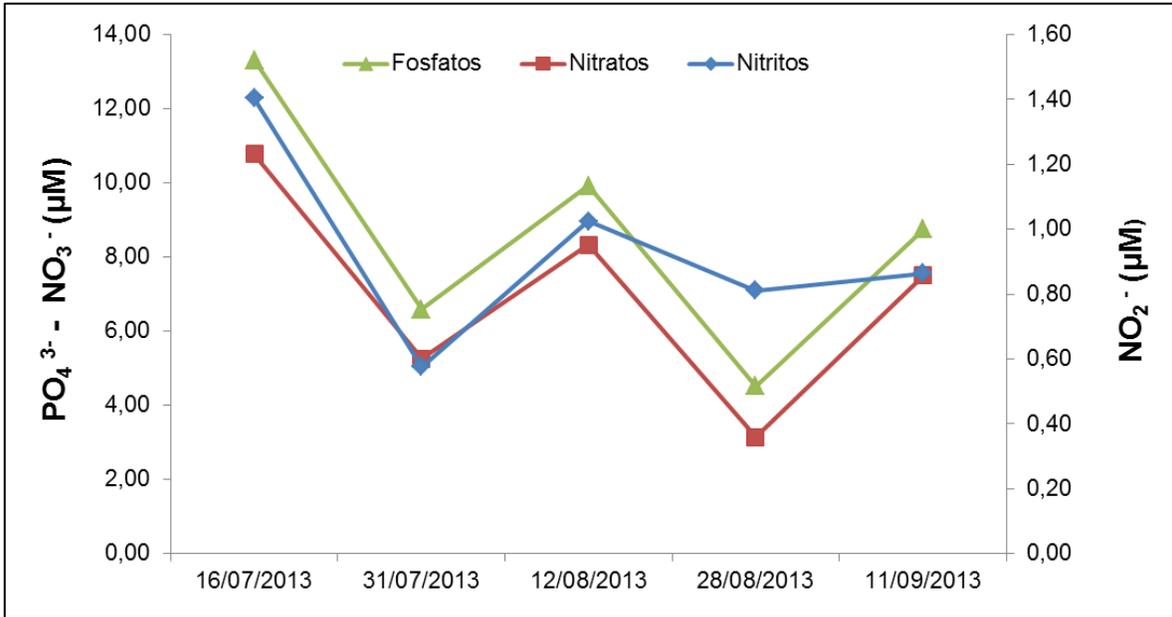


Fig. 5.3: Variación de la concentración de Nitritos, Nitratos y fosfatos (μM) en agua de mar superficial durante el periodo Julio – Septiembre 2013

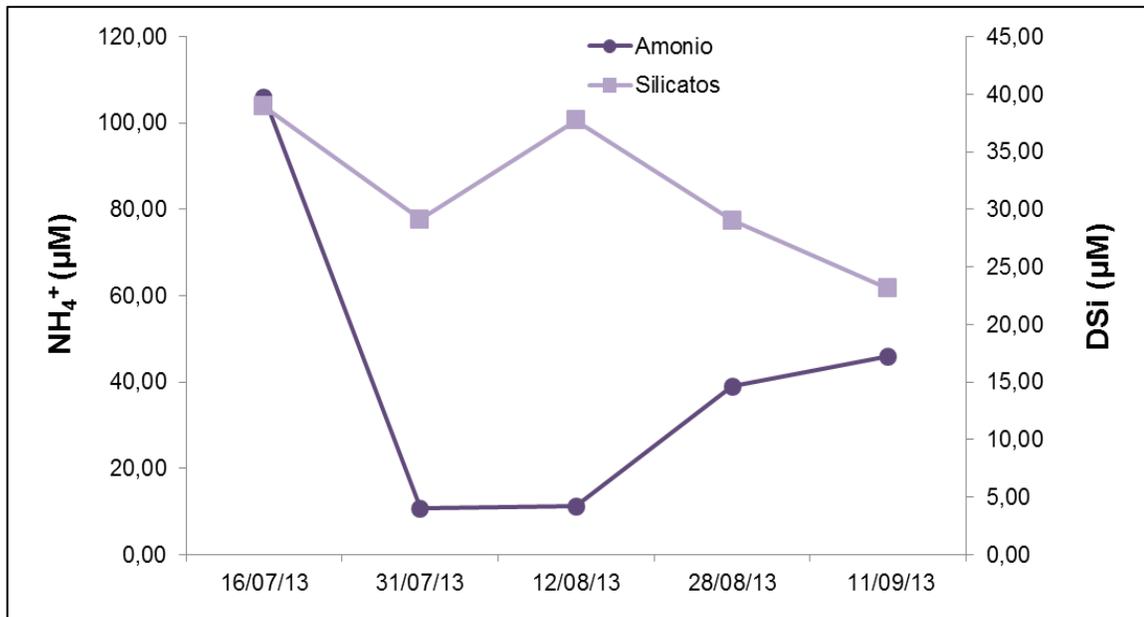


Fig. 5.4: Variación de la concentración de Amonio y Silicatos (μM) en agua de mar superficial durante el periodo Julio – Septiembre 2013

La concentración de nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial para los sitios ST1 y ST3 se muestran en la tabla 5.V. Es importante aclarar que solo se muestran los resultados para las fechas donde fue posible realizar la extracción de la misma.

Considerando la fecha del 28/08/13 se pudo observar que ST3 presentó mayores concentraciones de NO_3^- y menores concentraciones NH_4^+ que ST1, mientras que para el resto de los nutrientes (PO_4^{3-} , DSi y NO_2^-) no hubo diferencias. En ST1 se detectó un importante aporte de NO_3^- (565,76 μM) el 16/07/13 que superó las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- (tabla 5.V). Para el resto de los nutrientes se observó un comportamiento similar entre las fechas analizadas.

Comparando las concentraciones promedio de nutrientes inorgánicos disueltos en agua superficial e intersticial durante el invierno 2013, se observó que todos los nutrientes presentaron mayor concentración en agua intersticial, siendo las diferencias más marcadas para NO_3^- , DSi y NH_4^+ (tabla 5.V).

En la figura 5.5 se comparan las concentraciones de nutrientes en agua intersticial para el período de estudio (invierno 2013) con las observadas durante los años 2009-2010 y 2011, en la planicie de marea de Puerto Rosales durante la época invernal. Se observó un importante aporte de nutrientes nitrogenados principalmente de amonio, seguida por la de nitratos y nitritos; mientras que las concentraciones de fosfatos y silicatos fueron menores a las de los años anteriores.

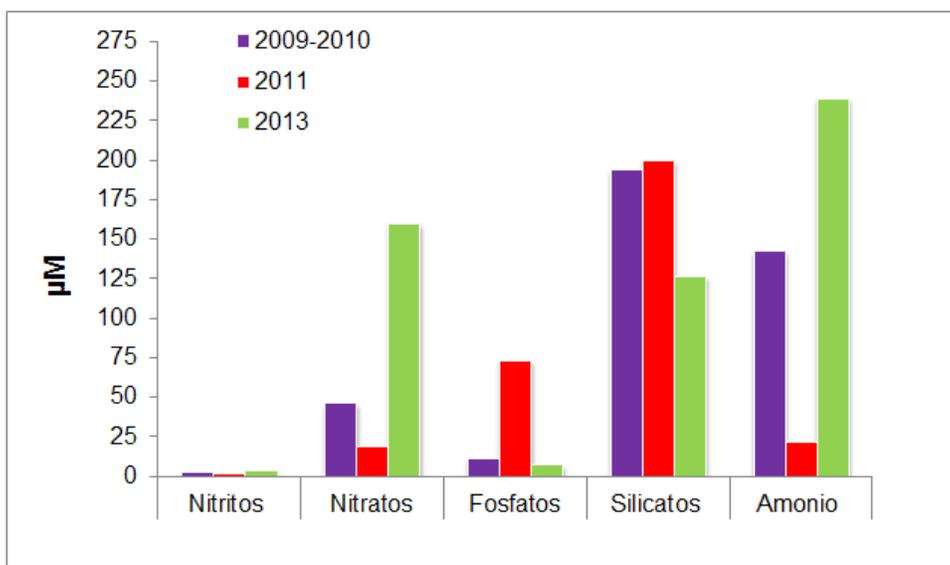


Fig. 5.5: Concentración de nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial para la planicie de marea de Puerto Rosales durante la época invernal de los años 2009-2010, 2011 y 2013.

5.4.3. Clorofila a, carbohidratos extracelulares y composición de monosacáridos

La concentración de Cla presentó un comportamiento diferente en cada sitio de muestreo y en cada capa de sedimento durante el periodo estudiado (Fig.5.6), siguiendo un comportamiento similar al descrito en el capítulo 4.

En ST1, el contenido de Cla varió de la misma manera en ambas capas de sedimento para las distintas fechas. Sin embargo, para todo el período estudiado se hallaron diferencias altamente significativas entre capas con un rango de concentración mayor en la capa superficial ($3,12 - 8,79 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) que en la capa subsuperficial ($0,22 - 2,05 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$) (Fig. 5.6a; $F = 44,1$; $p = 0,0002$). En ambas capas de sedimento se detectaron dos valores máximos de Cla, uno en Julio (5/07/13) y otro más importante en Septiembre (11/09/13). Considerando el valor de Cla promedio obtenido entre ambas capas de sedimento, se hallaron diferencias altamente significativas entre las fechas analizadas, siendo la fecha del 28/08/13 la que se diferencia del resto ($F = 14,7$; $p < 0,0001$).

En ST2, la concentración de Cla superficial presentó un pico el 16/07/13 en la capa superficial y subsuperficial de sedimento (Fig 5.6b); mientras que en ST3 el contenido de Cla se mantuvo elevado en ambas capas de sedimento a lo largo de todo el periodo estudiado, alcanzado valores mayores a $12 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ en la capa superficial (Fig. 5.6c). En ambos sitios se encontraron diferencias altamente significativas entre capas para las distintas fechas de estudio (tabla 5.VI).

Considerando todo el periodo de estudio, se hallaron diferencias significativas entre sitios siendo la concentración de Cla en $ST1 < ST2 < ST3$ ($p < 0,0001$, tabla 5.VI). Además se hallaron diferencias altamente significativas entre capas ($p < 0,0001$; $F = 67,3$), siendo menor el contenido en la capa subsuperficial.

En la figura 5.6 también se muestra el contenido de Feop para los tres sitios de estudio seleccionados, el cual siguió una tendencia similar al de Cla tanto en la capa superficial (0- 5 mm) como subsuperficial (5 – 10 mm) del sedimento. A diferencia de lo que se registró en el capítulo 4, la concentración de Feop fue siempre menor a la concentración de Cla en ambas capas para los tres sitios de estudio seleccionados (Fig 5.6a, b y c). Los rangos de valores variaron entre $0,95 - 5,33 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$, $0,42 - 24,59 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ y $3,38 - 12,12 \mu\text{g g}^{-1} \text{ps}$ para ST1, ST2 y ST3 respectivamente (Fig. 5.6 a, b y c). Se hallaron diferencias significativas entre capas, siendo mayor en la capa superficial (0 – 5 mm) ($p < 0,0001$).

La concentración de Feop se comportó de la misma manera para cada uno de los sitios y en cada capa de sedimento durante el periodo estudiado. Se observó la existencia de diferencias significativas entre sitios (tabla 5.VI, $p < 0,0001$), registrándose la mayor concentración promedio de Feop en ST3 ($8,12 \pm 3,25 \mu\text{g g}^{-1}$ ps). Además, se hallaron diferencias temporales altamente significativas, donde la fecha del 16/07/13 difiere del resto.

La producción de carbohidratos extracelulares mostró un patrón de variación fuertemente asociado a la dinámica temporal observada en la concentración de Cla durante el invierno 2013 (Fig. 5.7 y 5.8).

En ST1 las concentraciones de *FC* y *FCAP* alcanzaron su máximo valor en Septiembre para la capa superficial, mientras que en la subsuperficial los máximos fueron observados en Julio (5/07/13) (Fig. 5.7a y Fig.5.8a). El contenido de *FCAP* fue similar en la capa superficial y subsuperficial, y no se detectaron diferencias significativas entre capas ($p = 0,48$) (Fig. 5.8a). Sin embargo, las capas difirieron en la concentración de *FC* ($p < 0,0001$), siendo mayor en la capa superficial con valores que variaron entre 14,2 y 146,9 $\mu\text{g eqGlu g}^{-1}$ ps (Fig.5.7a). Las bajas concentraciones registradas el 28/08/13 para ambas fracciones de carbohidratos extracelulares fueron coincidentes con un bajo contenido de Cla y marcaron las diferencias significativas halladas entre las fechas de estudio ($p = 0,001$ para *FC* y $p = 0,0004$ para *FCAP*).

Un comportamiento menos definido fue observado en ST2 (Fig 5.7b y 5.8b). Se registraron muy bajas concentraciones de *FC* en la capa superficial, y dos máximos importantes fueron detectados en ambas capas de sedimento el 16/07/13 (Fig. 5.7b). Por otro lado, el contenido de *FCAP* mostró bajos valores en ambas capas de sedimento (5.8b). Debido a la alta variación detectada en la concentración de los carbohidratos, en ST2 se detectaron diferencias significativas entre la capa superficial y subsuperficial para cada una de las fechas de muestreo (tabla 5.VI).

A diferencia de los otros dos sitios, en ST3 las concentraciones de *FC* y *FCAP* se mantuvieron elevadas prácticamente durante todo el período de estudio (Fig. 5.7 c y 5.8 c) y se detectaron diferencias significativas entre las capas de sedimento (tabla 5.VI).

Considerando todo el periodo estudiado se hallaron diferencias significativas en el contenido de *FC* entre las capas de sedimento, siendo mayor en la capa superficial que en la subsuperficial ($p < 0,0001$), mientras que no fueron detectadas diferencias entre capas para *FCAP* ($p = 0,62$). Además, los resultados mostraron que ST1 difiere

significativamente de ST2 y ST3 en el contenido de *FCAP* ($p < 0,0001$) (tabla 5.VI), mientras que ST1, ST2 y ST3 difieren significativamente en el contenido *FC* ($p < 0,0001$) (tabla 5.VI).

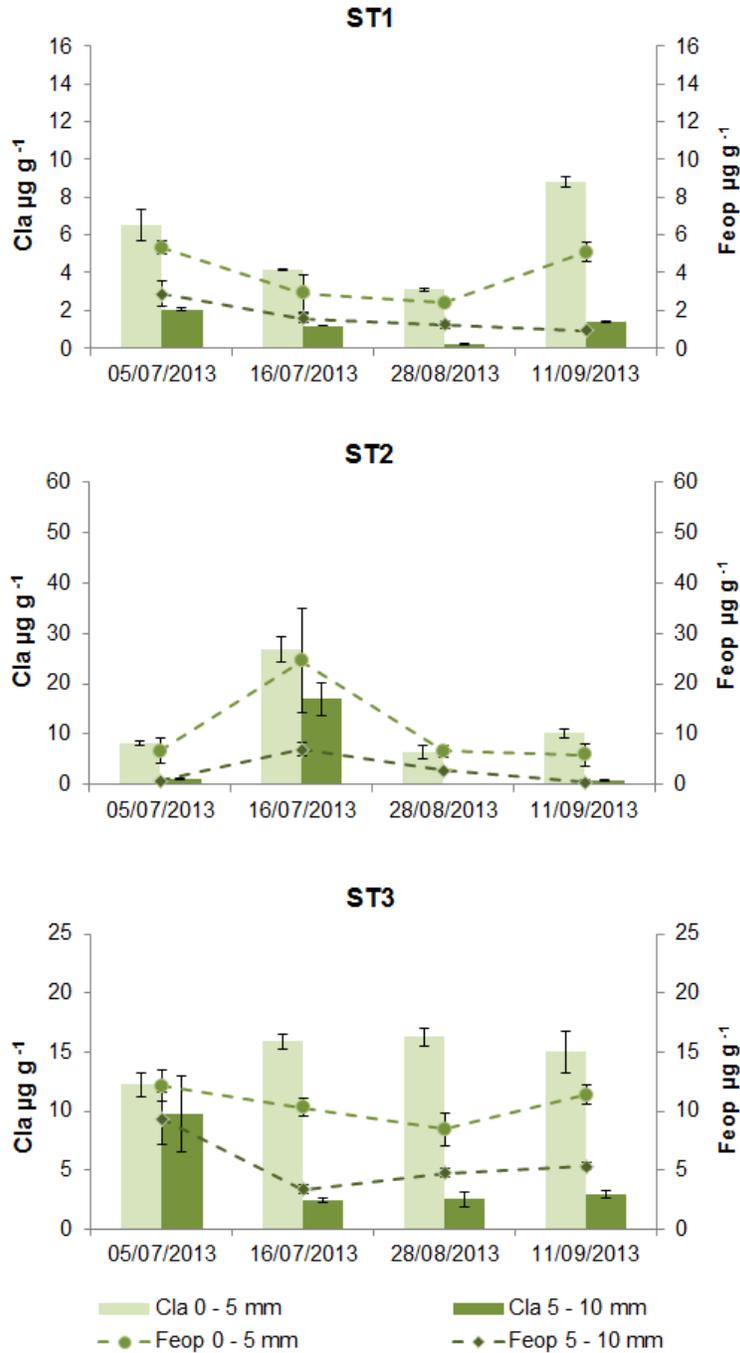


Fig. 5.6: Variación de la concentración de clorofila a (Cla) y feopigmentos (Feop.) en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2013 - Septiembre 2013 (media \pm SE; n=3)

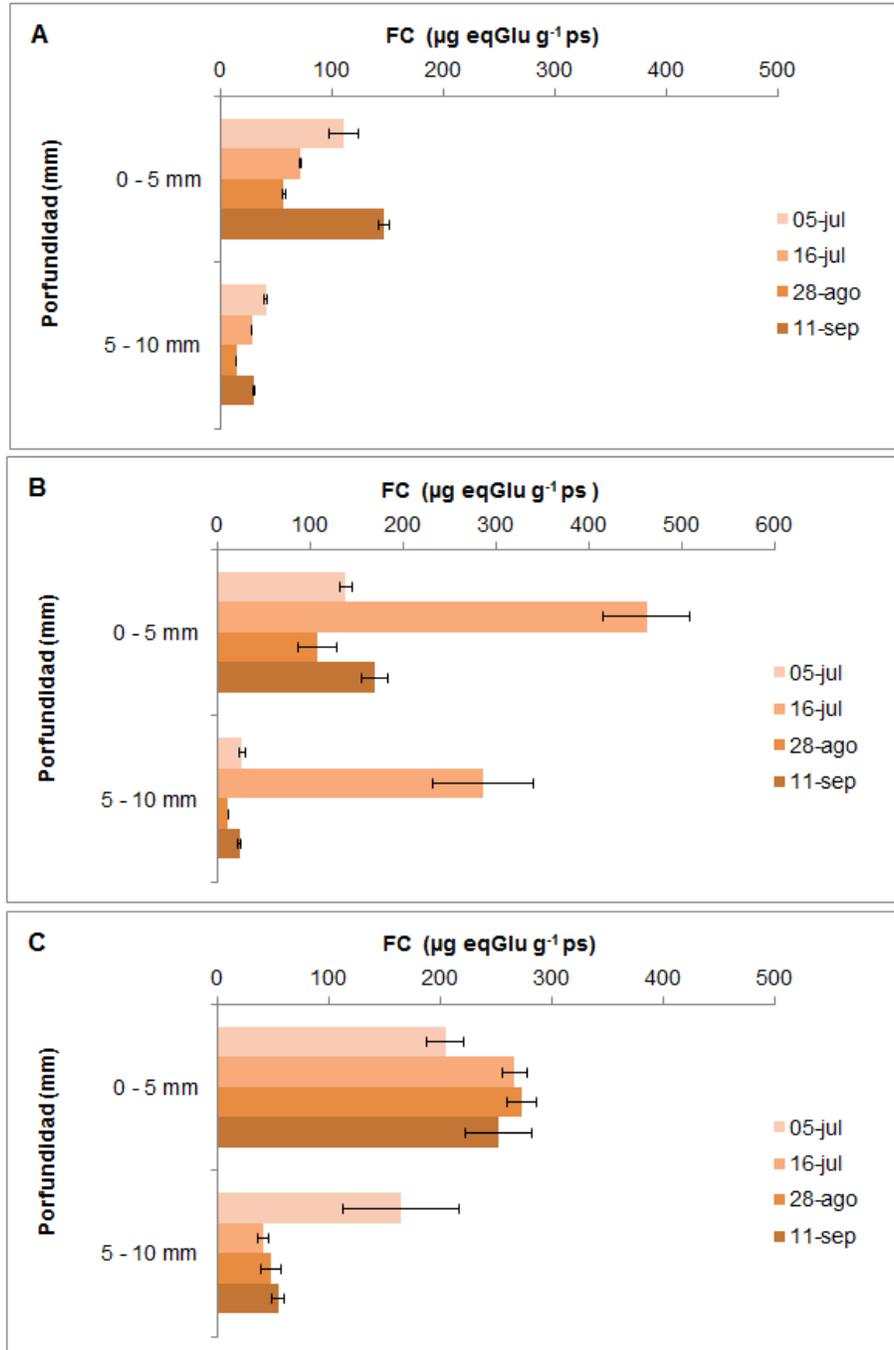


Fig. 5.7: Variación de la concentración de carbohidratos coloidales (*FC*) en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2013 - Septiembre 2013 (media \pm SE; n=3). A = ST1; B = ST2 y C = ST3.

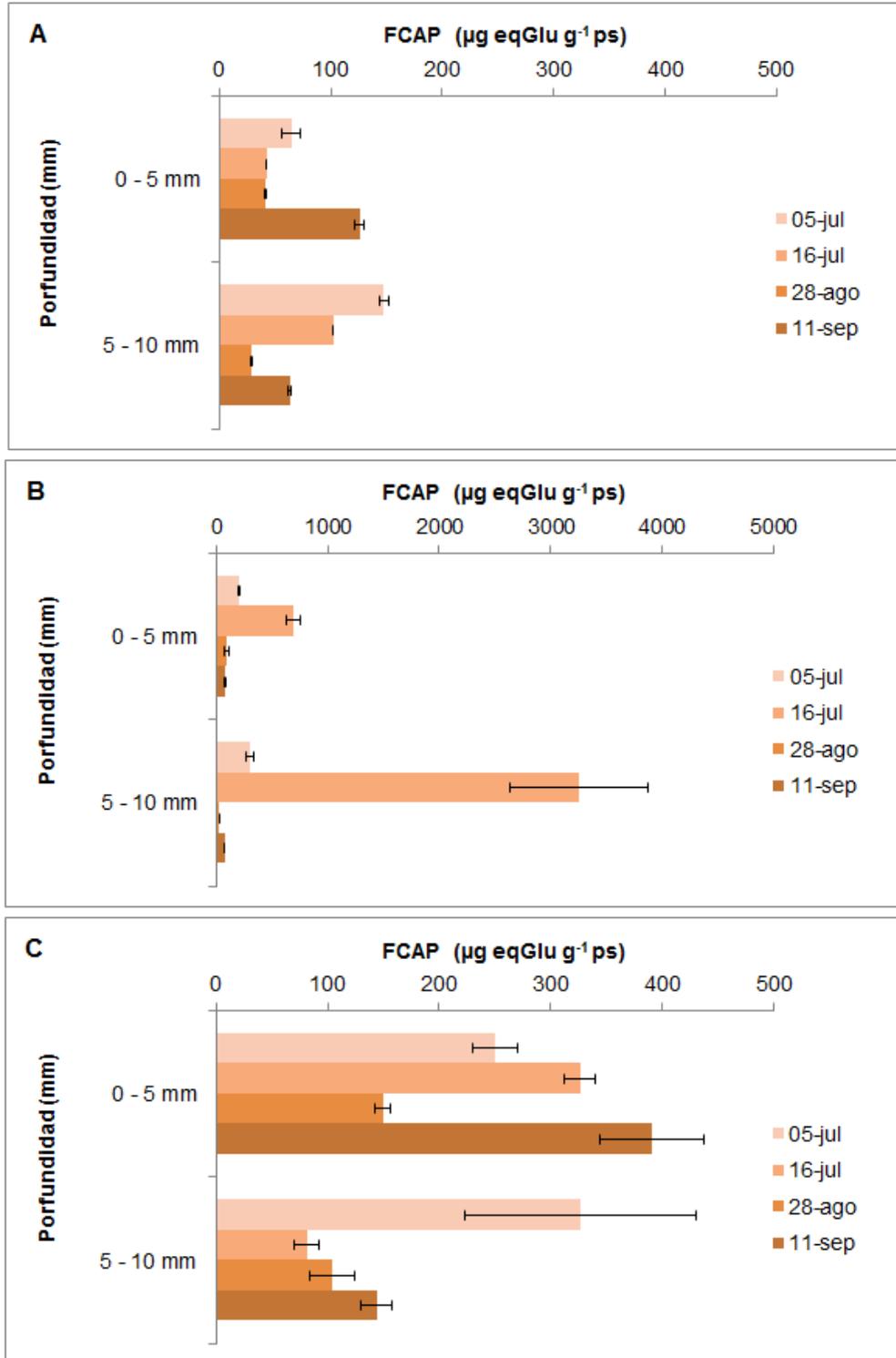


Fig. 5.8: Variación de la concentración de carbohidratos capsulares (FCAP) en el sedimento superficial (0-5 mm) y subsuperficial (5-10 mm) para los tres sitios estudiados de Puerto Rosales durante Julio 2013 - Septiembre 2013 (media \pm SE; n=3). A = ST1; B = ST2 y C = ST3.

Tabla 5.VI Resumen de los resultados del análisis de la variancia (ANOVA triple) y test LSD.

Variables	MxFxS (F)	Sitio	LSD	M x F (F)	Diferencias significativas por fecha Superficial > Subsuperficial
Cla	4,41**	ST1	A	ns	NFA
		ST2	B	187,1**	C > D > A
		ST3	C	108,4**	B > C > D
Feop	ns	ST1	A	----	----
		ST2	B	----	----
		ST3	C	----	----
FC	4,47**	ST1	A	ns	NFA
		ST2	B	197,8**	C > D > A
		ST3	C	109,5**	B > C > D
FCAP	8,3**	ST1	A	ns	----
		ST2	B	28,9**	C
		ST3	B	24,6**	B > D

Variables: clorofila a (*Cla*), feopigmentos (*Feop*), carbohidratos coloidales (*FC*) y carbohidratos capsulares (*FCAP*).

Factores: F, fracción de sedimento; S, sitio; F, fechas (A: 5/07/13, B: 16/07/13, C: 28/08/13 y D: 11/09/13
NFA: Ninguna de las fechas analizadas

LSD al 5%; ns = no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

En la figura 5.9 se muestra la composición de monosacáridos de la *FC* (% moles), extraída de la capa superficial de los sedimentos, para los sitios ST1, ST2 y ST3. Los resultados corresponden a un *pool* de muestra obtenido por la combinación de las distintas *FC* de todo el periodo de estudio. Si bien la glucosa fue el monosacárido predominante en los tres sitios, los porcentajes del resto de las hexosas, pentosas y desoxiazúcares fueron diferentes para cada sitio mostrando el siguiente orden:

ST1: glucosa > galactosa > xilosa > manosa > arabinosa > ramnosa > fucosa

ST2: glucosa > galactosa > manosa > xilosa = fucosa > ramnosa > arabinosa

ST3: glucosa > galactosa > xilosa = manosa > arabinosa > ramnosa = fucosa

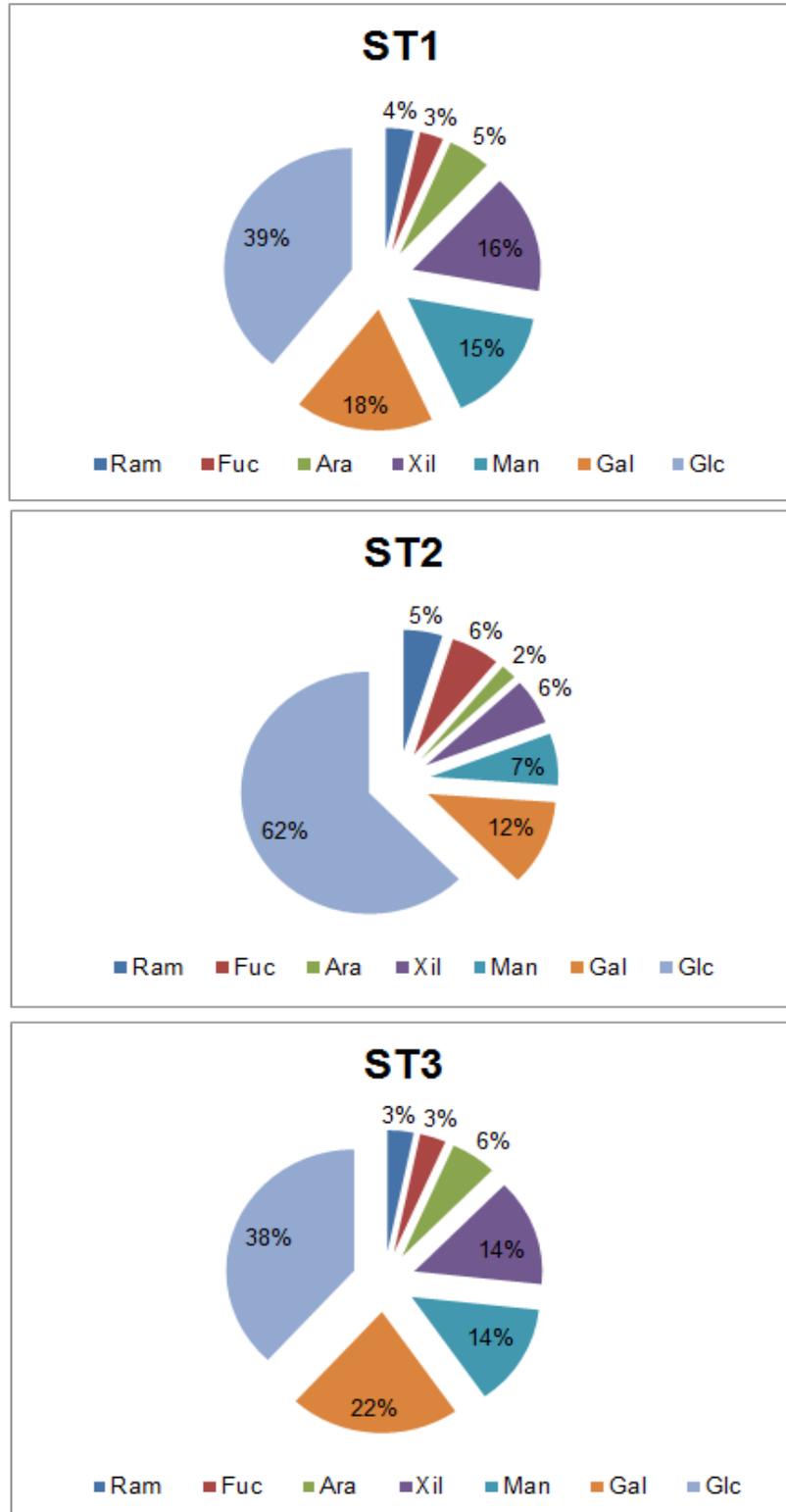


Fig. 5.9: Composición de monosacáridos (% moles) para la fracción coloidal (FC, carbohidratos solubles en agua) de la capa superficial del sedimento en ST1, ST2 y ST3.

5.4.4. Composición elemental e isótopos estables de carbono y nitrógeno de la materia orgánica de los sedimentos

En las figuras 5.10, 5.11 y 5.12 se muestra el contenido de carbono orgánico (Corg), el contenido de nitrógeno total (NT) y la relación carbono orgánico:nitrógeno total (C:N) expresada como peso/peso (p/p) para los tres sitios de estudio seleccionados.

Los porcentajes de Corg fueron relativamente bajos para los tres sitios variando entre 0,10 y 1,07%. En ST1 y ST2 el Corg presentó una distribución más variable entre las capas de sedimento, como así también entre fechas de estudio. En general, para ambos sitios, el porcentaje de Corg fue mayor en la capa superficial y los valores máximos fueron observados el 11/09/2013 (0,70%) y el 16/07/2013 (0,48%) para ST1 y ST2 respectivamente (Fig. 5.10a y Fig. 5.11a). En ST3 el contenido de Corg fue mayor en la capa superficial del sedimento y se mantuvo prácticamente constante durante el periodo estudiado (Fig. 5.12a).

Un comportamiento similar al Corg fue observado en el contenido de NT para ST1, ST2 y ST3 (Fig. 5.10b, 5.11b y 5.12b). El contenido de NT fue menor en ST1 y ST2, los cuales presentaron el mismo rango de valores (0,02 - 0,06%), mientras que en ST3 los valores variaron entre 0,10 y 0,15%.

Las relaciones C:N fueron elevadas y se mantuvieron prácticamente constantes en profundidad para los tres sitios, con valores que variaron entre 5,0 y 11,3 (Fig. 5.10c, 5.11c y 5.12c). En el ST3 la relación C:N fue menos variable que en ST1 y ST2.

Considerando todo el periodo estudiado, se observaron diferencias significativas entre los sitios analizados en el contenido de Corg y NT ($p = 0,038$ y $p = 0,013$, respectivamente), donde ST3 difiere de ST1 y ST2. Además, se hallaron diferencias significativas entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento para las mismas variables ($p < 0,0001$), siendo mayores en la capa superficial del sedimento. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas ni entre sitios ($p = 0,81$) ni entre las capas de sedimento ($p = 0,19$) para la relación C:N.

La composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de la materia orgánica de los sedimentos supramareales mostró una variación diferente para cada sitio de muestreo y para cada capa (Fig. 5.13, 5.14 y 5.15). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ variaron entre -17,3 y -21,4‰, -16,6 y -19,5‰ y -15,8 y -18,4‰ para ST1, ST2 y ST3 respectivamente (Fig. 5.13a, 5.14a, 5.15a).

Se hallaron diferencias significativas en el $\delta^{13}\text{C}$ entre los sitios analizados ($p < 0,0001$) y entre la capa superficial y subsuperficial de sedimento ($p < 0,0001$).

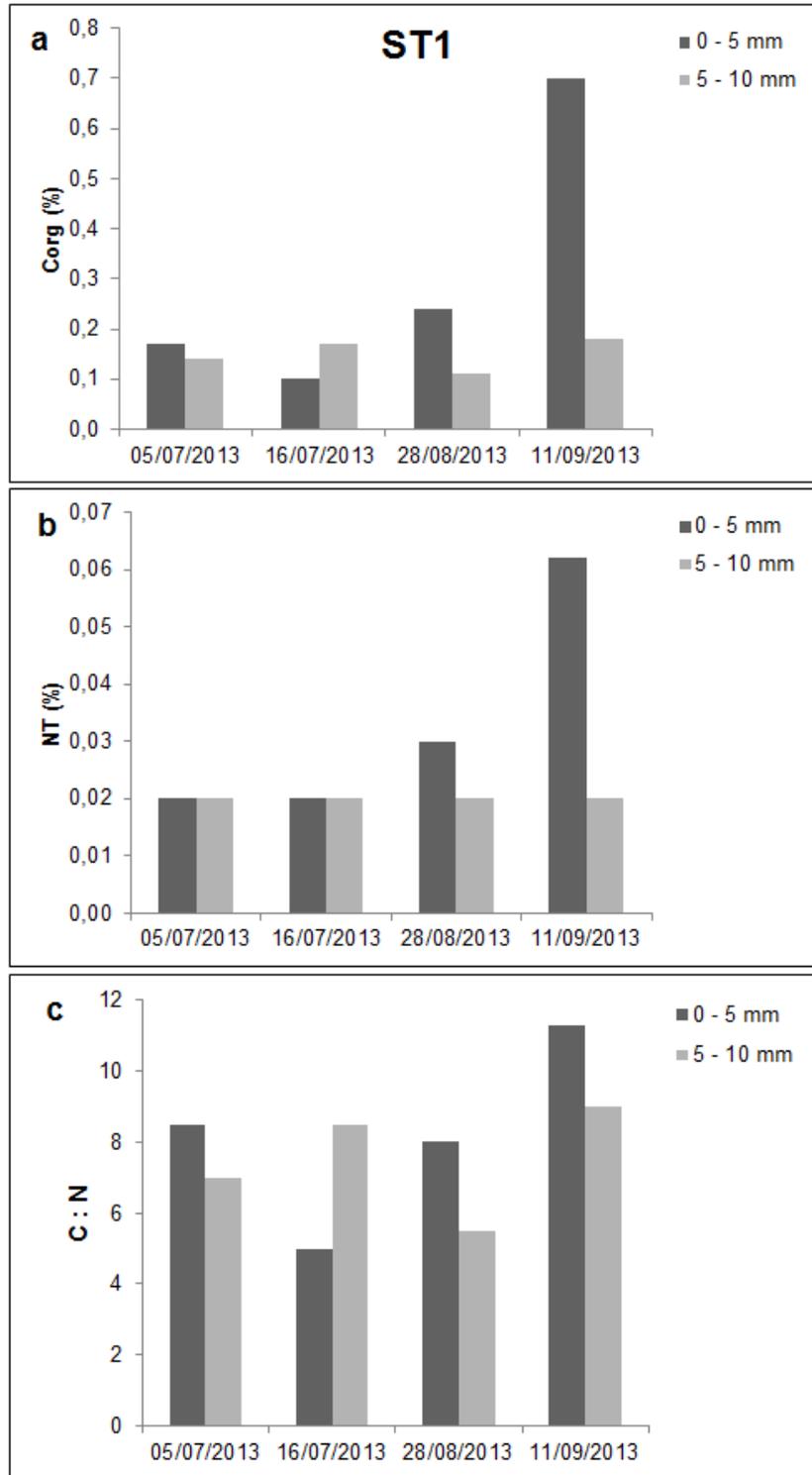


Fig. 5.10: Variación del contenido de carbono orgánico (Corg): **a**, nitrógeno total (NT): **b** y la relación carbono orgánico:nitrógeno total (C:N; p/p): **c**, en ST1 durante el periodo estudiado.

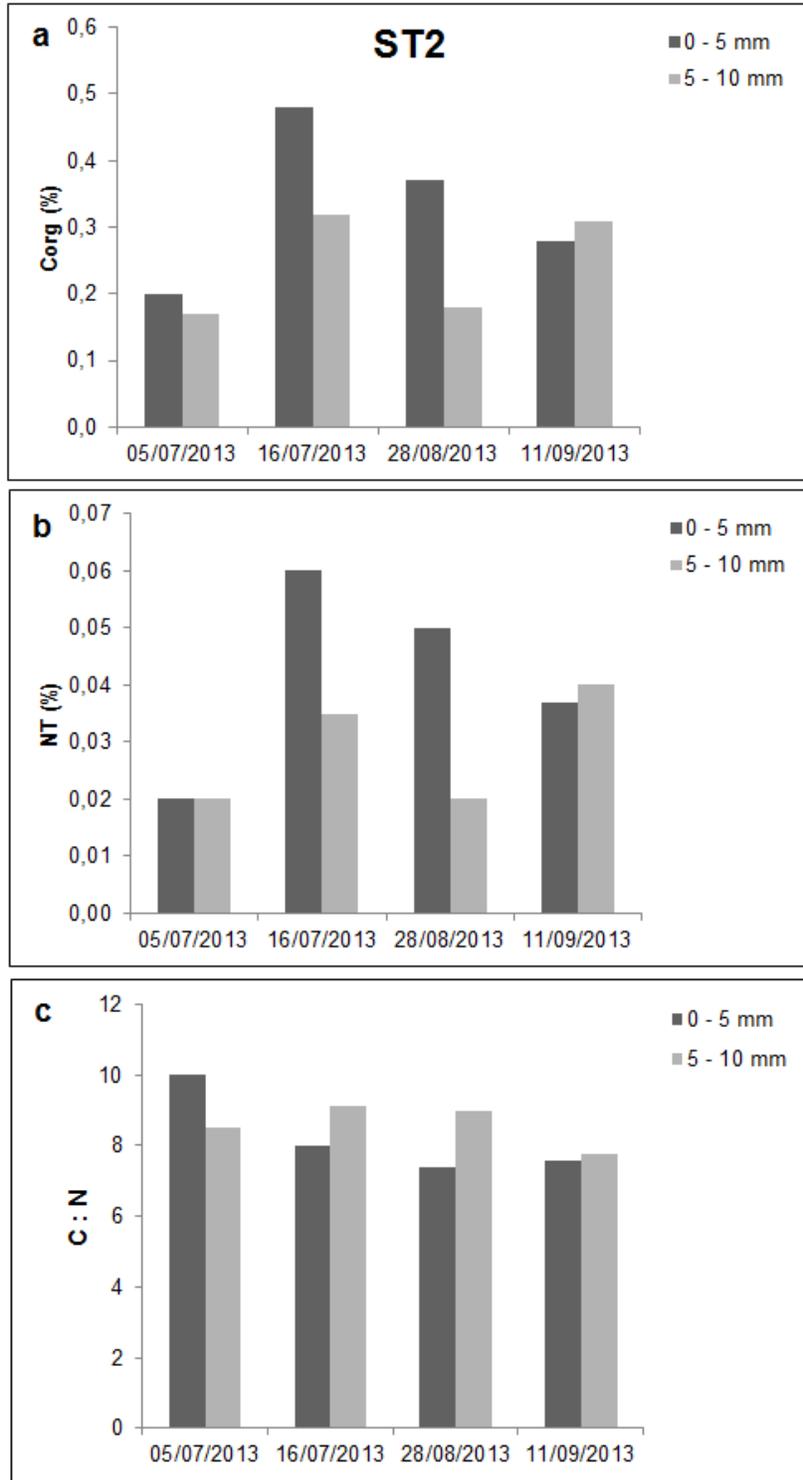


Fig. 5.11: Variación del contenido de carbono orgánico (Corg): **a**, nitrógeno total (NT): **b** y la relación carbono orgánico:nitrógeno total (C:N; p/p): **c**, en ST2 durante el periodo estudiado.

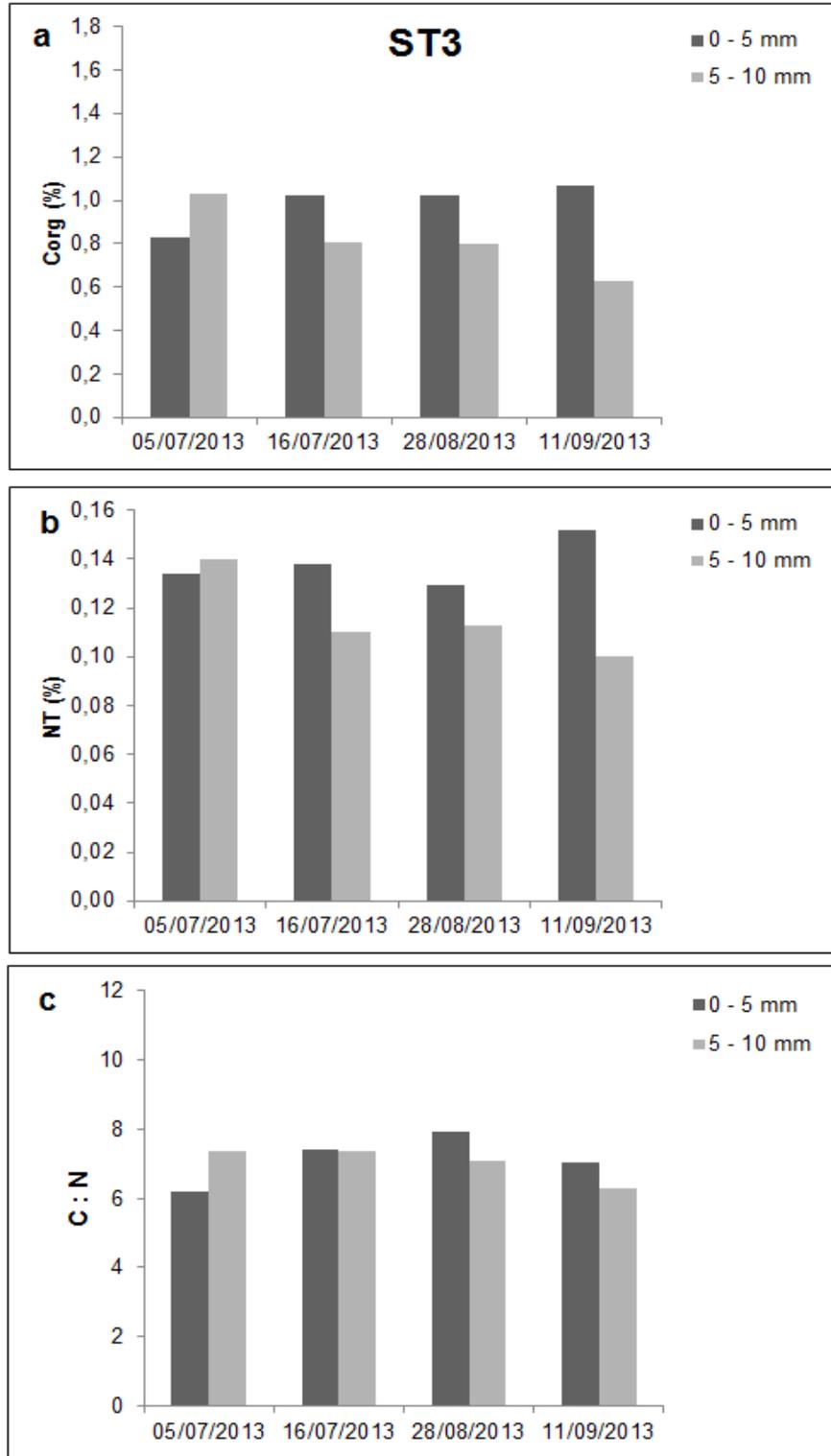


Fig. 5.12: Variación del contenido de carbono orgánico (Corg): **a**, nitrógeno total (NT): **b** y la relación carbono orgánico:nitrógeno total (C:N; p/p): **c**, en ST3 durante el periodo estudiado.

Por otro lado, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ presentaron rangos que variaron entre nd y 7,82 ‰, nd y 9,79 ‰ y 7,48 y 7,99 ‰ para ST1, ST2 y ST3 respectivamente (Fig. 5.13b, 5.14b, 5.15b). A diferencia del $\delta^{13}\text{C}$, la composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ fue siempre superior en la capa subsuperficial del sedimento en ST3. Se hallaron diferencias significativas entre sitios en el $\delta^{15}\text{N}$, donde ST1 difiere de ST3 ($p = 0,006$), mientras que no se observaron diferencias entre la capa superficial y subsuperficial del sedimento ($p = 0,21$).

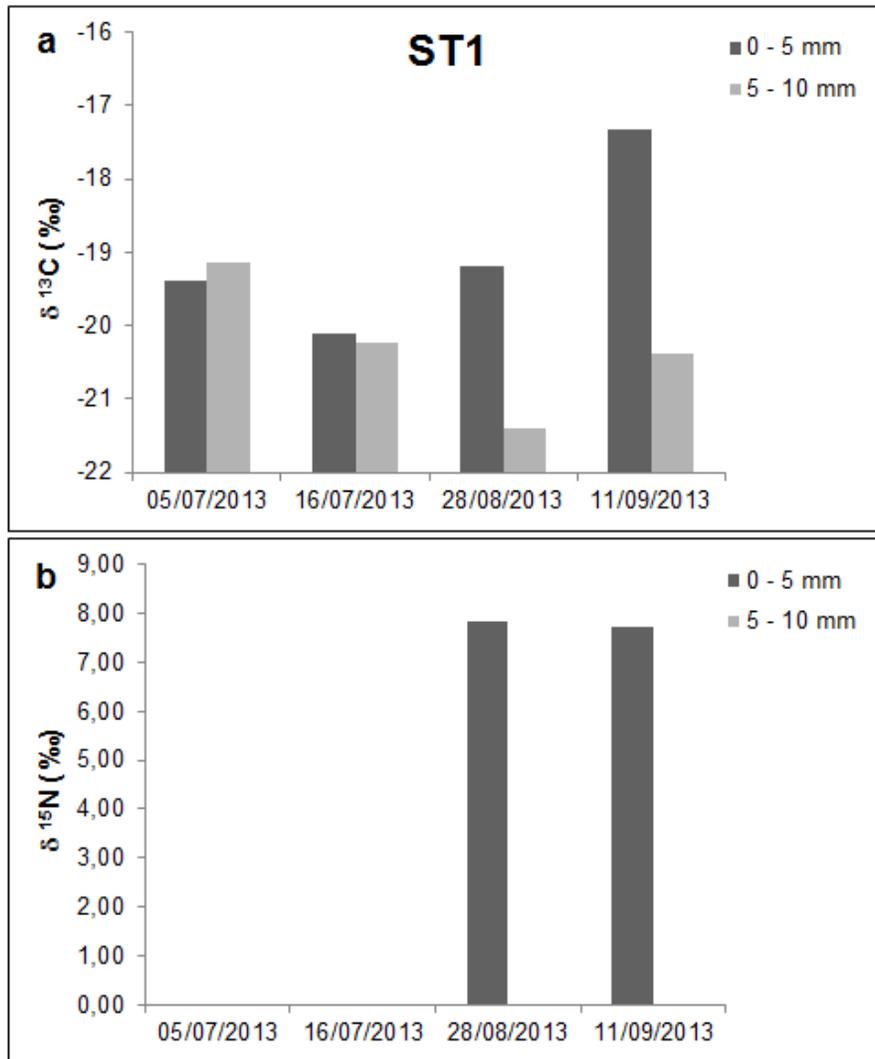


Fig. 5.13: Variación de la composición isotópica de la materia orgánica en el sedimento superficial (0 – 5mm) y subsuperficial (0 – 10mm) para ST1 durante el periodo estudiado. **a:** $\delta^{13}\text{C}$ y **b:** $\delta^{15}\text{N}$

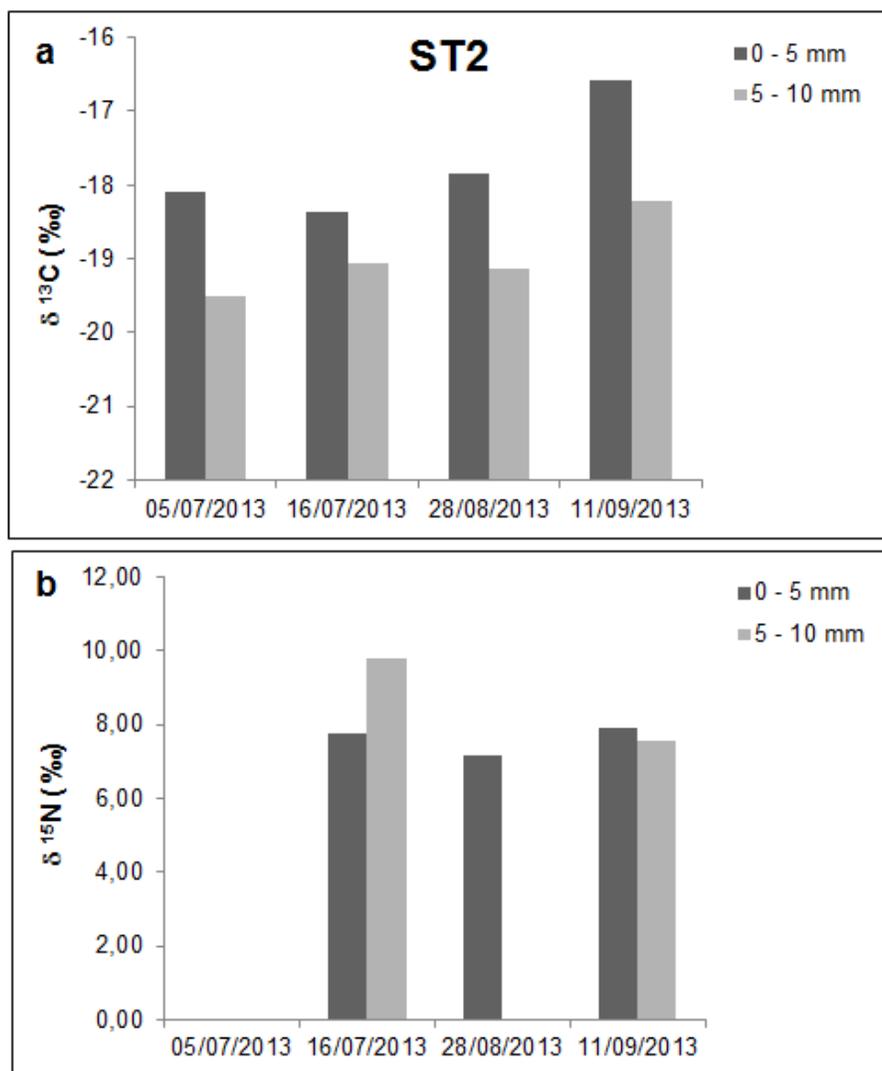


Fig. 5.14: Variación de la composición isotópica de la materia orgánica en el sedimento superficial (0 – 5mm) y subsuperficial (0 – 10mm) para ST2 durante el periodo estudiado. **a:** $\delta^{13}\text{C}$ y **b:** $\delta^{15}\text{N}$

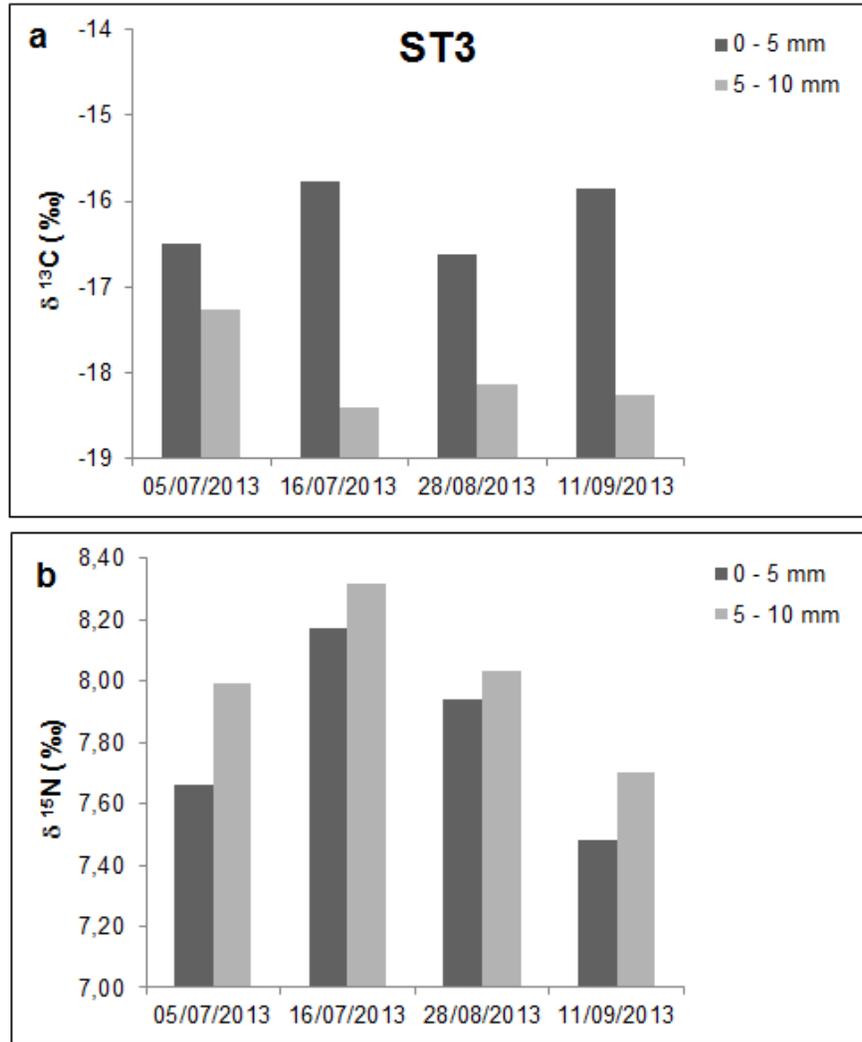


Fig. 5.15: Variación de la composición isotópica de la materia orgánica en el sedimento superficial (0 – 5mm) y subsuperficial (0 – 10mm) para ST2 durante el periodo estudiado. **a:** $\delta^{13}\text{C}$ y **b:** $\delta^{15}\text{N}$

5.5 Discusión

En capítulos previos de esta tesis se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de los sedimentos superficiales de la planicie de marea de Puerto Rosales para los tres sitios de estudio. Las siguientes consideraciones pueden realizarse para los tres sitios en conjunto: los valores promedio de pH para los tres sitios estuvieron cerca del valor neutral (6, 2 – 7,0) y se encontraron dentro del rango de valores normales para sedimentos estuarinos; el potencial redox fue positivo durante todo el periodo de muestreo y los valores medidos (123-192 mV) indicaron que los sedimentos de ST1, ST2 y ST3 son reducidos, siendo probablemente el Fe (III) la especie aceptora de electrones; la temperatura de los sedimentos siguió el patrón de variación estacional con valores más elevados hacia fines del invierno (11/09/13). Ninguno de los tres parámetros permitió establecer diferencias significativas entre los sitios. El porcentaje de humedad y de materia orgánica de los sedimentos supramareales mostraron un comportamiento similar en cada uno de los sitios analizados, con valores mayores en la capa superficial del sedimento. El ST3 presentó el mayor %H y %MO en ambas fracciones de sedimento asociado al menor tamaño de grano de los sedimentos, a la menor frecuencia de inundación y a la mayor productividad de los microorganismos bentónicos presentes.

Los parámetros fisicoquímicos registrados en la columna de agua de Puerto Rosales fueron similares a los previamente reportados dentro de la zona media del estuario de Bahía Blanca (Popovich y Marcovecchio, 2008; Freije et al., 2008; La Colla et al., 2015).

El pH del agua superficial fue elevado y presentó una baja variabilidad durante el periodo estudiado (8,1 – 8,3). Se sabe que el pH del estuario de Bahía Blanca varía en el rango 7,6 - 8,6 y se han alcanzado valores de ~ 9 luego de un *bloom* fitoplanctónico (Popovich et al., 2008), con lo cual los valores observados se encuentran dentro de los reportados para el estuario. El valor máximo de OD registrado (11 mg L^{-1}) junto con un elevado %Sat OD y el máximo de turbidez (141 UNT), no fueron coincidentes con la máxima concentración de Cla, probablemente debido a que otros factores pueden proporcionar OD al sistema, como por ejemplo ingreso de O_2 proveniente del aire por acción de los vientos, la agitación de las mareas entre otros, y no solo debido a la producción primaria, dado que ésta no sería una zona altamente productiva dentro del estuario como si lo es la zona interna (Freije et al., 1980; Fernández et al., 2014). Esto difiere de lo reportado por Popovich y Marcovecchio (2008), quienes observaron valores de OD $\sim 13 \text{ mg L}^{-1}$ durante los periodos de mayor productividad. El rango de valores de

turbidez fue típico para la zona media (< 200 UNT) y menores a los de la zona interna donde la resuspensión de los sedimentos es alta (Perillo et al., 2005). Como se mencionó en el capítulo 1, la menor turbidez observada en Puerto Rosales podría también estar asociada a la presencia de las matas microbianas, ya que las cianobacterias secretan exopolisacáridos que pueden entrapar partículas de arcilla, formando flóculos que luego sedimentan y disminuyen la turbidez del agua (Bar-Or y Shilo, 1987 y 1988; Bender et al., 1994).

Las comunidades microbianas de los sedimentos de los ambientes marinos costeros juegan un rol importante en la oxidación de compuestos orgánicos complejos y la regeneración de nutrientes esenciales para sostener la producción en la columna de agua superficial. Además, los flujos bentónicos de nutrientes y, finalmente, su variabilidad espacial y temporal en el intercambio sedimento-agua se ven afectados por factores ambientales tales como la materia orgánica, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el tamaño del grano de los sedimentos (Borum, 1996; Wilson y Brennan, 2004; Arndt et al., 2013; Ospina-Alvarez et al., 2014). La disponibilidad de nutrientes puede afectar la tasa de descomposición limitando la tasa de crecimiento de descomponedores microbianos. Sin embargo, los nutrientes que limitan el crecimiento pueden ser obtenidos por los microorganismos desde el sustrato orgánico, la columna de agua o del agua intersticial (Reddy y DeLaune, 2008). La descarga de agua dulce durante períodos lluviosos ha sido reconocida como una importante fuente de nutrientes externos en la zona costera (Spetter, 2006, Melo y Limbozzi, 2008).

La concentración de nutrientes inorgánicos disueltos y Cl_a en agua de mar superficial fueron similares a los reportados por Popovich y Marcovecchio (2008) y Spetter et al. (2015b) para la misma zona de estudio. Además, Spetter et al. (2016) indicaron que Puerto Rosales presenta un nivel de eutroficación moderado de acuerdo a los máximos valores de Cl_a y nutrientes disueltos observados. Considerando ambas capas de sedimento y los tres sitios en conjunto, la concentración de Cl_a presentó su valor máximo ($11,6 \pm 9,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ps) en la misma fecha en que fue registrado dentro de la columna de agua (16/07/13), coincidente con los antecedentes del estuario de Bahía Blanca donde el *bloom* fitoplanctónico invernal parece ser el evento más importante de la producción primaria (Marcovecchio et al., 2009, Guinder et al., 2015).

En agua intersticial, las concentraciones de todos los nutrientes inorgánicos disueltos fueron mucho mayores a las registradas en otros ambientes estuarinos y costeros

(Percuoco et al., 2015; Sin et al., 2009; Engelsen et al., 2008) pero similares a los reportados en áreas donde se desarrollan matas microbianas (Bebout et al., 1994; Al-Thani et al., 2014; Fan et al., 2015)

En ST1 los NO_3^- fueron la fracción predominante del DIN en el muestreo realizado el 16/07/13 probablemente debido a un aporte nutrientes a través de agua subterránea (Galloway, 2005), la cual aún no ha sido estudiada en esta área pero la presencia de la misma ha sido reportada por Cuadrado et al. (2014). Esto también ha sido observado en otros sitios de la zona intermedia del estuario de Bahía Blanca por Negrin et al. (2011). En general, el NH_4^+ es la fracción dominante del DIN en planicies de marea intermareales donde el contenido de materia orgánica es alto (Windham-Myers, 2005; Lillebø et al., 2006; Negrin et al., 2011). Sin embargo, tanto en ST1, donde el contenido de MO es menor, como en ST3, el NH_4^+ fue la fracción predominante del DIN durante el muestreo realizado el 28/08/13. Esto sugiere que el flujo de nutrientes en agua intersticial está más bien relacionado con el estado trófico que con el contenido de materia orgánica de los sedimentos (Engelsen et al., 2008).

Bebout et al. (1994) observaron la captación de DIN, principalmente como NH_4^+ , desde la columna de agua en matas microbianas dominadas por *Microcoleus*, cuya incorporación neta de este nutriente parece ser lenta. A su vez, reportaron que el agua intersticial rica en amonio que se encuentra por debajo de la zona fótica, puede suministrar la mayor parte del nitrógeno reciclado fijado que es requerido por los microorganismos para llevar a cabo la producción primaria.

El nitrógeno y el fósforo han sido identificados como los nutrientes limitantes del crecimiento de los microorganismos que constituyen los *biofilms* y las matas microbianas (Pinckney et al., 1995; Staats et al., 2000b; Agogué et al., 2014). Las concentraciones de PO_4^{3-} en agua intersticial reportadas para ST1 y ST3 fueron mucho menores a las reportadas por Spetter et al. (2015a) para la misma área de estudio e incluso menores a las registradas en otros sitios del estuario de Bahía Blanca (Negrin et al., 2011, 2013). En los estuarios alrededor del 90% de fósforo particulado es remineralizado en los sedimentos y liberado a través de agua intersticial (Benitez-Nelson, 2000). Sin embargo gran parte del fósforo es adsorbido por las partículas de sedimento o forman compuestos con otros elementos debido a la gran sensibilidad que presentan los iones PO_4^{3-} para formar complejos con la materia orgánica, adsorberse en óxidos de Fe y Al y a precipitar en presencia de metales divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) o de ión férrico (Fe^{3+}) a pH neutro o alcalino (Atlas y Bartha, 2002; Bally et al., 2004). Para la planicie de marea de Puerto

Rosales, Pérez (2013) reportó que en el sedimento superficial (0 – 5mm) y subsuperficial (5 – 10 mm), el fósforo tiende a permanecer como fósforo orgánico unido al calcio y/o como fósforo refractario residual, aunque una importante fracción se encuentra unida al hierro (Fe). Por un lado, esto podría explicar las bajas concentraciones de PO_4^{3-} detectadas durante el periodo de estudio, pero por otro lado la producción de EPS ha sido estrechamente relacionada a periodos de asimilación de carbono y a la transición entre la fase de crecimiento y el inicio de la fase estacionaria bajo deficiencia de fósforo (Shniukova y Zoloratev, 2015). Como se mencionó al principio de este capítulo, durante la época invernal las matas microbianas de Puerto Rosales presentan una elevada biomasa y producción de carbohidratos extracelulares, razón por la cual podrían estar consumiendo el PO_4^{3-} y disminuyendo su concentración en agua intersticial.

El contenido de silicatos en agua intersticial registrado en ambos sitios de estudio, fue menor al reportado por otros autores para las planicies de marea de zona media e interna del estuario (Spetter et al., 2015a; Marcovecchio et al., 2009; Negrin et al., 2013), probablemente relacionado al menor aporte que tienen los tributarios en esta zona de estudio. Sin embargo, las concentraciones fueron relativamente elevadas, lo cual podría estar asociado a la disolución de los compuestos de sílice presentes en los sedimentos tales como feldspatos, cuarzo, piroxenos y anfíboles (Cuadrado y Pizani, 2007) y a la sílice proveniente de los frústulos de las diatomeas.

Considerando la planicie de marea completa, la concentración media de los nutrientes inorgánicos disueltos fue considerablemente mayor en agua intersticial que en agua superficial. De esta manera, la planicie estaría aportando nutrientes desde los sedimentos hacia la columna de agua vía agua intersticial tal como ya ha sido reportado en otros sectores del estuario de Bahía Blanca (Spetter, 2006), reflejando el importante acople bentónico-pelágico que existe en el área de estudio como ya ha sido reportado en zona interna del estuario por Guinder et al. (2015) y Zapperi et al. (2016). Además, las matas microbianas han sido identificadas como una significativa fuente “nueva” de compuestos nitrogenados en los ambientes donde ellas se desarrollan (Joye y Paerl, 1994). Esto es coincidente con las elevadas concentraciones de NO_3^- registradas durante el periodo de estudio. Sin embargo, Joye y Paerl (1994) sugirieron que el rol de las matas microbianas como fuentes o sumideros depende del balance entre la fijación de N y la denitrificación y de la capacidad de los microorganismos para retener el N remineralizado (N regenerado a partir de compuestos orgánicos dentro de la matriz sedimentaria).

La alta disponibilidad de nutrientes que existe en el área estudiada conforma un ambiente propicio para la proliferación de matas microbianas, pero si bien existe un intercambio entre la interface sedimento – agua, la difusión de iones y de pequeñas moléculas dentro de la mata es significativamente menor cuando pasan a través de la matriz exopolimérica y esto confirma además la capacidad/rol de las sustancias poliméricas extracelulares en la retención de los nutrientes necesarios para llevar a cabo la producción primaria bentónica en estos ambientes.

La concentración y disponibilidad de nutrientes en este tipo de ambientes también influye en la producción y composición de las sustancias poliméricas extracelulares. Varios autores han reportado que la limitación de nutrientes estimula la sobre-producción y/o acumulación de exopolisacáridos debido a un crecimiento desbalanceado de los organismos fototróficos (Underwood et al., 2004; Shniukova y Zoloratev, 2015).

La biomasa, estimada mediante la concentración de Cla, presentó valores elevados asociados a una alta producción de carbohidratos extracelulares (*FC* y *FCAP*). En los tres sitios esto fue detectado para la fecha del 16/07/13 en ST2 y el 11/09/13 para ST1 y ST3. Estos picos fueron coincidentes con las máximas concentraciones de nutrientes inorgánicos disueltos detectadas en agua de mar superficial, los cuales pueden estar disponibles para ser incorporados por el MPB como ha sido reportado por Shniukova y Zoloratev (2015), quienes indicaron una mayor producción de carbohidratos extracelulares cuando las concentraciones de nutrientes fueron elevadas. Sin embargo, en ST3 la máxima biomasa fue registrada el 28/08/13 en la capa superficial del sedimento, asociada a la máxima concentración de *FC* y al NH_4^+ como fracción predominante del DIN. Un comportamiento similar fue observado por Staats et al. (2001) quienes reportaron una mayor velocidad de crecimiento en cultivos de *Cylindrotheca closterium* y mayor producción de carbohidratos con NH_4^+ que con NO_3^- como fuente de nitrógeno. Lo contrario fue registrado por Agogué et al. (2014), quienes observaron una correlación negativa entre la concentración de Cla y el contenido de NH_4^+ y PO_4^{3-} , y la ausencia de correlación de ambos nutrientes con el contenido de carbohidratos. Estudios realizados en cultivos de la diatomea *Navicula cincta*, la cual está presente en los sedimentos del estuario de Bahía Blanca, mostraron máximas concentraciones de EPS bajo limitación de PO_4^{3-} y DSi (Barnech Bielsa et al., 2016).

Por todo lo expuesto anteriormente, se sugiere que en la zona supramareal de Puerto Rosales los nutrientes inorgánicos disueltos no serían el factor fundamental en la regulación de la producción de *FC* y *FCAP*, la cual no sólo depende de que nutriente sea

limitante sino también del tipo de especie celular involucrada. En matas microbianas dominadas por cianobacterias es difícil que ocurra una limitación de nutrientes debido a que estos microorganismos son capaces de fijar N_2 , lo cual es más común que ocurra dentro de *biofilms* de diatomeas (de Winder et al., 1999). Un comportamiento similar fue observado por Hanlon et al. (2006) quienes sugirieron que la limitación de nutrientes no influye en la producción de carbohidratos extracelulares y observaron elevadas concentraciones de nutrientes inorgánicos disueltos en agua intersticial y elevadas relaciones molares Si:N:P (16:16:1).

La disponibilidad de nutrientes también afecta la composición de monosacáridos de los carbohidratos extracelulares (Shniukova y Zoloratev, 2015 y referencias allí citadas). En ST1, ST2 y ST3 la FC, extraída de los sedimentos superficiales, estuvo constituida principalmente por glucosa (38 – 62%) y galactosa (12 – 22%), mientras que los ácidos urónicos y los aminoazúcares estuvieron ausentes. Algunos autores han mencionado que estas sustancias son los componentes mayoritarios en las EPS microbianas (de Winder et al., 1999; Bhaskar y Bhosle, 2005; Oakes et al., 2010; Pierre et al., 2012). Por otro lado, si bien los porcentajes de fucosa y ramnosa fueron relativamente bajos, su presencia es importante ya que le confieren características hidrofóbicas a las EPS y mejoran la adhesión de los microorganismos a la superficie de los sedimentos (Neu y Marshall, 1990; Henriques Vieira et al., 2008).

La composición de monosacáridos y la concentración de carbohidratos pueden ser utilizadas para determinar las fuentes de materia orgánica de los sedimentos (Taylor et al., 1999; de Brouwer y Stal, 2001). Sin embargo, la degradación selectiva puede alterar la composición de la materia orgánica de los sedimentos disminuyendo la abundancia relativa de fracción lábil de los carbohidratos como la glucosa y xilosa e incrementar la presencia de desoxiazúcares como ramnosa y fucosa, las cuales son más resistentes a la degradación (Oakes et al., 2010).

Altos porcentajes de glucosa (50 - 70%) han sido correlacionados con la producción fotosintética, con su rol como fuente de carbono para las bacterias y en los sedimentos con la degradación de compuestos intracelulares que son liberados al medio por senescencia celular (Pierre et al., 2012, 2014; Passarelli et al., 2015 y referencias allí citadas). Por otro lado, de Brouwer et al. (2003) reportaron una composición de carbohidratos en sedimentos estuarinos similar a la de la materia orgánica marina disuelta (DOM). La DOM representa un *pool* refractario que permanece luego de que la fracción lábil es removida con porcentajes de glucosa y ramnosa de ~ 12% y 24%

respectivamente. Los resultados obtenidos en esta tesis estarían indicando que la *FC* de los carbohidratos extracelulares analizados formó parte de la fracción lábil de la materia orgánica de los sedimentos y presentó un bajo estado de degradación durante el invierno de 2013, constituyendo una fuente sustancial de carbono. Esto, además, es coincidente con lo expuesto en el capítulo 4, donde se observó claramente que la concentración de *FC* disminuye bruscamente luego del periodo de producción invernal (probablemente debido al consumo por parte de los microorganismos), mientras que la *FCAP* que representa la fracción más refractaria permanece casi inalterada.

La composición elemental e isotópica de la materia orgánica de los sedimentos colonizados por matas microbianas es controlada por enzimas que crecen y subsecuentemente alteran los compuestos orgánicos. La extensión a la cual estas enzimas pueden modificar la composición de la materia orgánica es influenciada por los flujos de carbono dentro de la comunidad microbiana y entre la comunidad y su medio ambiente (Des Marais y Candfield, 1994).

Los porcentajes de Corg y NT y las relaciones C:N halladas en este estudio fueron similares a las encontradas en otras áreas donde se desarrollan matas microbianas y *biofilms* (Gilhooly III et al., 2007; Dijkman et al., 2010; Bolhuis et al., 2013; Fan et al., 2015) y a los reportados para otros ambientes estuarinos (Lessen, 2006; Zhou et al., 2006; Joseph et al., 2008).

Los valores promedios de la relación C:N fueron de $7,85 \pm 2,0$, $8,42 \pm 0,91$ y $7,08 \pm 0,58$ para ST1, ST2 y ST3 respectivamente. En los tres sitios los valores estuvieron por encima del valor de la relación de Redfield de 5,7 (p/p) y sugieren un importante aporte de carbono extracelular a la planicie de marea de Puerto Rosales como ha sido corroborado en las observaciones de campo. Además, las relaciones C:N se mantuvieron prácticamente constantes en profundidad como ha sido observado por otros autores (Bebout et al., 1994; Des Marais, 2010). Bebout et al. (1994) indicaron valores de la relación C:N para la materia orgánica de $6,3 \pm 0,2$ para *Microcoleus* y de $8,4 \pm 0,9$ para *Lyngbya*, dos especies de cianobacterias presentes en matas microbianas. En la figura 5.16 se muestra Corg vs NT para planicie de Puerto Rosales considerando los datos de los tres sitios para todo el periodo estudiado. La pendiente de la regresión ($y = 6,93x + 0,04$) sugiere un origen autóctono de la materia orgánica de los sedimentos dada su cercanía al valor de Redfield (5,7).

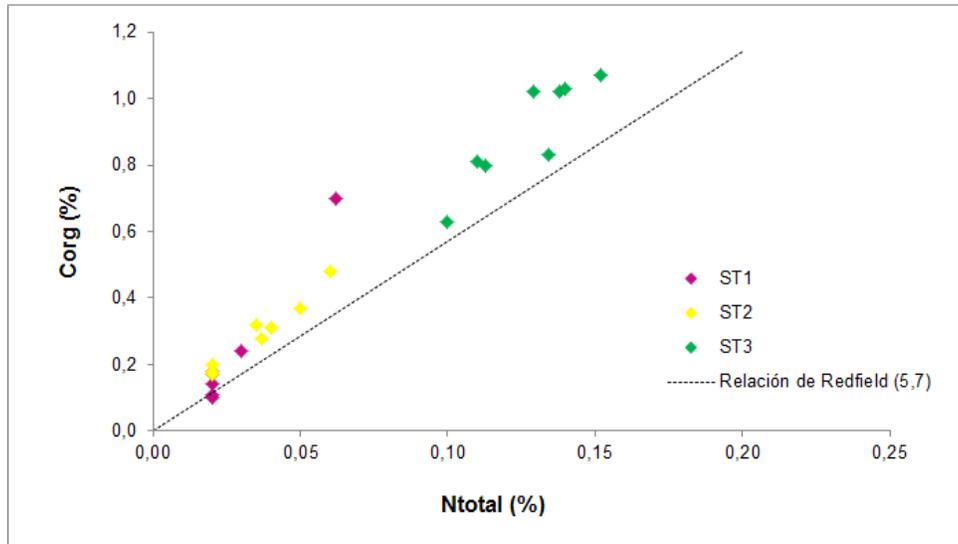


Fig. 5.16: Porcentaje de carbono orgánico (Corg) vs porcentaje de nitrógeno total (NT) para los sedimentos de la planicie de marea de Puerto Rosales.

La relación C:N generalmente actúa como un indicador de las fuentes predominantes de materia orgánica en los sistemas marino-costeros. En el fitoplancton la relación varía desde 6 a 9 en sistemas naturales y el bacterioplancton, más rico en nitrógeno, tiene una relación C:N de 2,6 – 4,3; mientras que la relación C:N es significativamente mayor para la materia orgánica terrígena (>12) y la materia orgánica de planicies de marea intermareales (8,01 – 12,30) (Liu et al., 2006 y referencias allí citadas). Los bajos valores de la relación C:N encontrados para este estudio sugieren una muy baja contribución de materia orgánica de origen continental a los sedimentos supramareales.

Dado que la relación C:N refleja fuertemente la fuente de materia orgánica, se espera que exista una correlación negativa entre el $\delta^{13}\text{C}$ y C:N (Wu et al., 2002). Sin embargo, en este estudio no se encontró correlación entre ambos indicadores (Fig. 5.17a; $r = -0,20$; $p = 0,47$) lo cual puede ser atribuido a los distintos procesos de descomposición que sufre la materia orgánica (Thornton y MacManus, 1994; Wu et al., 2003).

Los rangos de $\delta^{13}\text{C}$ en sistemas estuarinos son amplios y varían respectivamente desde -30‰ a -25,4‰, -23,2‰ a -18‰ y \sim -30‰ para el carbono orgánico de origen terrestre (plantas C_3), producción del fitoplancton marino y fluvial (Middelburg y Nieuwenhuize, 1998; Graham et al., 2001). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados en esta tesis variaron entre -15,8‰ y -21,4‰ e indicarían un aporte de materia orgánica de origen marino. Esto es coincidente con lo recientemente reportado para el estuario de Bahía

Blanca por La Colla et al. (2014). Estos autores indicaron que la materia orgánica de los sedimentos es principalmente afectada por fuentes marinas siendo el fitoplancton el principal contribuyente, mientras que la *Spartina alterniflora* presente en marismas y planicies de marea tienen una muy pequeña contribución. Además, se hallaron diferencias significativas entre sitios registrándose los valores más altos en ST3 (entre -15‰ y -18,4‰), lo cual podría estar asociado a la menor frecuencia de inundación del sitio. Como se mencionó anteriormente, el MPB puede modificar la composición isotópica de carbono de la materia orgánica de los sedimentos. Una correlación positiva fue hallada entre los $\delta^{13}\text{C}$ y la concentración de Cla para toda la planicie (Fig. 5.18a), indicando que los valores relativamente altos de $\delta^{13}\text{C}$ se relacionan con altos contenidos de Cla como fue observado en ST3. Esto además sugiere la existencia de una importante secreción de carbono orgánico por parte de los microorganismos bentónicos dentro de los sedimentos supramareales (es decir, carbono asociado a la producción primaria de origen autóctono).

Ha sido reportado que la materia orgánica detrítica es generalmente caracterizada por bajos valores de $\delta^{15}\text{N}$, mientras que el componente marino presenta valores relativamente altos (Middelburg y Nieuwenhuize, 1998; Graham et al., 2001).

Los $\delta^{15}\text{N}$ presentaron una alta variabilidad (nd- 9,79‰) espacial y temporal. Esto indica que distintos factores tienen una influencia significativa en la distribución del $\delta^{15}\text{N}$ de la materia orgánica. Liu et al. (2006) observó que valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$ se correlacionaron con altos valores de la relación C:N y sugirieron que estas relaciones se producen como resultado de la diagénesis. A medida que se produce la mineralización microbiana la cantidad de NT se reduce, y el N^{14} del sustrato orgánico disminuye, el cual se enriquece progresivamente en N^{15} . Esto podría explicar los mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ observados en la capa subsuperficial del sedimento (5 – 10 mm) para ST3. Sin embargo, considerando los tres sitios y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y C:N, no se observó una correlación positiva entre las variables (Fig. 5.17b; $r = 0,27$; $p = 0,34$) sugiriendo que los procesos diagenéticos no son el factor fundamental que regula la composición de nitrógeno de los sedimentos en esta planicie.

Otros autores han asociado la alta variabilidad en el $\delta^{15}\text{N}$ al aporte de NH_4^+ proveniente de la descarga cloacal donde los valores pueden ser $> 7\text{‰}$ (Carlier et al., 2008). Por otro lado, Dubois et al. (2012) consideraron que un valor medio de $4,4 \pm 0,4$ para el $\delta^{15}\text{N}$ corresponde a una zona prístina, sin impacto antropogénico. Los sedimentos supramareales de Puerto Rosales reciben los desechos cloacales de la ciudad de Punta

Alta (~ 60.000 habitantes) con una descarga de al menos unos 84.000 m³/día sin ningún tipo de tratamiento previo desde hace aproximadamente 15 años (CTE, 2003). Tal como se mencionó en el capítulo 4, Spetter et al. (2015a) evidenciaron la influencia de la cloaca en dos de los sitios de esta tesis (ST1 = SI y ST3=SII) encontrando una contaminación biológica por la presencia de una gran cantidad de *Escherichia coli* (bacteria asociada a la contaminación fecal reciente). Dichos autores reportaron valores de 35 y 40 CFU g⁻¹ ps para ST1 y ST3 respectivamente. Por lo tanto, esto explicaría el efecto de la descarga cloacal al sistema produciendo una alta variabilidad en los isótopos estables de nitrógeno en la zona de estudio.

La ausencia de correlación entre el $\delta^{15}\text{N}$ y la concentración de Cla (Fig. 5.18b) estaría indicando que el MPB que coloniza la planicie de marea tiene una baja contribución de nitrógeno a la materia orgánica de los sedimentos y concuerda con lo sugerido por Liu et al. (2006), quienes sugirieron que una línea de regresión Corg vs NT que pasa muy cerca del origen (para este estudio: $b = 0,04$; Fig. 5.16) indica bajas concentraciones de NH_4^+ fijado por el MPB. Sin embargo, ha sido reportado Cook et al. (2004) que bajos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (2 - 6‰) indican que la fijación de N_2 probablemente contribuye con los requerimientos de crecimiento para las cianobacterias.

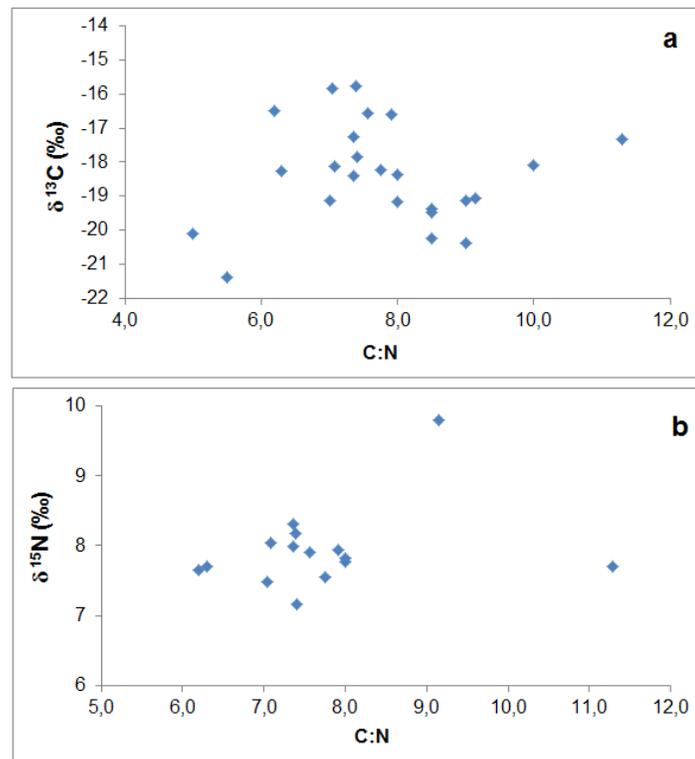


Fig. 5.17: a) $\delta^{13}\text{C}$ vs C:N y b) $\delta^{15}\text{N}$ vs C:N para los sedimentos supramareales de Puerto Rosales.

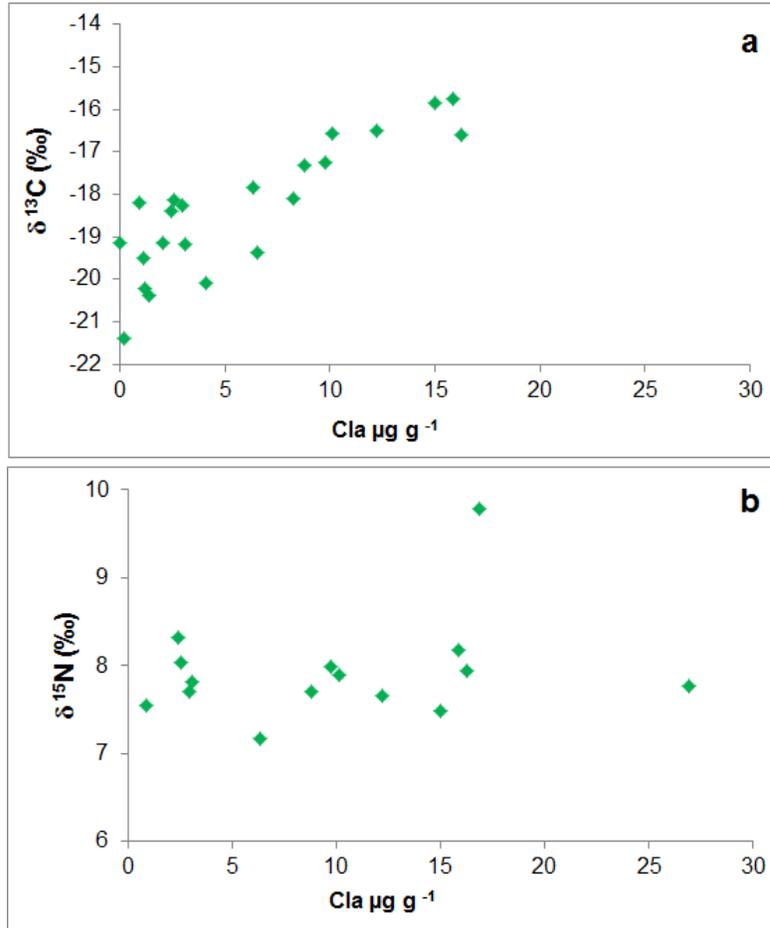


Fig. 5.18: a) $\delta^{13}\text{C}$ vs Cla (clorofila a) y b) $\delta^{15}\text{N}$ vs Cla para los sedimentos supramareales de Puerto Rosales.

Con el fin de inferir las posibles fuentes de materia orgánica de los sedimentos supramareales de Puerto Rosales, en la figura 5.19 se muestra la relación entre el $\delta^{13}\text{C}$ y el $\delta^{15}\text{N}$ para los tres sitios de estudio seleccionados y los valores reportados en la bibliográfica para las diferentes fuentes de materias orgánica.

De acuerdo a los resultados, la MO de los sedimentos supramareales es principalmente de origen autóctono con valores típicos de matas microbianas intactas (Al-Maslamani et al., 2009) y reciben un importante aporte por parte del fitoplancton marino que alcanza los sedimentos del fondo.

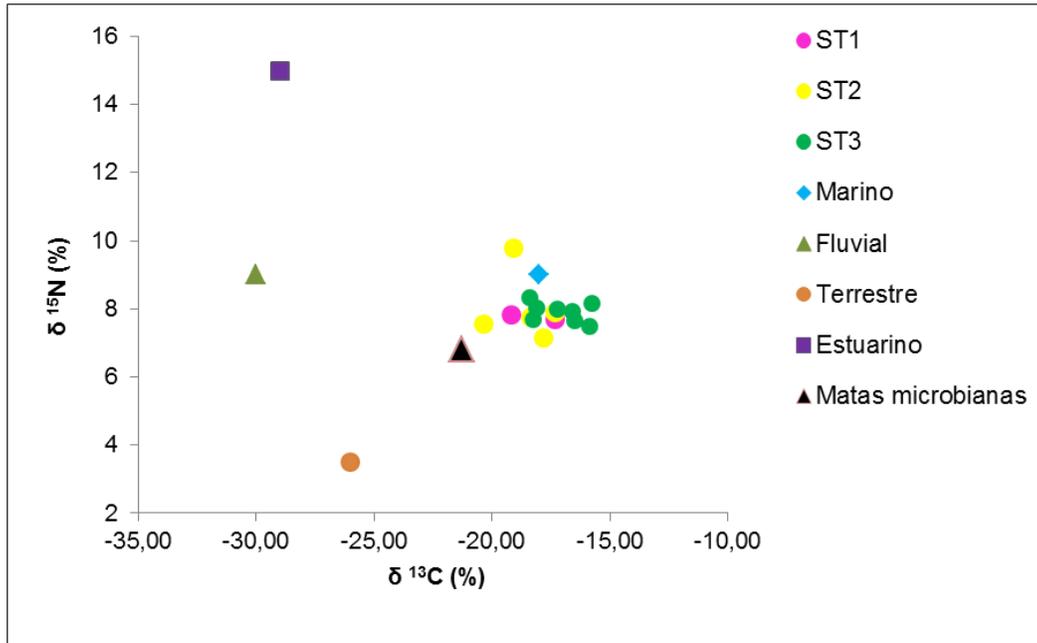


Fig. 5.19: Biplot $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ de los sedimentos supramareales de Puerto Rosales y posibles fuentes de materia orgánica (Los valores de referencia representados fueron tomados de Middelburg y Nieuwenhuize, 1998; Graham et al., 2001 y Al-Maslamani et al., 2009)

5.6. Conclusiones

De acuerdo a los datos analizados en este capítulo se pudieron establecer las siguientes conclusiones:

- ✓ Los NO_3^- o el NH_4^+ pueden ser la fracción predominante del DIN en agua intersticial de acuerdo a la fecha de muestreo analizada.
- ✓ El flujo de nutrientes entre la columna de agua y los sedimentos está relacionado más con el estado trófico que con el contenido de materia orgánica de los sedimentos.

- ✓ Las mayores concentraciones de NH_4^+ observadas en agua intersticial con respecto a años anteriores, muestra el continuo impacto antropogénico que sufre la zona de estudio.
- ✓ Si bien las concentraciones disponibles de NH_4^+ son elevadas, este es captado por el MPB pero incorporado lentamente y en muy bajas concentraciones, por lo cual la contribución del MPB al nitrógeno de los sedimentos es baja.
- ✓ Las relativamente bajas concentraciones de PO_4^{3-} detectadas estuvieron asociadas al consumo por parte del MPB durante su desarrollo y producción de las EPS, como así también a la incorporación del fosfato a los sedimentos.
- ✓ La concentración de nutrientes inorgánicos disueltos fue mayor en agua intersticial que superficial y estaría indicando un aporte de nutrientes desde los sedimentos a la columna de agua vía agua intersticial. Esto también refleja un importante acople bentónico-pelágico dentro de la zona de estudio.
- ✓ Las matas microbianas pueden ser consideradas una “fuente nueva” de nitrógeno inorgánico disuelto.
- ✓ La alta disponibilidad de nutrientes genera el ambiente propicio para la proliferación de las matas microbianas.
- ✓ La producción de *FC* y *FCAP* depende de los tipos de especies celulares presentes en la planicie de marea más que de la concentración de nutrientes disponibles
- ✓ La composición de monosacáridos de la *FC* indicó que durante el invierno de 2013, estos carbohidratos coloidales formaron parte de la fracción lábil de la materia orgánica con un bajo estado de degradación (indicado por sus altos porcentajes de glucosa) y constituyeron una fuente sustancial de carbono.
- ✓ La relación C:N fue cercana al valor de la relación de Redfield (5,7) indicado un origen autóctono de la materia orgánica y un importante aporte de carbono extracelular a los sedimentos de la planicie de marea.

- ✓ Los $\delta^{13}\text{C}$ y la relación C:N indicaron un aporte de materia orgánica de origen marino y una baja contribución de la de origen terrestre.
- ✓ Los $\delta^{15}\text{N}$ indicaron un importante aporte de NH_4^+ proveniente de la descarga cloacal y la existencia de incorporación de N_2 requerido para el crecimiento de las cianobacterias.
- ✓ La materia orgánica de los sedimentos supramareales de Puerto Rosales son de origen autóctono con un importante aporte por parte del MPB que conforman las matas microbianas y también reciben el aporte por parte del fitoplancton marino que alcanza los sedimentos del fondo.

Consideraciones finales

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la dinámica de clorofila a, materia orgánica y nutrientes inorgánicos disueltos en Puerto Rosales, en la planicie de marea de la zona media del estuario de Bahía Blanca (EBB).

En un principio se realizó un reconocimiento de campo y la evaluación de las condiciones fisicoquímicas que caracterizaban a los sedimentos supramareales. La planicie de marea se comportó como un ambiente extremo con cambios importantes de temperatura a lo largo del año y la frecuencia de inundación a la que se ve sometida, la cual provoca cambios en la salinidad. Cabe aclarar, que este último parámetro no fue medido durante el desarrollo de esta tesis. La salinidad es un factor muy importante y que debería medirse considerando que puede ejercer un fuerte *stress* sobre el MPB y así modificar su composición, de acuerdo a la capacidad de adaptación de las especies que lo conforman.

El contenido de humedad y materia orgánica de los sedimentos se vieron influenciados no sólo por la granulometría de los sedimentos en cada uno de los sitios estudiados, sino también por la frecuencia de inundación, las velocidades de evaporación/disección, la actividad del cangrejo *Neohelice granulata* y la mayor productividad de los microorganismos bentónicos.

Al contrario de lo que se esperaba, el pH, el potencial redox y la temperatura de los sedimentos no marcaron diferencias entre los sitios. Los valores medidos indicaron que todos los sedimentos fueron reducidos, siendo probablemente el Fe (III) la especie aceptora de electrones.

Los sedimentos de la zona media del EBB presentaron valores máximos de Cla principalmente durante la época invernal en los dos muestreos llevados a cabo a lo largo de esta tesis. Esto fue coincidente con el *bloom* fitoplanctónico que se presenta en la columna en la misma época del año. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron distintos en comparación a los reportados en años anteriores, demostrando que durante un ciclo anual de formación se pueden hallar matas microbianas de diferente espesor y maduración (edad). Las matas microbianas en algunos sitios pueden ser completamente destruidas por las fuerzas de la naturaleza dejando el sedimento desnudo en el cual una

nueva mata se desarrolla, mientras otras pueden crecer sobre la superficie de matas viejas de manera similar a los estromatolitos.

Por otro lado, se observaron máximas concentraciones de carbohidratos extracelulares cuando las concentraciones de Cl_a fueron elevadas, lo que demostró la estrecha relación que existe entre el proceso de fotosíntesis llevado a cabo por el MPB y la excreción de las EPS. Además, se determinó que la producción de FC y $FCAP$ depende principalmente de las especies celulares presentes, más que de la concentración de nutrientes, y estaría siendo llevada a cabo a través de procesos metabólicos similares.

Las correlaciones halladas entre el contenido de Cl_a y las diferentes fracciones de carbohidratos extracelulares en ST1, ST2 y ST3, reflejaron la existencia de diferentes poblaciones microbianas en los sedimentos de cada sitio. Esto resalta la importancia y necesidad de determinar la composición del MPB, como así también la presencia de bacterias heterótrofas involucradas en la degradación de la materia orgánica, en investigaciones futuras.

De los tres sitios analizados, ST3 fue el único que mantuvo un comportamiento similar al de una mata microbiana epibentónica, las cuales son perennes y no se descomponen durante las estaciones cálidas (primavera-verano). Esto se debió a que ST1 y ST2 han sido progresivamente colonizados por cangrejos cavadores, los cuales tienen una intensa actividad en verano, produciendo la remoción de sedimento y la desintegración de las matas.

La alta disponibilidad de nutrientes genera el ambiente propicio para la proliferación de las matas microbianas en la zona media del EBB. Se observó que la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos fue mayor en agua intersticial que superficial y estaría indicando un aporte de nutrientes desde los sedimentos a la columna de agua vía agua intersticial y un importante acople bentónico-pelágico dentro de la zona de estudio.

A lo largo de los distintos capítulos de esta tesis se presentaron diferentes relaciones y trazadores naturales que pueden ser utilizados para determinar el origen y composición de la materia orgánica de los sedimentos.

La composición de monosacáridos de la *FC* y la relación C:N indicaron que durante el invierno de 2013, estos carbohidratos coloidales formaron parte de la fracción lábil de la materia orgánica con un bajo estado de degradación (indicado por sus altos porcentajes de glucosa) y constituyeron una fuente sustancial de carbono. Esto, además, es coincidente con lo expuesto en el capítulo 4, donde se observó claramente que la concentración de *FC* disminuye bruscamente luego del periodo de producción invernal (probablemente debido al consumo por parte de los microorganismos), mientras que la *FCAP* que representa la fracción más refractaria permanece casi inalterada.

Los $\delta^{13}\text{C}$ y la relación C:N, cercana al valor de la relación de Redfield (5,7), indicaron un origen autóctono de la materia orgánica con un importante aporte marino y una baja contribución de la de origen terrestre. Esto a su vez, coincide con las relaciones $\text{Cl}/\text{Feop} < 1$ observadas que indicaron que los sedimentos superficiales de la planicie de marea contienen un elevado contenido de detritos provenientes de la columna de agua, probablemente debido a la alta turbidez, la contaminación química y a otros factores que afectan el potencial fotosintético de los productores primarios.

Los $\delta^{15}\text{N}$ junto con las relaciones Cl/MO indicaron un importante aporte de NH_4^+ proveniente de la descarga cloacal y la existencia de incorporación de N_2 requerido para el crecimiento de las cianobacterias. Además, las mayores concentraciones de NH_4^+ observadas en agua intersticial con respecto a años anteriores, mostraron el continuo impacto antropogénico que sufre la zona de estudio.

Por lo tanto, los sedimentos supramareales de Puerto Rosales estuvieron formados por una mezcla de materia orgánica de origen tanto autóctono como alóctono y constituida principalmente por compuestos lábiles durante la época invernal y más degradada o refractaria durante el resto del año

Bibliografía

- Abed RM, Kohls K, Schoon R, Scherf AK, Schacht M, Palinska KA, Al-Hassani H, Hamza W, Rullkotter J, Golubic S (2008) Lipid biomarkers, pigments and cyanobacterial diversity of microbial mats across intertidal flats of the arid coast of the Arabian Gulf (Abu Dhabi, UAE). *FEMS Microbiol Ecol* 65: 449-462.
- Adams DD (1994) Sediment Pore Water Sampling. En: *Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling: Second Edition*, CRC Press: 171-202.
- Agogué H, Mallet C, Orvain F, De Crignis M, Mornet F, Dupuy C (2014) Bacterial dynamics in a microphytobenthic biofilm: A tidal mesocosm approach. *Journal of Sea Research* 92: 36-45
- Albersheim PDJ, Nevins PDE, Karr A (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res.* (5): 340-345
- Allen MM, Smith AJ (1969) Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Mikrobiol* 69: 114-120
- Aller R C (1982) The effects of macrobenthos on chemical properties of marine sediment and overlying water. In *Animal-sediment relations* (pp. 53-102). Springer US.
- Al-Maslmani I, Le Vay L, Kenned H (2009) Feeding on intertidal microbial mats by postlarval tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Mar Biol* 156: 2001–2009
- Al-Raei AM, Al-Najjar M, Al-Thani RF (2012) Pore water gradients below microbial mat surface of Umm Alhool sabkha in Qatar. Conference paper (DOI: 10.5339/qfar.2012.EEP14)
- Al-Thani R, Al-Najjar MAA, Al-Raei AM; Ferdelman T, Thang NM, Al-Shaikh I; Al-Ansi M, de Beer D (2014) Community Structure and Activity of a Highly Dynamic and Nutrient-Limited Hypersaline Microbial Mat in Um Alhool Sabkha, Qatar. *PLoS ONE* 9(3): e92405. doi:10.1371/journal.pone.0092405
- APHA, AWWA, WEF, (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds.), 20th Edition, American Public Health Association, Washington, USA, 996 pp.
- Arndt S, Jørgensen BB, LaRowe DE, Middelburg JJ, Pancost RD, Regnier P (2013). Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: a review and synthesis. *Earth-Sci. Rev.* 123: 53–86

- Aslam SN, Cresswell-Maynard T, Thomas DN, Underwood GJC (2012) Production and characterization of the intra- and extracellular carbohydrates and polymeric substances (EPS) of three sea-ice diatom species, and evidence for a cryoprotective role for EPS. *J. Phycol.* 48: 1494–1509
- Atlas RM, Bartha R (2002) *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Education, S.A., Madrid
- Bally, G., Mesnage, V., Deloffre, J., Clarisse, O., Lafite, R., Dupont, J.-P., 2004. Chemical characterization of pore waters in an intertidal mudflat of the Seine estuary: relationship to erosion–deposition cycles. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 163-173
- Barnech Bielsa G, Popivich CA, Rodríguez MC, Martínez AM, Martín LA, Matulewicz MC, Leonardi PI (2016). Simultaneous production assesment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cinta*. *Algal Research*15: 120-128
- Bar-Or Y, Shilo M (1987) Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC 6720. *Appl Environ Microbiol* 53: 2226-2230
- Bar-Or Y, Shilo M (1988) The role of cell-bound flocculants in coflocculation of benthic cyanobacteria with clay particles. *FEMS Microbiol Ecol* 53: 169-174
- Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. *Cell* 125 (2): 237-246
- Bauersachs T, Compaore J, Severin I, Hopmans EC, Schouten S, Stal LJ, Sinninghe Damste JS (2011) Diazotrophic microbial community of coastal microbial mats of the southern North Sea. *Geobiology*9: 349-359.
- Baumgartner LK, Reid RP, Dupraz C, Decho AW, Buckley DH, Spear JR, Przekop KM, Visscher PT (2006) Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185: 131-145
- Bebout BM, Garcia-Pichel F (1995) UV b-induced vertical migrations of Cyanobacteria in a microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 61: 4215-4222
- Bebout BM, Paerll HW, BaueJE, Canfield DE, Des Marais DJ (1994) Nitrogen cycling in microbial mat communities: The quantitative importance of N-fixation and other sources of N for primary productivity. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 265-271
- Beigt D (2006) Balance energético de las planicies de marea del estuario de Bahía Blanca. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur

- Bellinger BJ, Abdullahi AS, Gretz MR, Underwood GJC (2005) Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat. Microb. Ecol.* 38: 169-180
- Bellinger BJ, Underwood GJC, Ziegler SE, Gretz MR (2009) Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. *Aquat Microb Ecol* 55: 169-187
- Bender J, Rodriguezeaton S, Ekanemesang UM, Phillips P (1994) Characterization of metal-binding biofloculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2311-2315
- Bendschneider K, Robinson RJ (1952) A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research* 11: 87-96.
- Benitez-Nelson CR (2000) The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Sci. Rev.* 51, 109–135.
- Bhaskar PV, Bhosle NB (2005) Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, 88 (1): 45-43.
- Bolhuis H, Fillingner L, Stal LJ (2013) Coastal microbial mat diversity along a natural salinity gradient. *PLoS One* 8 (5): 1-12
- Bolhuis H, Cretoiu MS, Stal, LJ (2014) Molecular ecology of microbial mats, Minireview. *FEMS Microbiol Ecol* 90: 335-350.
- Borovec J, Sirová D, Mosnerová P, Rejmánková E, Vrba J (2010) Biogeochemistry: DOI 10.1007/s10533-010-9488-4.
- Borum J (1996) Shallow waters and land/sea boundaries. In: Richardson, K., Jorgensen, B.B. (Eds.), *Eutrophication in Coastal Marine Ecosystems*. American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 179–204
- Bournod CN, Cuadrado D, Carmona NB, Ponce JJ, Pan J (2013) Estructuras sedimentarias inducidas por actividad microbiana (ESIAM) en la planicie de marea de Puerto Rosales, estuario de Bahía Blanca. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 71(3): 33 -344
- Brito A, Newton A, Tett P, Fernandes TF (2009) Development of an Optimal Methodology for the Extraction of Microphytobenthic Chlorophyll. *J. Int. Environmental Application & Science* 4 (1): 42-54
- Buhl-Mortensen L (1996) Amphipod fauna along offshore-fjord gradient. *Journal of Natural History* 30: 23-49

- Bühning SI, Kamp A, Wörmer L, Ho S, Hinrichs KU (2014) Functional structure of laminated microbial sediments from a supratidal sandy beach of the German Wadden Sea (St. Peter-Ording). *Journal of Sea Research* 85: 463-473.
- Caiola MG, Billi D, Friedmann EI (1996) Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *Eur J Phycol* 31:99–105
- Canfield DE, Des Marais DJ (1991) Aerobic sulfate reduction in microbial mats. *Science* 251: 1471-1473.
- Cameron WM, Pritchard DW (1963) Estuaries. In: Hill MN (ed.) *The Sea*, vol. 2, John Wiley and Sons, New York.
- Carlier A, Riera P, Amouroux JM, Bodiou JY, Desmalades M, Grémare A (2008) Food web structure of two Mediterranean lagoons under varying degree of eutrophication. *Journal of Sea Research* 60: 264-275
- Cartaxana P, Mendes CR, van Leeuwe MA, Brotas V (2006) Comparative study on microphytobenthic pigments of muddy and sandy intertidal sediments of the Tagus estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66: 225-230
- Castenholz RW (1994) Microbial mat research: The recent past and new perspectives. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 3-18
- Caçador I, Costa AL, Vale C (2004) Carbon Storage in Tagus Salt Marsh Sediments. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus* 4 (2): 701-714
- Chapman PM, Wang F (2001) Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 3–22
- Christie MC, Dyer KR, Blanchard G, Gramp A, Mltchener HJ, Paterson DM (2000). Temporal and spatial distribution of moisture and organic contents across a macrotidal mudflat. *Continental Shelf Research* 20: 1219-1241
- Christensen BE, Characklis WC (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis WG, Marshall KC (eds.): *Biofilms*. John Wiley, New York pp 93-130
- Cook PLM, Revill AT, Clementson LA, Volkman JK (2004) Carbon and nitrogen cycling on intertidal mudflats of a temperate Australian estuary. III. Sources of organic matter. *Mar Ecol Prog Ser* 280: 55-72
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745
- Cronk JK, Fennessy MS (2001) *Wetland Plants: Biology and Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida

- CTE (Comité Técnico Ejecutivo), 2003. Programa integral de monitoreo Bahía Blanca. WWWpage.<http://www.bahiablanca.gov.ar/areas-degobierno/medioambiente/comite-tecnico-ejecutivo/>
- Cuadrado DG, Carmona NB, Bournod CN (2011) Biostabilization of sediments by microbial mats in a temperate siliciclastic tidal flat, Bahía Blanca estuary (Argentina). *Sed Geol* 237: 95-101
- Cuadrado DG, Ginsberg SS, Gómez EA (2004) Geomorfología. En: Piccolo MC, Hoffmeyer MS (eds.). Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, pp 29-42.
- Cuadrado DG, Pan J, Gómez EA, Maisano L (2015) Deformed microbial mat structures in a semiarid temperate coastal setting. *Sedimentary Geology* (325): 106-118
- Cuadrado DG, Perillo GME, Vitale AJ (2014). Modern microbial mats in siliciclastic tidal flats: evolution, structure and the role of hydrodynamics. *Marine Geology* 352: 367-380
- Cuadrado DG, Pizani NV (2007) Identification of microbially induced sedimentary structures over a tidal flat. *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis* 14: 105-116
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* 182 (12): 3593-3596
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Sci*: 280 (5361): 295- 298
- DeBusk WF (1999) Nitrogen Cycling in Wetlands. Soil and Water Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science (IFAS), University of Florida. <<http://edis.ifas.ufl.edu>>.
- De Beer D, Stoodley P (2013) In: E. Rosenberg et al. (eds.) *The Prokaryotes – Applied Bacteriology and Biotechnology*, DOI 10.1007/978-3-642-31331-8_32
- De Beer D, Sweerts JPRA (1989) Measurements of nitrate gradients with an ionselective microelectrode. *Anal Chim Acta* 219: 351-356
- de Brouwer JFC, de Deckere EMGT, Stal LJ (2003) Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 313-324

- de Brouwer JFC, Stal LJ (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Marine Ecology Progress Series* 218: 33-44
- de Brouwer JFC, Neu TR, Stal LJ (2006). On the function of secretion of extracellular polymeric substances by benthic diatoms and their role in intertidal mudflats: A review of recent insights and views. In: Kromkamp JC, de Brouwer JGC, Blanchard GF, Forster RM, Créach V (Eds) *Functioning of microphytobenthos in estuaries*, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Amsterdams, The Netherlands. pp 45-61
- de Brouwer JFC, Wolftein K, Ruddy GK, Jones TER, Stal LJ (2005) Biogenic Stabilization of Intertidal Sediments: The importance of Extracellular Polymeric Substances Produce by Benthic Diatoms. *Microbial Ecology* 49: 501-512
- de Deckere EMGT, Kornmanh BA, Staats N, Termaath GR, de Winder B, Stal LJ, Heipa CHR (2002) The seasonal dynamics of benthic (micro) organisms and extracellular carbohydrates in an intertidal mudflat and their effect on the concentration of suspended sediment. In: Winterwerp JC and Kranenburg C (eds) *Fine Sediment Dynamics in the Marine Environment*. Elsevier Science B.V. pp 429-440
- de Winder B, Staats N, Stal LJ, Paterson DM (1999) Carbohydrate secretion by phototrophic communities in tidal sediments. *J Sea Res* 42: 131-146
- Dean WE (1974) Determination of Carbonate and Organic Matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: Comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Petrology* 44: 242-248
- Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 28: 73-153
- Decho AW (1994) Exopolymers in microbial mats: Assessing their adaptive roles. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 215-219
- Decho AW (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* (20): 1257-1273.
- Decho AW (2010) Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? *Ecological Engineering* 36: 137-144
- Decho AW, Sean Norman R, Visscher PT (2010) Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends in Microbiology* 18 (2): 73-80

- Decho AW, Visscher PT, Reid RP (2005) Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogr Palaeoclim Palaeoecol* 219:71-86
- DeLaune RD, Reddy KR (2005) Redox Potential. In Hillel D (ed) *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Academic Press. pp 366-371
- Dell'Anno A, Mei ML, Pusceddu A, 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.
- Demergasso C, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Martínez-Alonso M, Esteve I (2003) Tapetes microbianos del Salar de Llamará, norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 485-499
- Des Marais DJ (2010) Marine hypersaline microcoleus-dominated cyanobacterial mats in the saltern at guerrero negro, Baja California sur, México: a system-level perspective. In: Seckbach J, Oren A (eds.) *Microbial Mats. Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer, Dordrecht, pp. 403-420
- Des Marais DJ, Canfield DE (1994) The carbon isotope biogeochemistry of microbial mats. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 289-298
- Di Bonito M (2005) Trace Elements in Soil Pore Water: A Comparison of Sampling Methods. Tesis Doctoral, Universidad de Nottingham (<http://etheses.nottingham.ac.uk/archive/00000123/>)
- Di Bonito M, Breward N, Crout N, Smith B, Young S (2008) Overview of selected soil pore water extraction methods for the determination of potentially toxic elements in contaminated soils: operational and technical aspects. In: De Vivo B, Belkin HE, Lima A (eds.) *Environmental Geochemistry: Site Characterization, Data Analysis and Case Histories*, Elsevier, Amsterdam, pp. 213–249.
- Dijkman NA, Boschker HTS, Stal LJ, Kromkamp JC (2010) Composition and heterogeneity of the microbial community in a coastal microbial mat as revealed by the analysis of pigments and phospholipid-derived fatty acids. *J Sea Res* 63: 62-70.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356
- Dubois S, Savoye N, Grémare A, Plus M, Charlier K, Beltoise A, Blanchet H (2012) Origin and composition of sediment organic matter in a coastal semi-enclosed ecosystem: An elemental and isotopic study at the ecosystem space scale. *Journal of Marine Systems* 9: 64-73

- Dupraz C and Visscher PT (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* 13: 429-438
- Dupré LS (2012) Producción de exopolisacáridos en la planicie intermareal de Puerto Cuatrerros. Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur.
- Eberlein K, Kattner G (1987) Automatic method for determination of orthophosphate and total dissolved phosphorus in the marine environment. *Fresenius. Z Anal Chem.*, 326: 354-357.
- Edgcomb VP, Bernhard JM, Summons RE, Orsi W, Beaudoin D, Visscher PT (2014) Active eukaryotes in microbialites from Highborne Cay, Bahamas, and Hamelin Pool (Shark Bay), Australia. *ISME J* 8: 418-429
- Engelsen A, Hulth S, Pihl L, Sundbäck K (2008). Benthic trophic status and nutrient fluxes in shallow-water sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 78: 783– 795
- Esteve I, Martínez-Alonsol M, Mirl J, Guerrero R (1992). Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain: a preliminary study. *Limnetica* 8: 185-195
- Faganeli J, Ogrinc N, Kukovec K, Falnoga I, Mozetic P, Bajt O (2009) Carbon and nitrogen isotope composition of particulate organic matter in relation to mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Marine Chemistry* 114: 102-109
- Fan H, Bolhuis H, Stal LJ (2015) Denitrification and the denitrifier community in coastal microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology* (91): 1-11
- Farooq S, Siddiqui PJA (2011) Distribution of chlorophyll in the mangrove sediments of Sonmiani Bay, Pakistan. *Pak. J. Bot.* 43(1): 405-410
- Feazel LM, Spear JR, Berger AB, Harris JK, Frank DN, Ley RE, Pace NR (2008) Eucaryotic diversity in a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 74: 329-332
- Fenchel T (1998) Formation of laminated cyanobacterial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 235-240.
- Fernández EM, Garzón Cardona JE, Martínez AM, Spetter CV, Freije RH, Marcovecchio JE (2014) Estimación de la productividad primaria del fitoplancton en la zona interna del estuario de bahía blanca (Argentina). En: Marcovecchio JE, Botté SE, Freije RH (eds) *Procesos geoquímicos superficiales en Iberoamérica*. Red RiFyQA, Nueva Graficesa, S.L. España pp 261-276
- Frankz J and Stolz JF (2009) Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Science Reviews* 96: 163-172

- Freije RH, Asteasuain RO, Schmidt AS, Zavatti JR (1981). Relación de la salinidad y temperatura del agua con las condiciones hidrometeorológicas en la porción interna del estuario de Bahía Blanca. *Contr. Cient. IADO*. N° 57, 12pp
- Freije RH, Zavatti JR, Gayoso AM, Asteasuain RO (1980) Producción Primaria, pigmentos y fitoplancton del Estuario de Bahía Blanca. 1) Zona Interior. *Contr. Cient. IADO*. N° 46, 14pp.
- Freije RH, Marcovecchio JE (2004) Oceanografía Química. En: Piccolo MC, Hoffmeyer MS (eds.) Ecosistema del estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina pp 69-78
- Freije RH, Spetter CV, Marcovecchio JE, Popovich CA, Botté SE, Negrín V, Arias A, Delucchi F, Asteasuain RO (2008) In: Neves R, Barreta J, Mateus M (eds) Perspectives on integrated coastal zone management in South America. IST Press Lisbon, Portugal, pp 243-256.
- Fuqua WC, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (3): 685-695
- Galloway JN (2005) The global nitrogen cycle: past, present and future. *Sci. China, Ser. C Life Sci.* 48: 669-678
- Gao X, Yang Y, Wang C (2012) Geochemistry of organic carbon and nitrogen in surface sediments of coastal Bohai Bay inferred from their ratios and stable isotopic signatures. *Marine Pollution Bulletin* 64: 1148-1155
- Gardolinski PCF, Hanrahan G, Achterberg EC, Gledhill M, Tappin AD, House WA, Worsfold PJ (2001) Comparison of sample storage protocols for the determination of nutrients in natural waters. *Water Research* 35 (15): 3670-3678.
- Gelós EM, Marcos AO, Espagnuolo JO, Schilizi RA (2004) Textura y minerología de sedimentos. En: Piccolo MC, Hoffmeyer MS (eds) Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, pp 43-50
- Gerdes G, Klenke T, Noffke N (2000) Microbial signatures in peritidal siliciclastic sediments: a catalogue. *Sedimentology* 47: 279-308
- Gerdes G (2010) What are microbial mats? In: Seckbach J, Oren A (eds.) *Microbial Mats. Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer, Dordrecht, pp. 5-28

- Gihring TM, Humphrys M, Mills HJ, Huettel M, Kostka JE (2009) Identification of phytodetritus-degrading microbial communities in sublittoral Gulf of Mexico sands. *Limnol. Oceanogr.* 54: 1073-1083
- Gilhooly W, Carney RS, Macko SA (2007) Relationships between sulfide-oxidizing bacterial mats and their carbon sources in northern Gulf of Mexico cold seep. *Organic Geochemistry* 38: 380-393
- Giroldo D, Viera AAH, Paulsen BS (2003) Relative increase in deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide release by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (*Bacillariophyceae*). *J. Phycol.* 39: 1109-1115
- Gobet A, Boer SI, Huse SM, van Beusekom JE, Quince C, Sogin ML, Boetius A, Ramette A (2012) Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *ISME J* 6: 542-553
- Goto N, Mitamura O, Terai H (2001) Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257: 73-86
- Graham MC, Eaves MA, Farmer JG, Dobson J, Fallick AE (2001) A Study of Carbon and Nitrogen Stable Isotope and Elemental Ratios as Potential Indicators of Source and Fate of Organic Matter in Sediments of the Forth Estuary, Scotland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52: 375-380
- Guerrero R, Piqueras M, Berlanga M (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol* 5: 177-188
- Guinder VA, López-Abbate MC, Berasategui A, Negrin VL, Zapperi G; Pratolongo P; Fernández Severini M, Popovich C (2015). Influence of the winter phytoplankton bloom on the settled material in a temperate shallow estuary. *Oceanologia* 57: 50-60
- Graf G, Schulz R, Peinert R, Meyer-Reil LA (1983) Benthic response to sedimentation events during autumn to spring at a shallow water station in Western Kiel Bay I. Analysis of processes on a community level. *Mar. Biol.* 77: 235-246
- Grasshoff K (1976) Filtration and Storage. In: *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, New York: 21-24.
- Grasshoff K, Erhardt M, Kremling K (1983) *Methods of Seawater Analysis*, 2nd Edition, Verlag-Chemie, Weinheim: 365-366.
- Hanlon ARM, Bellinger B, Haynes K, Xiao G, Hofmann TA, Gretz MR, Ball AS, Osborn AM, Underwood GJC (2006) Dynamics of extracellular polymeric substance (EPS)

- production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microalgal biofilm over a tidal emersion–immersion period. *Limnol. Oceanogr.* 51(1): 79–93
- Haynes K, Hofmann TA, Smith CJ, Ball AS, Underwood GJC, Osborn AM (2007) Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6112-6124
- Heip CHR, Goosen NK, Herman PMJ, Kromkamp J, Middleburg J1, Soetaert K (1995) Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 33: 1-149
- Henriques Vieira AA, Coelho Ortolano PI, Girollo D, Dellamano Oliveira MJ, Bittar TB, Lombardi AT, Sartori AL, Paulsen BS (2008) Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulate* (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* 53: 1887-1899.
- Herbert RA (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 563-590
- Herbert RA, Welsh DT (1994) Establishment of phototrophic purple sulphur bacteria in microbial mat systems. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 51-60
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC (1993) Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology* 29: 537-566
- Hochard S, Pinazo C, Grenz C, Burton Evans JL, Pringault O (2010) Impact of microphytobenthos on the sediment biogeochemical cycles: A modeling approach. *Ecological Modelling* 221: 1687-1701
- Hoehler TM (2004) Biological energy requirements as quantitative boundary conditions for life in the subsurface. *Geobiology* 2: 205 – 215
- Hofmann T, Hanlon ARM, Taylor JD, Ball AS, Osborn AM, Underwood GJC (2009) Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 379: 45-58.
- Hubas C, Jesus B, Passarelli C, Jeanthon C (2011) Tools providing new insight into coastal anoxygenic purple bacterial mats: review and perspectives. *Research in Microbiology* 162: 858-868
- InfoStat® (versión 2016). Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Joseph MM, Ratheesh Kumar CS, Greesh Kumar TR, Renjith KR, Chandramohanakumar N (2008). Biogeochemistry of surficial sediments in the intertidal systems of a tropical environment. *Chemistry and Ecology* 24: 247-258.
- Joye SB, Paerl HW (1994) Nitrogen cycling in microbial mats: rates and patterns of denitrification and nitrogen fixation. *Marine Biology* 119: 285-295
- Jørgensen BB (1994) Diffusion processes and boundary layers in microbial mats. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 243-253
- Kelly JA, Honeywill C, Paterson DM (2001) Microscale analysis of chlorophyll-a in cohesive, intertidal sediments: the implication of microphytobenthos distribution. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 81:151-162
- Kennedy P, Kennedy H, Papadimitriou S (2005). The effect of acidification on the determination of organic carbon, total nitrogen and their stable isotopic composition in algae and marine sediment. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 1063–1068
- Klock JH, Wieland A, Seifert R, Michaelis W (2007) Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimization. *Mar Biol* 152: 1077-1085
- Konhauser K (2007). *Introduction to Geomicrobiology*. Blackwell, UK.
- Koroleff F (1969) Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Int. Con. Explor. Sea, C.M./C*: p. 9.
- Krumbein WE, Cohen Y, Shilo M (1977) Solar Lake (Sinai): 4. Stromatolitic cyanobacterial mats. *Limnology and Oceanography* 22: 635-656.
- Krumbein W (1994) Paracelsus und die muciliginischen Substanzen – 500 Jahre EPS-Forschung. *Deutsche Gesellschaft für Mikrobiologie*:8–14
- La Colla N, Franco F, Serra A, Negri V, Gomes de Almeida M, Marcovecchio J, Rezende C, Botté S (2014) Saltmarshes: An approach to organic matter contribution in sediments through isotopic signature. En Massone H, Miglioranza K (eds), *Libro de resúmenes de la III Reunión de Geoquímica de la Superficie (III RAGSU) Terminal gráfica, Mar del Plata (ISBN: 978-987-544 597-0)*
- La Colla NS, Negrin VL, Marcovecchio JE, Botté SE (2015) Dissolved and particulate metals dynamics in a human impacted estuary from the SW Atlantic. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 166: 45-55
- Lange W (1976) Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Can J Microbiol* 22:1181-1185

- Lawrence J, Neu T, Swerhone G (1998) Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *J Microbiol Methods* (32): 253-261
- Lehmann M, Wöber G (1976) Accumulation, mobilization and turnover of glycogen in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol* 111: 93-97
- Lembre P, Lorentz C, Di Martino P (2012) Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. INTECH <http://dx.doi.org/10.5772/51213>
- Lencina MMS (2007) Productividad primaria del fitobentos del estuario de Bahía Blanca, Puerto Cuatros. Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur
- Lessen AE (2006) Sediment organic matter composition and dynamics in San Francisco Bay, California, USA: Seasonal variation and interactions between water column chlorophyll and the benthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66: 501-512
- Lillebø, A.I., Flindt, M.R., Pardal, M.A., Marques, J.C., 2006. The effect of *Zostera noltii*, *Spartina maritima* and *Scirpus maritimus* on sediment pore-water profiles in a temperate intertidal estuary. *Hydrobiologia* 555: 175–183.
- Liu M, Hou LJ, Xu SY, Ou DN, Yang Y, Yu J, Wang Q (2006) Organic carbon and nitrogen stable isotopes in the intertidal sediments from the Yangtze Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1625-1633
- Lock MA (1993) Attached microbial communities in rivers. In: Ford TE (ed). *Aquatic Microbiology: an Ecological Approach*. Blackwell Scientific Oxford. UK pp 113-138
- Lorenzen CJ (1967) Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12: 343-348
- Lovelock CE, Grinham A, Adame MF, Penros HM (2010) Elemental composition and productivity of cyanobacterial mats in an arid zone estuary in north Western Australia. *Wetlands Ecol Manage* 18: 37-47
- MacIntyre HL, Geider RJ, Miller DC (1996) Microphytobenthos: the ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I: distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19: 186-201
- McDonald RW, McLaughlin FA (1982) The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. *Water Resource Res.* 29: 95-104.
- McGlathery KJ, Sundbäck K, Anderson IC (2004) The importance of primary producers for benthic nitrogen and phosphorus cycling. In: Nielsen LS, Banta GT, Pedersen MF (eds) *Estuarine Nutrient Cycling: The Influence of Primary Producers. The Fate of Nutrients and Biomass*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands pp 231-261.

- McKew BA, Dumbrell AJ, Taylor JD, McGenity TJ, Underwood GJC (2013) Differences between aerobic and anaerobic degradation of microphytobenthic biofilm-derived organic matter within intertidal sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 84: 495-509
- Marcovecchio J, Spetter C, Botté S, Delucchi F, Arias A, Fernández Severini M, Negrin V, Popovich C, Freije RH (2009) Tidal time-scale variation of inorganic nutrients and organic matter in Bahía Blanca mesotidal estuary, Argentina. *Chemistry and Ecology* 25 (6): 453-465
- Margalef R (1980) *Ecología*. Omega (Ed.) Barcelona: 21 – 22.
- Martin JB, Hartl KM, Corbett DR, Swarzenski PW, Cable JE (2003) A multilevel pore-water sampler for permeable sediments. *J. Sediment. Res.* 73: 128-132
- Mateus M, Mateus S, Baretta J (2008) Basic concepts of estuarine ecology. In: Neves R, Barreta J, Mateus M (eds) *Perspectives on integrated coastal zone management in South America*. IST Press Lisbon, Portugal, pp 3-14.
- Melo WD, Limbozzi F (2008). Geomorphology, hydrological systems and land use of Bahía Blanca estuary region. In: Neves, R., Baretta, J., Mateus, M. (eds.) *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America*. IST Scientific Publishers, Lisbon, Portugal, pp. 317–333
- Mendez Casariego A, Luppi T, Iribarne O, Daleo P (2011) Increase of organic matter transport between marshes and tidal flats by the burrowing crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 40: 110-117
- Middelburg JJ, Barranguet C, Boschker HTS, Herman PMJ, Moens T, Heip CHR (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: an in situ ¹³C-labeling study. *Limnol. Oceanogr.* 45:1224-1234
- Middelburg JJ, Nieuwenhuize J (1998) Carbon and nitrogen stable isotopes in suspended matter and sediments from the Schelde Estuary. *Marine Chemistry* 60: 217–225
- Mills EL (1975) Benthic organisms and the structure of marine ecosystems. *J. Fish. Res. Bd Can.* 32: 1657-1663
- Mir J, Martinez-Alonso M, Esteve I, Guerrero R (1991) Vertical stratification and microbial assemblage of a microbial mat in the Ebro Delta (Spain) *EMS Microbiology Ecology* 86: 59-68
- Monbet P, McKelvie ID (2007) Phosphates. In: Mollet, L. (Ed.) *Handbook of Water Analysis, Second Edition*, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York: 219-251.

- Moreno S, Niell FX (2004) Scales of variability in the sediment chlorophyll content of the shallow Palmones River Estuary, Spain. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 60: 49-57
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.
- Negrin VL, Spetter CV, Asteasuain RO, Perillo GME, Marcovecchio JE (2011). Influence of flooding and vegetation on carbon, nitrogen, and phosphorus dynamics in the pore water of a *Spartina alterniflora* salt marsh. *J. Environ. Sci.* 23: 212–221.
- Negrin VL, Spetter CV, Guinder VA, Perillo GME, Marcovecchio JE (2013) The role of *Sarcocornia perennis* and tidal flooding on sediment biogeochemistry in a South American wetland *Marine Biology Research* 9: 703-715
- Neu TR (1992) Microbial “footprints” and the general ability of microorganisms to label interfaces. *Can J Microbiol* 38: 1005-1008
- Neu TR (1994) Biofilms and microbial mats. In: Krumbein WE, Paterson D, Stal L (eds) *Biostabilization of sediments*
- Neu TR, Marshall KC (1990) Bacterial polymers: Physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J. Biomater. Appl.* 1990 5: 107-133.
- Niell FX (1980) Incidencias de vertidos industriales en la estructura de poblaciones intermareales. Algunas variables de los sistemas sedimentarios en el espacio. *Invest. Pesq.* 44: 337-345.
- Noffke N (2010) *Microbial Mats in Sandy Deposits from the Archean Era to Today*. Springer-Verlag, Berlin.
- Noffke N, Knoll AH, and Grotzinger J (2002) Sedimentary controls on the formation and preservation of microbial mats in siliciclastic deposits: a case study from the Upper Neoproterozoic Nama Group, Namibia. *Palaios* 17: 5–3
- Oakes JM, Eyre DB, Middelburg JJ, Boschkerb HTS (2010) Composition, production, and loss of carbohydrates in subtropical shallow subtidal sandy sediments: Rapid processing and long-term retention revealed by ¹³C-labeling. *Limnol. Oceanogr.* 55 (5): 2126–2138
- Orvain F, De Crignis M, Guizien K, Lefebvre S, Mallet C, Takahashi E, Dupuy C (2014) Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria, microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France) *Journal of Sea Research* 92: 6-18

- Ospina-Alvarez N, Caetano M, Vale C, Santos-Echeandía J, Bernárdez P, Prego R (2014). Exchange of nutrients across the sediment–water interface in intertidal ria systems (SWEurope). *J. Sea Res.* 85: 349–358.
- Paerl HW, Pinckney JL (1996) A Mini-review of Microbial Consortia: Their Roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. *Microb Ecol* 31: 225-247
- Pan J, Bournod CN, Cuadrado DG, Vitale A, Piccolo MC (2013a) Interaction between estuarine microphytobenthos and physical forcings: the role of atmospheric and sedimentary factors. *International Journal of Geosciences* 4 (2): 352-361
- Pan J, Bournod CN, Cuadrado DG (2014) An experimental study of the recolonization of siliciclastic tidal-flat sediments by microbial mats (Bahía Blanca estuary, Argentina). En Massone H, Miglioranza K (eds), Libro de resúmenes de la III Reunión de Geoquímica de la Superficie (III RAGSU) Terminal gráfica, Mar del Plata (ISBN: 978-987-544 597-0)
- Pan J, Bournod CN, Pizani NV, Cuadrado DG, Carmona NV (2013b) Characterization of Microbial Mats from a Siliciclastic Tidal Flat (Bahía Blanca Estuary, Argentina). *Geomicrobiology Journal* 30: 665-674
- Passarelli C, Meziane T, Thiney N, Boeuf D, Jesus B, Ruivo M, Jeanthon C, Hubas C (2015) Seasonal variations of the composition of microbial biofilms in sandy tidalflats: Focus of fatty acids, pigments and exopolymers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 153: 29-37
- Paterson DM, Crawford RM and Little C (1990) Subaerial exposure and changes in the stability of intertidal estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 30: 541-556
- Paterson DM, Yallop M, George C (1994) Stabilization. In: Krumbein WE, Paterson DM, Stal LJ (eds.) *Biostabilization of Sediments*. Oldenburg, BIS. Verlag pp 401–432
- Percuoco PV, Kalnejais LH, Officer LV (2015) Nutrient release from the sediments of the Great Bay Estuary, N.H. USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 161: 76-87
- Pérez AC (2013) Fraccionamiento de fósforo en sedimentos del Intermareal de la zona intermedia del estuario de Bahía Blanca (Puerto Rosales). Tesina de grado, Universidad Nacional del Sur.
- Perillo GME (1995a) Definitions and Geomorphologic Classifications of Estuaries. En: *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries. Developments in Sedimentology*. Perillo GME (ed.), Elsevier Science (53): 17-47

- Perillo GME (1995b) Geomorphology and sedimentology of estuaries: an introduction. In: Perillo GME (ed) Geomorphology and Sedimentology of Estuaries. Elsevier, Amsterdam, pp 1-16
- Perillo GME, Cuadrado DG (2013) Clasificación, Geomorfología y Sedimentología de estuarios en: Procesos Químicos en Estuarios. Marcovecchio J, Freije H (eds). edUTecNe, Bahía Blanca, Buenos Aires. (ISBN 978.987.1869-1-4)
- Perillo GME, Piccolo MC, Parodi E, Freije RH (2001) The Bahía Blanca Estuary, Argentina. In Seeliger U, Kjerfve B (eds) Coastal Marine Ecosystems of Latin America, Ecological Studies 144, Springer, Berlin pp 205-217
- Perillo GME, Piccolo MC, Palma ED, Pérez DE, Pierini JO (2004) Oceanografía Física. En: Piccolo MC, Hoffmeyer MS (eds.) Ecosistema del estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina pp 61-67
- Perillo GME, Pierini JO, Pérez DE, Piccolo MC (2005) Suspended sediments fluxes in the middle reach of the Bahía Blanca estuary, Argentina. In: FitzGerald DM, Knight J (eds) High Resolution Morphodynamics and Sedimentary Evolution of Estuaries. Springer Sci. Publ., Netherlands, pp 101-114
- Piccolo MC and Diez PG (2004) Meteorología del Puerto Coronel Rosales. In: Piccolo MC, Hoffmeyer M (eds) Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca, 3rd edn. Ediuns, Bahía Blanca, pp 87-91
- Piccolo MC, Perillo GME (1990) Physical characteristics of the Bahía Blanca estuary (Argentina). Estuarine, Coastal and Shelf Science 31: 303-317
- Piccolo MC, Perillo GM (1999) The argentinean estuaries: a review in Estuaries of South America: their geomorphology and dynamics. Perillo GM, Piccolo MC, Pino Quivira M (eds.). Berlin: Springer-Verlag. 223pp
- Piccolo MC, Perillo GME, Melo WD (2008) The Bahía Blanca estuary: an integrated overview of its geomorphology and dynamics. In: Neves R, Barreta J, Mateus M (eds) Perspectives on integrated coastal zone management in South America. IST Press Lisbon, Portugal, pp 219-229.
- Pierre G, Graber M, Rafiliposon BA, Dupuy C, Orvain F, De Crignis M, Maugard T (2012) Biochemical Composition and Changes of Extracellular Polysaccharides (ECPS) Produced during Microphytobenthic Biofilm Development (Marennes-Oléron, France). Microb Ecol. 63:157-169
- Pierre G, Zhao MJ, Orvain F, Dupuy C, Klein GL, Graberb M, Maugard T (2014) Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a

- diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). *Journal of Sea Research* 92: 26–35
- Pizani NV (2008) Valorización de las interacciones microfitorbentos – sedimentos en planicies de marea impactadas por el dragado hidráulico. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur
- Pinckney JL (1994) Development of an irradiance-based ecophysiological model for intertidal benthic microalgal production, In: Krumbein W, Paterson Dand, Stal L (eds) *Biostabilization of Sediments*, Universität Oldenburg, Oldenburg, Germany, pp 55-83
- Pinckney J, Paerl HW, Fitzpatrick M (1995) Impacts of seasonality and nutrients on microbial mat community structure and function. *Mar Ecol Prog Ser* 123: 207-216
- Pomeroy LR, Williams PJI, Azam F & Hobbie JE (2007) The microbial loop. *Oceanography* 20: 28–33.
- Popovich CA, Spetter CV, Marcovecchio JE, Freije RH (2008) Dissolved nutrient availability during winter diatom bloom in a turbid and shallow estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Journal of Coastal Reserch* 24 (1): 95-102 (DOI: 10.2112/06-0565.1)
- Popovich CA, Marcovecchio JE (2008) Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). *Continental Shelf Research* 28: 236–244
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58: 755-805
- Reddy KR, DeLaune RD (2008) *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*. CRC Press, Boca Raton
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN (ed) *The Sea* 2, Interscience, pp 26-77.
- Revsbech NP, Jørgensen BB, Blackburn TH, Cohen Y (1983) Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S and pH profiles of a microbial mat. *Limn. Oceanogr.* 28: 1062-1074
- Risatti JB, Capman WC, Stahl DA (1994) Community structure of a microbial mat: the phylogenetic dimension. *P Natl Acad Sci USA* 91: 10173-10177.
- Rossi F, De Philippis R (2015) Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats. *Life* 5: 1218-1238
- Rumolo P, Barra M, Gherardi S, Marsella E, Sprovieri M (2011) Stable isotopes and C/N ratios in marine sediments as a tool for discriminating anthropogenic impact. *J. Environ. Monit.* 13: 3399-3408

- Sánchez Palacios JT, Torres-Alvarado MR (2005) Estructura y aspectos biotecnológicos de las comunidades acuáticas microbianas: biopelículas y tapetes microbianos. *ContactoS* 58: 63 – 71.
- Sarbu SM, Vlasceanu L, Popa R, Sheridan P, Kinkle BK, Kane TC (1994) Microbial mats in a thermomineral sulfurous cave. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 45-50
- Scian B, Pierini J (2013) Variability and trends of extreme dry and wet seasonal precipitation in Argentina. A retrospective analysis. *Atmósfera* 26: 3-26
- Seckbach J, Oren A (2010) *Microbial Mats. Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer, Dordrecht
- Severin I, Stal LJ (2008) Light dependency of nitrogen fixation in a coastal cyanobacterial mat. *ISME J* 2: 1077-1088
- Severin I, Stal LJ (2010) Diazotrophic microbial mats. In In: Seckbach J, Oren A (eds.) *Microbial Mats. Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer, Dordrecht, pp. 323-339
- Severin I, Acinas SG, Stal LJ (2010) Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 73: 514-525.
- Simpson SL, Batley GE, Chariton AA, Stauber JL, King CK, Chapman JC, Hyne RV, Gale SA, Roach AC, Maher WA (2005) *Handbook for sediments quality assessment* (CSIRO: Bangor, NSW).
- Sin Y, Ock Ryu S, Song E (2009). Characteristics of benthic chlorophyll a and sediment properties in the tidal flats of Kwangyang Bay, Korea. *Algae* 24 (3):149–161
- Shniukova EI, Zolotareva EK (2015) Diatom Exopolysaccharides: a Review. *International Journal on Algae* 17(1): 50-67
- Spetter CV (2006). *Ciclo biogeoquímico de nutrientes inorgánicos de nitrógeno en los humedales del estuario de Bahía Blanca*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina (158pp)
- Spetter CV, Baldini M, Tartára MN, Fernández EM, Arlenghi J, Buzzi N, Marcovecchio J (2015b) Estado trófico y contaminación microbiana en dos zonas del Estuario de Bahía Blanca afectadas por la descarga cloacal (Buenos Aires, Argentina). En dos Santos Afonso M, Torres Sánchez RM (eds) *Libro de resúmenes del II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental y II Congreso Nacional de la*

Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. SACyTA, Buenos Aires (ISBN 978-987-46096-0-1)

- Spetter CV, Buzzi NS, Fernández EM, Cuadrado DG, Marcovecchio JE (2015a) Assessment of the physicochemical conditions sediments in a polluted tidal flat colonized by microbial mats in Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 91 (2): 491-505
- Spetter CV, Popovich CA, Arias A, Asteasuain RO, Freije RH, Marcovecchio JE (2013) Role of nutrients in phytoplankton development during a winter diatom bloom in a eutrophic South American estuary (Bahía Blanca, Argentina). *Journal of Coastal Research* 31(1): 76-87
- Spetter CV, Tartara M, Fernández EM, Arlenghi J, Marcovecchio J (2016) Estado trófico de la zona costera del sector medio del Estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina). En Córdoba OL et al., Libro de resúmenes de la IV Reunión Argentina de Geoquímica de la Superficie (IV RAGSU). *Naturalia Patagónica* (8), Puerto Madryn (ISSN 0327-8050 y 0327-5272)
- Staats N, de Deckere EMGT, de Winder B, Stal LJ (2001) Spatial patterns of benthic diatoms, carbohydrates and mud on a tidal flat in the Ems-Dollard estuary. *Hydrobiologia* 448 (1): 107-115
- Staats N, Stal LJ, de Winder B and Mur LR (2000a) Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 193: 261-269.
- Staats N, Stal LJ, Mur RL (2000b) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249: 13-27
- Stal LJ (1994) Microbial mats in coastal environments. In Stal LJ and Caumette P (eds) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance*, 1st edn, NATO ASI Series pp 21-32
- Stal LJ (2002) Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton BA, Potts M (eds). *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Space and Time*. Kluwer Academic Publishers, USA: pp 61-120
- Stal LJ (2010) Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intertidal sediment stabilization. *Ecological Engineering* 36: 236-245

- Stal LJ (2011) Exopolymers. In Amils R, Cernicharo Quintanilla J, Cleaves II HJJ, Irvine WM, Pinti DL, Viso M (eds.). *Encyclopedia of Astrobiology*, Springer, New York (e-ISBN 978-3-642-11274-4)
- Stal LJ (2012) Cyanobacterial mats and stromatolites. In Whitton BA (ed.) *The Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*, Springer, The Netherlands pp 65-125.
- Stal LJ, Caumette P (1994) *Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance* NATO ASI
- Stal LJ, de Brouwer JFC (2003) Biofilm formation by benthic diatoms and their influence on the stabilization of intertidal mudflats. *Extended Abstracts, Berichte – Forschungszentrum TERRAMARE*, No. 12
- Stal LJ, Grossberger S, Krumbein WE (1984) Nitrogen-fixation associated with the cyanobacterial mat of a marine laminated microbial ecosystem. *Mar Biol* 82: 217-224.
- Stal LJ, Noffke N (2011) Microbial Mats. In Amils R, Cernicharo Quintanilla J, Cleaves II HJJ, Irvine WM, Pinti DL, Viso M (eds.). *Encyclopedia of Astrobiology*, Springer, New York (e-ISBN 978-3-642-11274-4)
- Stal LJ, Moezelaar R (1997) Fermentation in Cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 21: 179-11
- Stal LJ, van Gemerden H, Krumbein WE (1985) Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 31:111-125
- Steele DJ, Franklin DJ, Underwood GJC (2014) Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling* 30 (8): 987-998
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* (56): 187-209
- Stuart RK, Mayali X, Lee JZ, RC Everroad, Hwang M, Bebout BM, Weber PK, Pett-Ridge J, Thelen MP (2015) Microphytobenthic extracellular polymeric substances (EPS) in intertidal sediments fuel both generalist and specialist EPS-degrading bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 58(4): 1463-1480
- Strickland JDH, Parsons TR (1968) *A Practical handbook of seawater analysis*. Bulletin 167. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa: 207-211.
- Strickland JDH, Parson TR (1968) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 1st Ed, pp: 193-196
- Strickland JDH, Parson TR (1972) *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 2st Ed, pp: 185-204

- Sundby B (1992) Sediment-Water Exchange process. In Hamelink J, Landrum PF, Bergman H, Benson W H (eds) Bioavailability: physical, chemical, and biological interactions. SETAC Special Publications Series, 13th Pellston workshop, pp143-153
- Sumner DY, Hawes I, Mackey TJ, Jungblut, AD, Doran PT (2015) Antarctic microbial mats: A modern analog for Archean lacustrine oxygen oases. *Geology*: doi:10.1130/G36966.1
- Sutherland I (2001) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* (9): 222-227
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Marine and Freshwater Research* 60 (12): 1201-1210
- Taylor JD, McKew BA, Kuhl A, McGenity TJ, Underwood GJC (2013) Microphytobenthic extracellular polymeric substances (EPS) in intertidal sediments fuel both generalist and specialist EPS-degrading bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 58: 1463-1480
- Taylor IS, Paterson DM, MEHLERT A (1999) The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochemistry* 45: 303–327
- Teasdale PR, Minett AI, Dixon K, Lewis TW, Batley GE (1998) Practical improvements for redox potential (EH) measurements and the application of a multiple-electrode redox probe (MERP) for characterising sediment in situ. *Analytica Chimica Acta* 367: 201-213
- Technicon Autoanalyzer II® (1973) Industrial Methods N° 186-72 W/B.
- Thornton DCO, Dong LF, Underwood GJC, Nedwell DB (2002) Factors affecting microphytobenthic biomass, species composition and production in the Colne Estuary (UK). *Aquatic Microbial Ecology* 27: 285-300
- Thornton SF, McManus J (1994) Application of organic carbon and nitrogen stable isotope and C/N ratios as source indicators of organic matter provenance in estuarine systems: Evidence from the Tay Estuary, Scotland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 38: 219-233
- Treguer P, Le Corre P (1975a) Analyse des sels nutritifs sur autoanalyzer II. Manuel D'Analyse des Sels Nutritifs dans L'Eau de Mer, Univ. Bretagne Occidentale, France, pp. 11 - 22.
- Underwood GJC (1997) Microalgal colonisation in a saltmarsh restoration scheme. *Est. Coastal Shelf Sci.* 44: 471-481

- Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron Kde bro (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *J. Phycol.* 40: 293–304
- Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Adv Ecol Res* 29: 93-153.
- Underwood GJC, Paterson DM (2003) The Importance of Extracellular Carbohydrate Production by Marine Epipellic Diatoms. *Advances in Botanical Research* 40:183-240
- Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 40 (7): 1243-1253
- Underwood GJC, Smith DJ (1998) Predicting Epipellic Diatom Exopolymer Concentrations in Intertidal Sediments from Sediment Chlorophyll *a*. *Microbial Ecology* 35: 116-125
- Urbani R, Sist P, Pletikapić G, Mišić Radić T, Svetličić V, Žutić V (2012) Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization. INTECH <http://dx.doi.org/10.5772/51251>
- Urmeneta J, Alcoba O, Razquin E, Tarroja E, Navarrete A, Guerrero R (1998) Oxygenic photosynthesis and respiratory activity in microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by oxygen exchange method. *Curr. Microbiol.* 37: 151-155
- USEPA (2001). *Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual*
- Van Gemerden H (1993) Microbial mats: a joint venture. *Mar Geol* 113: 3-25
- Venturini N, Pita AL, Brugnoli E, García-Rodríguez F, Burone L, Kandratavicius N, Hutton, M, Muniz P (2012) 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* 112: 139-152
- Vincent W, Castenholz RW, Downes, MT, Williams-Howard C (1994) Antarctic Cyanobacteria: Light, nutrientes, and photosyntesis in the microbial mat environment. *J. Phycol.* 29: 744-755.
- Visscher PT, Prins RA & van Gemerden H (1992) Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in a marine microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol* 86: 283-293

- Visscher PT, Stolz JF (2005) Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 219: 87-100
- Vopel K, Hawes I (2006) Photosynthetic performance of benthic microbial mats in Lake Hoare, Antarctica. *Limnol. Oceanogr.* 51 (4): 1801-1812
- Ward DM, Castenholz RW (2002) Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Potts M, Whitton BA (eds) *Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 37–59
- Whitton BA, Potts M (2012) *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Space and Time.* Kluwer Academic Publishers, USA.
- Whitton BA, Al-Shehri AH, Ellwood NTW, Turner BL (2005) Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment.* Commonwealth Agricultural Bureau, Wallingford pp 205-241
- Whitton BA, Grainger SLJ, Hawley GRW, Simon JW (1991) Cell bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microb Ecol* 21: 85-98
- Wilson JG, Brennan MT (2004). Spatial and temporal variability in modeled nutrient fluxes from the unpolluted Shannon estuary, Ireland, and the implication for microphytobenthic productivity. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* A 60: 193–201
- Windham-Myers L (2005) Dissolved inorganic nitrogen pools and surface flux under different brackish marsh vegetation types, common reed (*Phragmites australis*) and salt hay (*Spartina patens*). *Biogeochemistry* 75: 289-304.
- Wolfstein K, Stal LJ (2002) Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effect of irradiance and temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 236: 13-22
- Wu Y, Zhang J, Li DJ, Wei H, Lu RX (2003). Isotope variability of particulate organic matter at the PN in the East China Sea. *Biogeochemistry* 65: 31-49
- Wu Y, Zhang J, Zhang ZF, Ren JL, Cao JP (2002). Seasonal variability of stable carbon and nitrogen isotope of suspended particulate matter in the Changjiang river. *Oceanologia ET Limnologia Sinica* 33: 546-552 (in Chinese).
- Wurl O (2009) *A practical guidelines for the analysis of seawater.* CRC Press, New York.
- Yallop ML, de Winder B, Paterson DM, Stal LJ (1994) Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 39: 565-582.

- Zaixso HE (2002) Manual de Campo para el muestreo del Bentos.
<http://www.idc.unp.edu.ar/wp-content/uploads/2009/02/Zaixso.pdf>
- Zapperi G, Pratolongo P, Piovan MJ, Marcovecchio JE (2016) Benthic-Pelagic Coupling in an Intertidal Mudflat in the Bahía Blanca Estuary (SW Atlantic) *Journal of Coastal Research*, 32(3): 629-637.
- Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Prentice Hall, New Jersey
- Zhang X, Bishop P, Kupferle M (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* (37): 345-348
- Zhou J, Wu Y, Zhang J, Kang Q, Liu Z (2006) Carbon and nitrogen composition and stable isotope as potential indicators of source and fate of organic matter in the salt marsh of the Changjiang Estuary, China. *Chemosphere* 65: 310-317.
- Zotelo C (2011) Variabilidad Climática y Ciclos Naturales. *Anales 2011 de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, Tomo LXV: 374-381.