

TESIS DOCTORAL

Efecto del cangrejo cavador *Neohelice granulata* (= *Chasmagnathus granulatus*) en ciclos biogeoquímicos y dinámica de nutrientes en marismas del Atlántico Sudoccidental.

Lic. María Eugenia Fanjul

Directores:
Dr. Oscar Osvaldo Iribarne
Dra. María Alejandra Grela

Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias (área Biología)

**Universidad Nacional de Mar del Plata
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

2008

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCION GENERAL.....	5
CAPÍTULO I. Efectos del cangrejo cavador <i>Neohelice granulata</i> en la química del sedimento y distribución de nutrientes en sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental	
Introducción.....	20
Materiales y métodos.....	22
Resultados	29
Discusión.....	34
Tablas.....	41
Figuras.....	45
CAPÍTULO II. El cangrejo cavador intermareal <i>Neohelice granulata</i> modifica la carga de nutrientes del agua freática que ingresa al área costera.	
Introducción.....	55
Materiales y métodos.....	58
Resultados.....	63
Discusión.....	65
Figuras.....	72
CAPÍTULO III. Impacto de la bioturbación en los flujos bentónicos de nutrientes y en la dinámica del N en sedimentos de marismas y planicies de marea del Atlántico SO.	

Introducción.....	76
Materiales y métodos.....	80
Resultados.....	86
Discusión.....	92
Figuras.....	101
CAPÍTULO IV. Efecto del cangrejo <i>Neohelice granulata</i> en flujos bentónicos y calidad de materia orgánica en sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental.	
Introducción.....	110
Materiales y métodos.....	113
Resultados.....	118
Discusión.....	127
Tablas.....	135
Figuras.....	136
CONCLUSIONES GENERALES.....	141
APÉNDICE. <i>Símbolos y abreviaturas</i>	147
BIBLIOGRAFIA.....	148

AGRADECIMIENTOS

ESTRUCTURA DE LA TESIS

El trabajo original desarrollado en esta Tesis ha sido organizado en distintos Capítulos que poseen el formato general de un artículo científico, incluyendo introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, tablas y figuras. Dentro de cada Capítulo se detallan las áreas de estudio específicas en las que se realizaron las observaciones, muestreos y/o experimentos para cada caso.

La siguiente Introducción General presenta de manera resumida el marco teórico general que contiene a la tesis, y resume además la estructura y contenido de cada capítulo. Siguiendo la Introducción General, se detallan las generalidades de los procedimientos estadísticos, y luego en el desarrollo de los Capítulos se describen los análisis realizados para evaluar las hipótesis allí planteadas. A pesar de estas secciones que intentan descripciones generales comunes a toda la tesis, en cada Capítulo se intentó mantener un mínimo de independencia lógica y por ello algunas descripciones se encuentran repetidas en cada Capítulo.

La literatura citada durante la Tesis se encuentra en una única sección final.

Los muestreos y experimentos de esta Tesis se centraron en determinar los efectos del cangrejo bioturbador *Neohelice granulata* en la dinámica de nutrientes y materia orgánica (MO) en sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental. Los resultados indican que la bioturbación incrementa el transporte de material y determina la distribución de nutrientes y el estado redox de la columna de sedimento. Además, el metabolismo del sedimento es estimulado como consecuencia del mejor acoplamiento e incremento en las diferentes vías de degradación de MO. Por medio de estos efectos, *N. granulata* tiene importantes efectos en los flujos de sustancias disueltas hacia sistemas vecinos. En este sentido, la visión clásica considera a las marismas como filtros de nutrientes; sin embargo, en la marisma las cuevas de *N. granulata* constituyen conductos que descargan el agua acumulada en su interior, enriquecida en nutrientes disueltos, directamente en el agua freática. Estos resultados demuestran que la capacidad de filtro de estos sistemas puede ser afectada por organismos bioturbadores que construyan cuevas suficientemente profundas. Además, la bioturbación estimula también la mineralización de N, nitrificación y desnitrificación, pero sobre los flujos bentónicos de NID y la fijación de N₂ es contrastante entre planicie de marea y marisma. Los cangrejos incrementan la proporción de MO disponible para otros organismos, o para ser exportada desde el sedimento hacia las aguas estuariales. Así, *N. granulata* afecta la tasa y forma en que la MO y los nutrientes inorgánicos son exportados desde los sistemas intermareales hacia el agua costera, ya que los detritos depositados en superficie o atrapados en las cuevas son eficientemente remineralizados y exportados del sistema.

Effect of the burrowing crab *Neohelice granulata* (= *Chasmagnathus granulatus*) on biogeochemical cycles and nutrient dynamics at SW Atlantic marshes.

Sampling and experimental activities of this Thesis were focused to evaluate the effects of the burrowing crab *Neohelice granulata* on nutrient and organic matter (OM) dynamic at SW Atlantic intertidal sediments. Principal results indicate that bioturbation increases the material transport into the sediment column, and determines nutrient distribution and redox state of the sediment. Moreover, through facilitation of the coupling processes between different remineralization pathways, bioturbation enhances net mineralization rates and stimulates sediment metabolism. Due to these effects, *N. granulata* has an important impact on dissolved nutrient flux to neighboring systems. In this sense, the classic vision consider that marshes act as effective nutrients filters; however, *N. granulata* burrows are deep conduits that directly discharge burrow-contained water (rich in dissolved nutrients) to the phreathic water. These results demonstrate that the marsh filtering capacity may be affected by bioturbating organisms that construct deep burrows. Moreover, bioturbation enhances N mineralization, denitrification and nitrification, but there was contrasting effects of bioturbation on NID benthic fluxes and on N₂ fixation between mudflat and marsh sediment. Crabs increase the fraction of OM available to others organisms or that can be able to be exported from sediment to estuarine waters. Thus, *N. granulata* affect the rates and pathways in which dissolved OM and nutrients are exported to open waters, since detritus trapped on burrows or deposited on surface sediments are efficiently remineralized and exported due to crab bioturbation activities.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En muchos lugares, los sistemas de borde entre tierra y el mar son abruptos cortes verticales, pero en otros lugares, estos sistemas se presentan como complejos ambientes de sedimentos intermareales (Alongi 1998, Jickells & Rae 1997). Estos ambientes incluyen playas de arena, planicies de mareas, marismas y manglares. Debido a su valiosa función de protección contra la erosión costera, y a que sus sedimentos son importantes hábitats para la vida silvestre, como sustento de la productividad de las zonas costeras, y como ambientes de recreación, los sistemas intermareales han constituido áreas sujetas a intensa investigación científica. Históricamente el estudio de estos ambientes se ha centrado en su ecología (*e.g.*, Adam 1990, Chapman 1977), su geomorfología y geología (Allen & Pye 1992). Recién durante las dos últimas décadas del siglo XX comenzaron a surgir trabajos que relacionaban los procesos biológicos, químicos, físicos y geológicos en ambientes naturales. El reconocimiento de la importancia de la interacción biología-geología-química impulsó el desarrollo de líneas de investigación propias, como la biogeoquímica, actualmente de carácter totalmente interdisciplinario. Particularmente, la biogeoquímica de sedimentos intermareales se centra en el estudio de los procesos y reacciones que gobiernan la composición y funcionamiento de estos importantes ambientes. De esta forma, además del alto valor natural y de protección contra inundaciones, en la actualidad se sabe que zonas intermareales como las marismas tienen la capacidad de almacenar nutrientes, contaminantes, y grandes cantidades de carbono, lo que contribuye a disminuir los

efectos del CO₂, cuyo incremento en la atmósfera es uno de los principales causales del calentamiento global.

Las leyes de la termodinámica, postulan que la energía puede ser convertida de una forma a otra, y que las reacciones químicas proceden espontáneamente en la dirección de la menor energía libre G. Esta condición representa su estado de equilibrio, donde se encuentran una mezcla de especies químicas que presentan las mayores energías de enlace y el mayor desorden posible entre sus componentes. En vista de estas dos leyes, los sistemas vivos y las condiciones en la superficie terrestre existen en una condición de no-equilibrio. En este sentido, los organismos vivos han desarrollado en su historia evolutiva mecanismos metabólicos que involucran siempre cierta inversión de energía compensando los requisitos energéticos de las leyes de la termodinámica (Canfield *et al.* 2005).

Los organismos fotoautótrofos capturan radiación solar y convierten los fuertes enlaces C=O del dióxido de carbono en enlaces débiles C-C que caracterizan a los seres vivos (Canfield *et al.* 2005, Fenchel *et al.* 1998). Los organismos heterótrofos obtienen energía capitalizando la tendencia natural de los electrones en fluir desde enlaces reducidos a agentes oxidantes fuertes como el O₂ (*i.e.*, oxidando enlaces de tejidos vivos; Canfield *et al.* 2005, Fenchel *et al.* 1998). El metabolismo de estos organismos es posible debido a que los sistemas vivos pueden secuestrar grandes cantidades de oxidantes y reducir grandes cantidades de sustancias de sus ambientes. Sin las membranas necesarias para compartimentalizar las células vivas, las leyes de la termodinámica predicen una mezcla y un estado de oxidación uniforme para toda la tierra (Schlesinger 1991). Las reacciones de óxido-reducción, también conocidas como reacciones redox, implican la transferencia de electrones que no pueden acumularse en

solución, por lo que todas las reacciones de oxidación deben estar acopladas a reacciones de reducción, y *vice versa* (Canfield *et al.* 2005). La mayor parte de los procesos biogeoquímicos de la tierra comprenden reacciones acopladas de oxidación y reducción (*e.g.*, la degradación de materia orgánica).

Los sedimentos intermareales son sistemas dinámicos y muy productivos que ocupan una importante posición entre la tierra y el mar (Alongi 1998). Debido a que la columna de agua suele ser somera, en estos sistemas los procesos bentónicos tienden a ser más importantes que los pelágicos (Sundbäck & McGlathery 2005). En áreas con fondos blandos, la mayor parte de los procesos biogeoquímicos ocurren en el sedimento, donde la densidad de microorganismos es varios órdenes de magnitud mayor que en la columna de agua (Sundbäck & McGlathery 2005). En estos sistemas, la energía solar absorbida y fijada por varios grupos de organismos fotótrofos es almacenada como biomasa y eventualmente disipada por una variedad de pequeños y grandes heterótrofos (Alongi 1998). Algas, cianobacterias, y bacterias fotosintéticas verdes y rojas están entre los mas importantes productores primarios del océano; pero en zonas someras donde el agua es clara y reciben importantes cantidades de luz solar, las microalgas y plantas vasculares como plantas de marismas, contribuyen significativamente al conjunto del carbono fijado (Alongi 1998). Mientras que parte de este carbono fijado es consumido por herbívoros, la mayor parte entra a la trama trófica detritívora en forma de compuestos disueltos y material particulado no-vivo (*i.e.*, detritos). Los detritos se componen de material vegetal no pastoreado, junto con heces de macrofauna, exoesqueletos, exudados, y células microbianas muertas. La biomasa en descomposición es re-convertida en carbono inorgánico a través de la hidrólisis/fermentación (formación de carbono orgánico disuelto -COD-) y la

subsiguiente mineralización (formación de CO_2) por organismos heterótrofos (Canfield 1993, Kristensen & Holmer 2001). Los términos descomposición y degradación describen el proceso enzimático completo por el que la materia orgánica particulada se disuelve en grandes macromoléculas (hidrólisis), estas macromoléculas son fraccionadas en moléculas más pequeñas (fermentación), y finalmente la oxidación (respiración) de este carbono orgánico es realizada usando varios aceptores de electrones como oxígeno, óxidos de manganeso, nitrato, óxidos de hierro, y sulfato (Canfield *et al.* 2005). El término mineralización se refiere a la oxidación terminal de la materia orgánica disuelta en carbono inorgánico (Canfield *et al.* 2005). La materia orgánica disuelta (MOD) es la parte cuantitativamente más importante del conjunto de detritos en los ambientes acuáticos; y los procesos de mineralización de esta MOD están mediados y catalizados por microorganismos heterótrofos. De esta forma, el principal factor que determina los ciclos biogeoquímicos en sedimentos intermareales de estuarios y bahías es la degradación de materia orgánica, depositada en la superficie del sedimento, o excretada por las raíces y rizomas de las macrófitas (Froelich *et al.* 1979, Hines *et al.* 1989, Jensen *et al.* 1990).

La localización de los microorganismos que promueven cada una de las reacciones de respiración depende de la disponibilidad de los aceptores de electrones en el ambiente, y de la termodinámica de las reacciones de respiración. De acuerdo a la termodinámica, el orden de uso de los aceptores de electrones es: oxígeno, óxidos de manganeso, nitrato, óxidos de hierro, sulfato, y dióxido de carbono (Fig. 1); y este orden está dado por la eficiencia en la liberación de energía que ocurre al oxidar materia orgánica utilizando cada uno de estos aceptores de electrones. Sin embargo, esta estricta distribución vertical de los aceptores de electrones es una sobre-simplificación de las

distribuciones reales encontradas en la naturaleza. Además de las consideraciones termodinámicas, el pH, las concentraciones reales de reactivos y productos (metabolitos) presentes, y principalmente la influencia de heterogeneidad en el sedimento, como cuevas de macrofauna y raíces de macrófitas, también afectan la estructura vertical de la distribución de aceptores de electrones (Aller 2001). En muchos casos, un transporte hacia abajo de aceptores de electrones como oxígeno o nitrato, crea perfiles radiales de respiración óxica o desnitrificación entorno a las cuevas de esta macrofauna, en sedimentos que de otra forma serían dominados por reducción de sulfato o metanogénesis (Gribsholt *et al.* 2003, Nielsen *et al.* 2003).

En un sentido amplio, la bioturbación se define como el re-trabajo biológico de sedimentos por toda clase de organismos, incluyendo micro-organismos, plantas enraizadas y macro-organismos excavadores (Meysman *et al.* 2006). La bioturbación por animales resulta de actividades como construcción de cuevas y montículos, arado lateral de la superficie (*e.g.*, topos), ingestión y egestión de partículas de sedimento durante el forrajeo (*e.g.*, alimentadores de depósitos), y relleno de cuevas abandonadas. El principal efecto biológico de la bioturbación es la dispersión y consecuente mezcla de “partículas sólidas”, incluyendo sustancias no-vivas como arcillas, detritos, metales y contaminantes adsorbidos, y también organismos vivos como microorganismos. La presencia de raíces de macrófitas y cuevas de macrofauna en sedimentos intermareales crea un ambiente tridimensional de micro-zonas con potencial redox temporal y espacialmente fluctuante, que resulta en importantes efectos en las vías de mineralización de materia orgánica (*e.g.*, Aller 1994, Aller & Yingst 1978, Canfield 1993, Kostka *et al.* 2002). El sedimento superficial óxico es enterrado durante la excavación de cuevas, transfiriendo sustratos lábiles a bacterias anaeróbicas limitadas

por alimento, y sustratos refractarios a bacterias aeróbicas eficientes para degradarlos (Montague 1982, Kristensen & Holmer 2001). Así, los organismos bioturbadores no sólo estimulan la actividad microbiana y el metabolismo del sedimento (Taylor & Allanson 1993), sino que también afectan la partición entre los distintos aceptores de electrones (*e.g.*, sulfato vs Fe[III]) usados por las bacterias anaeróbicas en la oxidación terminal de la material orgánica (Kostka *et al.* 2002). Por medio de la creación de nuevas superficies de intercambio agua-sedimento (paredes de las cuevas) y de las actividades de bioturbación (*e.g.*, ventilación de las cuevas), la presencia de organismos excavadores incrementa el transporte de sedimentos (Aller 1982), y abastece rápidamente a los ciclos internos de óxido-reducción. A pesar de la abundancia de organismos bioturbadores en sedimentos intermareales, el estudio de sus efectos en la degradación de carbono orgánico y ciclos biogeoquímicos ha recibido poca atención.

En vista de lo anteriormente descrito, esta tesis se halla enmarcada dentro de un programa de investigación más general, el cual intenta comprender los procesos físicos y biológicos que regulan la dinámica ecológica, geomorfológica y biogeoquímica de los intermareales presentes en el Atlántico Sudoccidental (ASO). En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis es investigar el efecto de la bioturbación en los procesos biogeoquímicos que operan en sedimentos de planicies de marea y marismas del ASO. Particularmente, los trabajos de campo se desarrollan en planicies de marea y marismas dominadas por la planta halófito *Spartina alterniflora*, y por el cangrejo cavador *Neohelice granulata* (anteriormente conocido como *Chasmagnathus granulatus*; para una reciente revisión taxonómica ver Sakai *et al.* 2006; ver también Spivak *et al.* 1994, Iribarne *et al.* 1997).

El cangrejo cavador *Neohelice granulata* es el macro-invertebrado más abundante presente en la mayoría de los sedimentos intermareales de estuarios y bahías a lo largo de la costa del ASO (desde el sur de Brasil, 23° S; hasta el norte de la Patagonia Argentina, Golfo San Matías, 41° S; Boschi 1964, Iribarne *et al.* 2005; Fig. 2). Este cangrejo de tamaño relativamente grande (hasta 40 mm de ancho de caparazón; Boschi 1964, Spivak *et al.* 1996, Luppi *et al.* 2004) habita la zona intermareal, desde las planicies de marea hasta las marismas vegetadas por *Spartina densiflora*, *Spartina alterniflora*, *Sarcocornia perennis* y *Juncus acutus* (Boschi 1964, Spivak *et al.* 1994, Botto *et al.* 2005, Bortolus 2006, Isacch *et al.* 2006; ver Fig. 3), generando extensos cangrejales (*i.e.*, extensas áreas con altas densidades de cuevas; hasta 60 cuevas m⁻²; Iribarne *et al.* 1997) que cubren hasta un 80% del área intermareal (*e.g.*, estuario de Bahía Blanca: 38° 48' S, área ~ 110,000 ha; Laguna Costera Mar Chiquita: 37° 46' S, área ~ 4,500 ha; ver Iribarne *et al.* 2005, Botto *et al.* 2006). Las cuevas son grandes (hasta 10 cm de ancho y 1 m de profundidad; Iribarne *et al.* 1997, Bortolus & Iribarne 1999), semipermanentes, con altas tasas de excavación de sedimento (entre 2.5 kg m⁻² en la marisma y 6 kg m⁻² en la planicie de marea; Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000, Escapa *et al.* 2008). Este sedimento removido durante la construcción y mantenimiento de las cuevas es depositado en la superficie, frecuentemente en forma de montículos cerca de las entradas de las cuevas (Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000, Escapa *et al.* 2008). Los cangrejos se alimentan principalmente de depósitos (*i.e.*, detritívoros) en planicies de marea, y herbívoro-detritívoros en marismas (Iribarne *et al.* 1997, Bortolus & Iribarne 1999, Botto *et al.* 2005). En las planicies de marea, las cuevas son poco profundas (hasta 40 cm) y con entrada en forma de embudo (ver Iribarne *et al.* 1997, Escapa *et al.* 2008), afectando el movimiento de partículas y

dinámica de fluidos cercanos al fondo (Escapa *et al.* 2008), actuando como trampas pasivas de sedimento y materia orgánica (Botto *et al.* 2005, 2006), detritos (Iribarne *et al.* 2000, Botto *et al.* 2006) y agentes contaminantes (Menone *et al.* 2004). En la marisma, los cangrejos construyen cuevas perfectamente tubulares de hasta 1 m de profundidad (y hasta 40 mm diámetro), que pueden alcanzar el nivel freático (Iribarne *et al.* 1997, Bortolus *et al.* 2002, Perillo *et al.* 2005). Por medio de la construcción de cuevas incrementan el área expuesta de sedimento, el drenaje, y la concentración de oxígeno en el sedimento (Daleo *et al.* 2007). Los cangrejos tienen efectos ecológicos directos e indirectos a escala comunitaria: indirectamente afectan la selección de hábitat y tasas de forrajeo de aves costeras migratorias por cambios en la disponibilidad de presas (Botto *et al.* 2000, Escapa *et al.* 2004), y también afectan el uso de hábitat por parte de peces, zooplancton (Martinetto *et al.* 2005) y otros cangrejos durante la marea alta (Iribarne *et al.* 2003, Martinetto *et al.* 2007). Además, muchos trabajos sugieren que las cuevas de cangrejos reducen la tasa de exportación de materia orgánica desde las marismas hacia las aguas estuarinas o aguas abiertas (Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000, Botto *et al.* 2006, Gutiérrez *et al.* 2006).

Así, los muestreos y experimentos de esta Tesis se centran en determinar los efectos de este cangrejo bioturbador y de sus cuevas en la dinámica de nutrientes inorgánicos y materia orgánica en sedimentos intermareales, discutiéndose sus posibles consecuencias sobre otros organismos que componen estos ecosistemas. En el Capítulo I, mediante experimentos de campo y análisis químico del sedimento y agua del poro, se presentan los resultados de la investigación del efecto del cangrejo cavador *Neohelice granulata* en la distribución y disponibilidad de aceptores de electrones en sedimentos de planicies de marea. El uso de un modelo diagenético permite determinar el efecto del

cangrejo y de sus cuevas en las tasas y vías de mineralización de MO. En el Capítulo II, se evalúa el efecto de este cangrejo y de sus cuevas en las características químicas del agua freática; y se discuten las posibles implicancias que organismos bioturbadores pueden tener en la exportación de nutrientes desde las marismas hacia las aguas abiertas. En el Capítulo III se muestra, por medio de experimentos y mediciones *in situ*, el efecto de *N. granulata* en el metabolismo bentónico, procesos del ciclo del N, y flujos de nutrientes entre la interfase agua sedimento, tanto en marismas como en planicies de marea. Se discute cómo la bioturbación por *N. granulata* puede afectar el ciclo biogeoquímico y flujos bentónicos de nitrógeno, dependiendo de las características del sedimento y de la presencia de vegetación. Finalmente, en el Capítulo IV de esta tesis se evalúan y discuten los efectos directos (actividad de bioturbación) e indirectos (presencia de cuevas) de *N. granulata* en la concentración y composición de la material orgánica disuelta en agua de poro de sedimentos de marismas y planicies de marea; así como también su efecto en la labilidad y flujos bentónicos de esta materia orgánica.

Generalidades del diseño experimental y análisis de datos.

La mayor parte de los estudios sobre la influencia de la macrofauna y las macrófitas en la biogeoquímica del sedimento y ciclos geoquímicos de los elementos en ambientes marinos tienen carácter descriptivo (ver Kostka *et al.* 2002, Pedersen *et al.* 2004, Solan & Wigham 2005, Kristensen & Kostka 2005) y sólo muestran patrones cualitativos de los diferentes procesos biogeoquímicos; otros aportes tienen carácter experimental por medio de incubaciones de laboratorio que incorporan la bioturbación como variable (pero ver Webb & Eyre 2004). Así, la mayoría de los trabajos publicados en esta área, no necesariamente representan los efectos reales que la bioturbación puede tener en los sistemas naturales. En ese contexto, y con el fin de aumentar el rigor metodológico de la investigación de campo en biogeoquímica, se propone actualmente la utilización de la metodología de uso común y probada eficiencia en ecología (Underwood 1997). Esta metodología contempla diseños robustos, repetibles y asigna gran importancia al número e independencia de réplicas de las variables medidas, y al diseño de experimentos de campo que permitan la explicación de los mecanismos generadores de algún patrón observado (Underwood 1997).

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en muestreos y experimentos de la presente tesis se realiza procurando obtener la mayor robustez posible. En ese sentido los muestreos y experimentos realizados fueron siempre uni- o bi-factoriales (Underwood 1997). Para el caso de comparaciones de grupos de datos con sólo dos niveles se utiliza test de t (Zar 1999), la homogeneidad de varianzas entre grupos de datos se evalúa utilizando el test de Cochran (Underwood 1997), si la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas fuera rechazada se intentan transformaciones monotónicas de los datos siguiendo a Underwood (1997). En el caso de lograr homocedasticidad

entre grupos de datos, se testea su normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk (Zar 1999). Para analizar las hipótesis nulas de ausencia de diferencias entre grupos de datos dentro de un factor con tres o más niveles se utiliza análisis de la varianza ANOVA (Zar 1999). Este análisis también es paramétrico y los grupos de datos deben cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad, para testear ambos supuestos se utilizaron los test mencionados anteriormente. De no cumplirse estos supuestos, se realizan transformaciones monotónicas de los datos (Underwood 1997). Si aún utilizando transformaciones no se logra homocedasticidad se utiliza el test no-paramétrico de comparación de medianas Kruskal-Wallis (Conover 1980) en reemplazo de la comparación de medias realizada con ANOVA. Para los casos en los que las comparaciones fueron entre grupos de datos de más de un factor (*i.e.*, comparaciones múltiples) y más de dos niveles por factor, se utilizan ANOVAs con tantas vías como factores se comparan. En todos los diseños de este tipo se utilizan niveles fijos (no-aleatorios) para los factores considerados (Zar 1999). Los supuestos de este análisis se testean como se mencionó anteriormente. En el caso de que el ANOVA indique diferencias significativas en los factores, se realiza *a posteriori* el test LSD de comparaciones múltiples (Day & Quinn 1989) para identificar qué cuáles grupos de datos difieren entre sí. En el caso de encontrar efecto de interacción significativa entre los factores, los efectos principales de los factores no son tenidos en cuenta, debido a la falta de independencia entre los mismos (Underwood 1997). En esos casos se utilizan comparaciones sólo entre los términos de interacción de interés, utilizando el test LSD.

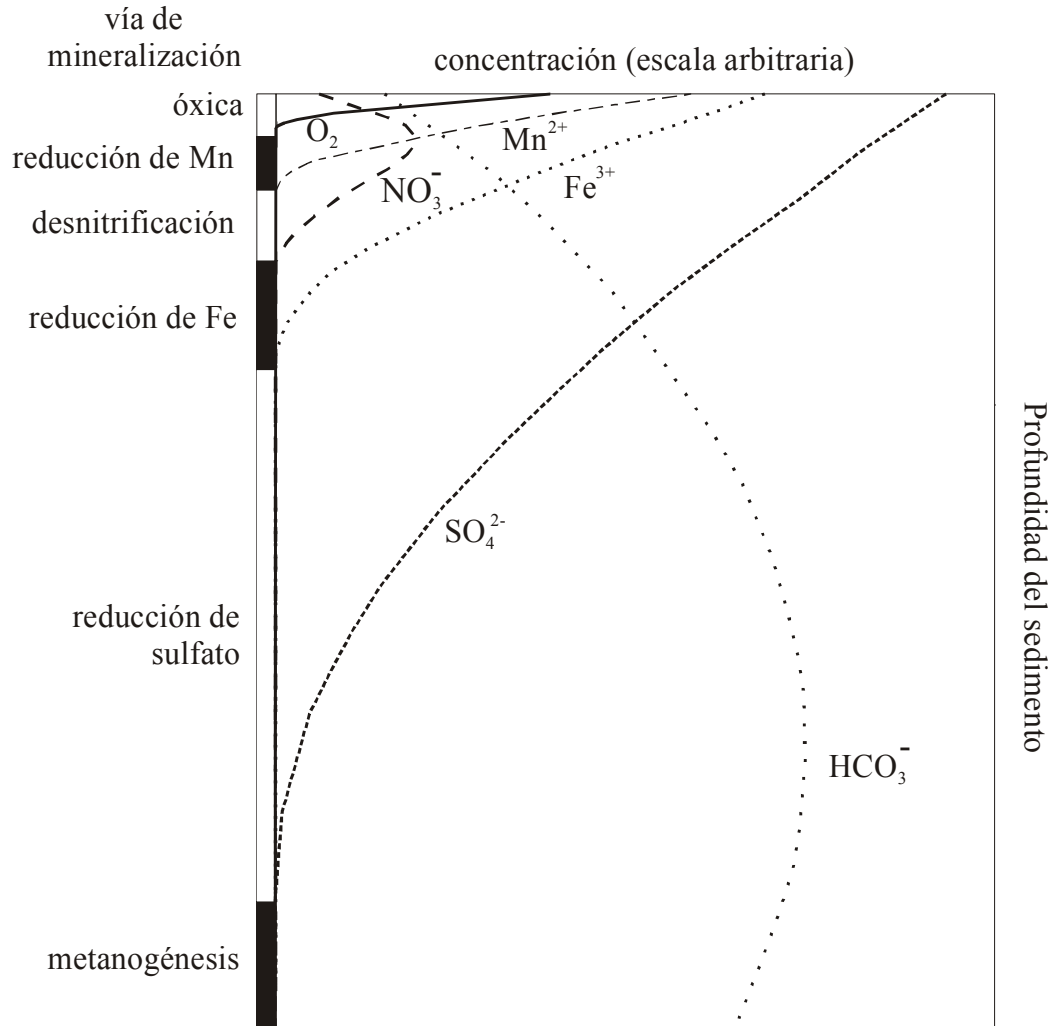


Fig. 1. Distribución vertical idealizada de aceptores de electrones en sedimentos marinos. La barra sobre el lado izquierdo indica la distribución vertical de las diferentes vías de oxidación de materia orgánica (Canfield *et al.* 2005)

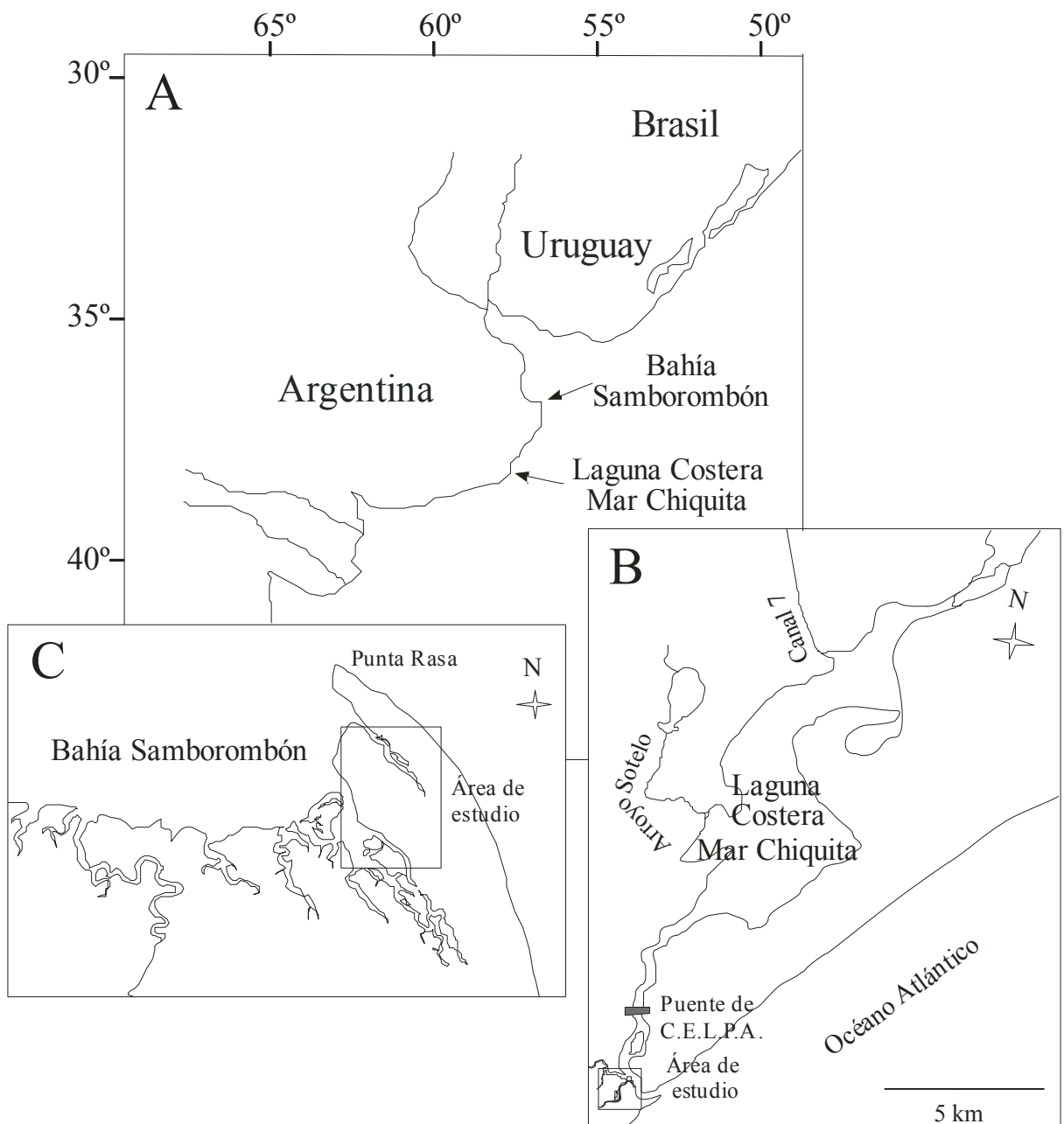


Fig. 2. Ubicación geográfica de los sitios de estudio de esta tesis (A); mapa de la Laguna Costera Mar Chiquita (B); y mapa de la Bahía Samborombón (C).

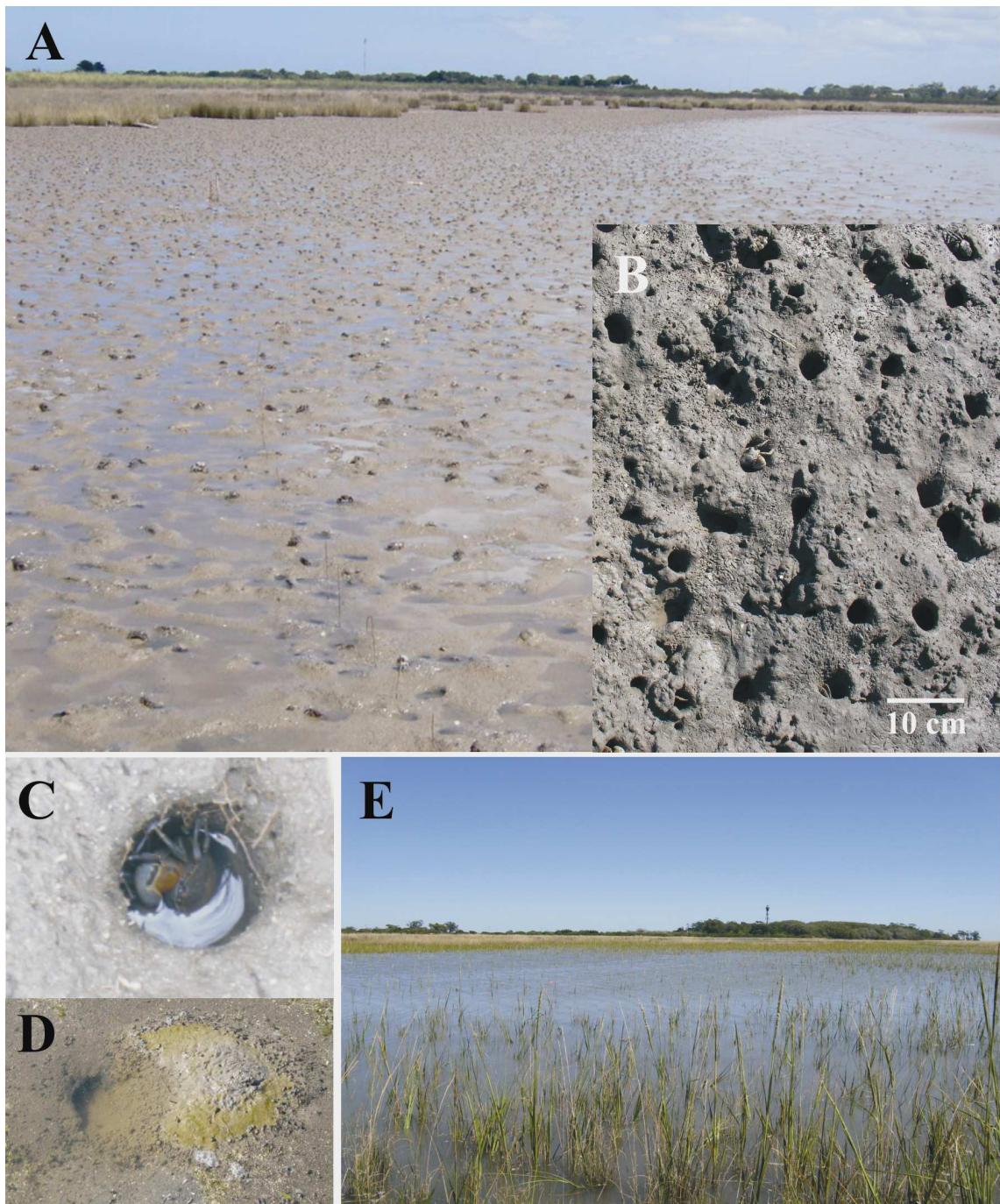


Fig. 3. Fotografías de cangreiales de *Neohelice granulata* (A y B), cuevas de *N. granulata* donde puede verse la presencia del cangrejo (C) y del montículo (D), y áreas de marisma inundadas (E) en zonas intermareales del Atlántico Sudoccidental. (A, C y D: Laguna costera Mar Chiquita; B y E: Bahía Samborombón). Fotos: Paulina Martinetto (A), Diana Montemayor (B), Macarena Valiñas (C), Mauricio Escapa (D) y Eugenia Fanjul (E).

CAPÍTULO I

Efectos del cangrejo cavador *Neohelice granulata* en la química del sedimento y distribución de nutrientes en sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental *

* Este Capítulo corresponde a la publicación científica:

Fanjul E, Grela MA, Iribarne O. 2007. Effects of the dominant SW Atlantic intertidal burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on sediment chemistry and nutrient distribution. Marine Ecology Progress Series 341: 177-190.

INTRODUCCIÓN

Los estuarios son considerados uno de los sistemas marinos más productivos de mundo (*e.g.*, Alongi 1998). Las zonas intermareales dentro de los estuarios son sistemas dinámicos y productivos con condiciones ambientales variables y extremas (Alongi 1998). Los principales procesos biogeoquímicos en estos sistemas son las altas tasas de transformación de diferentes elementos (*e.g.*, N, P, S) desde formas orgánicas a inorgánicas y viceversa, durante los procesos de mineralización y asimilación (Rozema *et al.* 2000). Los niveles y características del agua de poro están afectados por la inundación periódica producida por las mareas (Alongi 1998). Las mareas actúan de forma antagónica, y los sedimentos intermareales están diariamente sujetos a cambios en su estado de aireación. Durante los períodos de inundación, se promueven los procesos anaeróbicos, mientras que en los períodos en los que el sedimento es expuesto al aire, las capas superficiales del sedimento presentan un alto potencial redox (Schlesinger 1991). Estas oscilaciones en el estado redox del sedimento no solo afectan la energía y flujo de nutrientes, sino que también afectan las tasas y vías de degradación de materia orgánica (Alongi 1998).

En aguas costeras someras y estuarios, la descomposición de materia orgánica (MO) ocurre principalmente en el sedimento (Nedwell *et al.* 1999). La incorporación de MO en el sedimento y su posterior remineralización son mediadas por la actividad de meio y macrofauna (Herman *et al.* 1999). Estos organismos pueden afectar la química del sedimento por medio de la construcción de sus cuevas, bioturbación, bioirrigación, defecación, respiración y secreción de mucus (Alongi 1998, Kostka *et al.* 2002). Sin embargo, la mineralización de MO requiere el aporte de aceptores de electrones, que determinan la vía predominante en la que ocurre la oxidación microbiana (Nedwell *et*

al. 1999). Los aceptores de electrones son un recurso limitante en la mayoría de los sedimentos no bioturbados, dado que por ejemplo la penetración de oxígeno, y por consiguiente los procesos aeróbicos de degradación, están restringidos a los primeros milímetros de sedimento (Revsbech *et al.* 1980, Howarth & Jørgensen 1984) y las capas mas profundas están caracterizadas por vías anaeróbicas de descomposición (*e.g.*, Gambrell & Patrick 1978, Mackin & Swider 1989). Kostka *et al.* (2002) mostraron que tanto la macrofauna como las raíces de las plantas afectan las tasas y vías de degradación de MO en el sedimento. Así, las actividades de bioturbación (Kristensen & Blackburn 1987, Kostka *et al.* 2002) y las raíces de las plantas (Howes *et al.* 1986, Kostka *et al.* 2002) pueden incrementar la profundidad de la capa óxica del sedimento, favoreciendo los procesos aeróbicos.

Los ambientes intermareales de bahías y estuarios del Atlántico Sudoccidental son dominados por la actividad de excavación del cangrejo cavador *Neohelice granulata*. La mayoría de las evidencias sugieren que este cangrejo de tamaño relativamente grande podría tener un importante efecto en la redistribución de partículas (Botto & Iribarne 2000, Escapa *et al.* 2008), química del sedimento (Botto *et al.* 2005, Gutiérrez *et al.* 2006), drenaje (Iribarne *et al.* 1997, Bortolus & Iribarne 1999, Botto & Iribarne 2000), y oxigenación del sedimento (Bortolus & Iribarne 1999, Botto *et al.* 2005, Gutiérrez *et al.* 2006). Aunque estos efectos aún no han sido evaluados directamente, es de esperar que su bioturbación afecte la oxigenación del sedimento y consecuentemente afecte las tasas y vías de degradación de MO y la dinámica de los nutrientes remineralizados. En este contexto, el principal objetivo de este Capítulo es evaluar si el cangrejo cavador *N. granulata* afecta la distribución y disponibilidad de nutrientes (en particular aceptores de electrones) y la oxigenación de sedimentos intermareales. Así, se testeó la hipótesis

general que los cangrejos afectan las características químicas del sedimento por medio de las actividades de bioturbación y defecación dentro de sus cuevas, así como también por el incremento del área de intercambio agregada mediante las paredes de las cuevas. La validez de estos posibles mecanismos fueron evaluados mediante muestreos y experimentos de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Las tareas de campo de este Capítulo fueron realizadas en la Laguna Costera Mar Chiquita, Argentina (37° 46' S, 57° 27' O), un cuerpo de agua salobre (salinidad entre 0-43), afectado por mareas de baja amplitud (hasta 1.5 m) y caracterizado por fondos fangosos (Fasano *et al.* 1982, Spivak *et al.* 1994, Iribarne *et al.* 1997). Este estudio fue realizado entre los meses de noviembre del 2004 y octubre del 2005.

Efectos de las cuevas de *Neohelice granulata* en la interfase agua-sedimento. La densidad de cuevas de *N. granulata* fue determinada por muestreos en siete zonas intermareales definidas por diferencias en tiempos del inundación (4 niveles en la marisma y 3 niveles en la planicie de marea; $n = 10$ para cada nivel, 0.25 m^2) en octubre de 2005. De acuerdo con trabajos previos (ver Iribarne *et al.* 1997, Bortolus *et al.* 2002) se consideran profundidades de cuevas de 1 m en la marisma alta a 0.4 m en la marisma baja con intervalos de 0.2 m entre cada nivel de la marisma; para los 3 niveles de la planicie de marea se uso una profundidad constante de 0.4 m. Considerando la densidad de cuevas a través del intermareal, diámetro medio de las mismas (3.6 cm; Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000), la profundidad, y asumiendo que tienen formas cilíndricas (Iribarne *et al.* 1997), se calculó el volumen del sedimento no ocupado por cuevas por m^3 de sedimento, y el incremento en la superficie de intercambio agua-

sedimento para cada nivel del intermareal. Además, se calculó la razón entre el aumento de superficie de intercambio y el volumen de sedimento ocupado por cuevas como un indicador de la intensidad de efecto en cada zona del intermareal. Se evaluó la hipótesis nula (H_0) de ausencia de diferencia entre la densidad de cuevas, el volumen de sedimento no ocupado por las cuevas, o la superficie de intercambio entre las distintas zonas intermareales usando un test de Kruskal-Wallis para cada una de estas variables (Zar 1999).

Características del agua de poro en áreas naturales bioturbadas y no bioturbadas.

Para evaluar si existen diferencias en las características del agua de poro entre zonas naturales con y sin cangrejos, se realizó un muestreo de sedimento en la planicie de marea. En los “cangrejales” (*i.e.*, zonas con altas densidades de cangrejos; más de 30 cuevas m^{-2}), se tomaron cilindros verticales de sedimento (desde la pared de una cueva hasta 3 cm de la misma, $n = 5$), y cilindros radiales en torno de una cueva (3-5 cm de profundidad, $n = 5$). En áreas sin cuevas de cangrejos, sólo se tomaron cilindros verticales de sedimento ($n = 5$). En estas muestras de sedimento se determinó el contenido de cloruros, sulfato, nitrato, amonio, y Fe^{+2}/Fe^{+3} , para lo cual fueron inmediatamente transportadas al laboratorio y seccionadas en intervalos de 0-0.5, 0.5-1.5, 1.5-3, 3-5, 5-7 y 7-10 cm de profundidad o distancia a la pared de la cueva, en el caso de las muestras radiales. Luego de su ultracentrifugación ($9000\times g$ durante 10 minutos), el agua de poro obtenida fue filtrada ($0.45 \mu m$) y conservada a $-20^{\circ}C$ hasta su análisis. El seccionamiento y manipulación de estas muestras de sedimento fue realizado bajo atmósfera de N_2 dentro de las 6 hs de recogida la muestra.

Efecto de la actividad de *Neohelice granulata* en las características del agua de poro y del sedimento. Para evaluar si existe un efecto directo de *N. granulata* en el

contenido y distribución de nutrientes y otros solutos en el agua de poro, se realizó un experimento de campo de manipulación de cangrejos. El experimento fue realizado en una línea paralela a la línea de marea en el borde de la marisma, y consistió de dos tratamientos: (1) inclusiones de cangrejos adultos en cuevas artificialmente construidas ($n = 4$, tratamiento B+C); y (2) exclusiones de cangrejos usadas como tratamientos "control", sin efectos de cangrejos o cuevas ($n = 4$, tratamiento NBC). Ambos tratamientos consisten en cuadrados (80 cm lado) con paredes laterales de PVC sólido (80 cm lado \times 70 cm alto) enterradas 70 cm en el sedimento. Estas paredes fueron continuadas 40 cm de alto sobre la superficie con una malla plástica (apertura 0.5 cm) para incluir (B+C) o excluir (NBC) cangrejos adultos en las diferentes cajas. Las cuevas artificialmente construidas (30 cm profundidad; 30 cuevas m^{-2}) fueron generadas introduciendo un tubo de PVC (3 cm diámetro) en el sedimento. En el tratamiento B+C se agregó un cangrejo adulto por cueva. Todas las cajas fueron periódicamente observadas para asegurar la supervivencia y actividad de los cangrejos (en B+C), y que las cajas control (NBC) no fueran colonizadas por cangrejos. Las muestras de sedimento fueron tomadas luego de 90 días del inicio de este experimento. En el tratamiento B+C, se tomaron muestras verticales (desde la pared de la cueva hasta 3 cm de la misma) y radiales (entre los 3 y 6 cm de profundidad) de sedimento. Mientras que en el tratamiento NBC, se tomaron sólo muestras verticales. Para reducir los efectos de borde, las muestras fueron tomadas de la parte central de la caja, y fueron colectadas y manipuladas como se describió anteriormente. La H_0 de no efecto de los cangrejos en las variables medidas entre los diferentes tratamientos y profundidades, fue evaluada usando ANOVA de dos vías (Zar 1999). La H_0 de no efecto de los cangrejos en las

variables medidas para los perfiles radiales entre las diferentes distancias a la pared de la cueva, fue evaluada usando ANOVA de una vía (Zar 1999).

Efecto de las cuevas de *Neohelice granulata* en las características del agua de poro y sedimento. Para discriminar los efectos de las actividades de los cangrejos, de los efectos de sus cuevas (efectos directos e indirectos); se realizó un segundo experimento de campo. Para esto, se construyeron cajas ($n = 12$) idénticas a las anteriores, colocadas en la misma zona intermareal. El experimento consistió en tres tratamientos: (1) inclusiones de cangrejos adultos en cuevas artificialmente construidas (B+C); (2) cuevas no ocupadas artificialmente construidas (tratamiento B); y (3) exclusiones de cangrejos y cuevas usadas como tratamiento “control” sin cuevas ni cangrejos (NBC). El tratamiento B fue realizado excluyendo cangrejos que habitaban cuevas artificialmente construidas. Luego de 3 meses de iniciado el experimento, se tomaron las muestras de sedimento del centro de cada caja, como se describió anteriormente. En los tratamientos B+C y B, se tomaron muestras verticales (desde la pared de la cueva hasta 3 cm de la misma) y radiales (entre los 3 y 6 cm de profundidad) de sedimento; y en el tratamiento NBC se tomaron sólo muestras verticales. La H_0 de no efecto de la actividad de los cangrejos o de las cuevas en las variables medidas entre los diferentes tratamientos y profundidades, fue evaluada usando ANOVA de dos vías (Zar 1999).

Efecto de *Neohelice granulata* en el transporte de material particulado en la columna de sedimento. Para evaluar el efecto de *N. granulata* en el transporte de partículas en la columna de sedimento, se realizó un experimento agregando microesferas de vidrio (diámetro 20-70 μm) a la superficie del sedimento. Se colocaron cajas de exclusión ($n = 10$; 50 cm diámetro y 20 cm alto) construidas con malla de plástico; 5 con tapa del mismo material para evitar el ingreso de cangrejos (tratamiento “sin

cangrejos”), y 5 sin tapa para permitir el ingreso de cangrejos (tratamiento “con cangrejos”). La capa superficial (1 cm) de sedimento fue removida de todas las cajas, y mezcladas en proporción 1:1 (v:v) con micro-esferas de vidrio. Esta mezcla se colocó uniformemente en la superficie de las cajas. Luego de 30 días, se tomaron muestras verticales de sedimento, que se fraccionaron en los mismos intervalos que se emplearon para el análisis de agua de poro. Cada fracción fue secada, pesada, y tratada con 20 ml de peróxido de hidrógeno al 5% por 48 hs para remover la materia orgánica. Luego de esto, se mezclaron 10 gotas de cada muestra con 10 gotas de glicerol al 30% (para facilitar la resuspensión de las micro-esferas), y cada muestra fue montada en un portaobjetos. El contenido de micro-esferas de cada fracción de sedimento fue cuantificado por conteo de micro-esferas bajo microscopio de luz (40x aumento). La H_0 de no diferencia en el contenido de micro-esferas entre los tratamientos y profundidades fue evaluada usando ANOVA de dos vías (Zar 1999).

Para cuantificar la intensidad de bioturbación, (*i.e.*, la intensidad de desplazamiento vertical de partículas), se calculó el coeficiente de bioturbación (D_B) para cada tratamiento, por medio del análisis de los gradientes observados de micro-esferas siguiendo el procedimiento de Wheatcroft (1992) para trazadores no-radiactivos. Los perfiles experimentales de micro-esferas fueron simulados resolviendo iterativamente la curva teórica (ver Wheatcroft 1992) usando diferentes valores de D_B , que fue asumido constante para todas las profundidades. Se adoptó el valor de D_B que generó menores medias residuales cuando se compararon los perfiles teóricos y experimentales de micro-esferas. La H_0 de no efecto de la actividad de los cangrejos en D_B entre tratamientos fue evaluada usando test de t (Zar 1999).

Efecto de *Neohelice granulata* en las tasas y vías de remineralización de MO. Para cuantificar las tasas y vías de degradación de materia orgánica, se aplicó el modelo diagenético inverso formulado por Furukawa *et al.* (2004) a los sedimentos de la Laguna Costera Mar Chiquita, empleando los datos de los perfiles verticales experimentales. Este modelo uni-dimensional inverso determina las tasas de degradación de MO (kG) por medio de la búsqueda simultánea de acuerdo entre perfiles verticales de concentraciones de aceptores de electrones medidas y calculadas por el modelo. Las especies geoquímicas consideradas fueron oxígeno (O₂), sulfato (SO₄⁻²), nitrato (NO₃⁻), y amonio (NH₄⁺). Las reacciones tenidas en cuenta para la aplicación del modelo diagenético fueron tomadas de Berg *et al.* (2003)(ver Tabla I.1). Las expresiones de las velocidades de reacción y tasas de producción neta de cada especie geoquímica fueron tomadas de Berg *et al.* (2003), y se encuentran resumidas en la Tabla I.2.

Los parámetros requeridos para el modelo están resumidos en la Tabla I.3; algunos de estos parámetros fueron determinados a través de medidas directas durante este estudio, y otros fueron tomados de trabajos previos luego de realizar una exhaustiva revisión bibliográfica (ver Tabla I.3). La densidad del sedimento (ρ) de cada tratamiento experimental (B+C, B y NBC) fue determinada mediante el peso de un volumen conocido de sedimento (Robertson *et al.* 1999). La porosidad (ϕ) del sedimento bioturbado y no bioturbado fue calculada a partir de la densidad de dichos sedimentos mismo siguiendo a Robertson *et al.* (1999). El coeficiente de bioturbación (D_B) fue obtenido como se describió anteriormente. El coeficiente de irrigación (α) fue estimado asumiendo cuevas cilíndricas de 1 m de profundidad (Iribarne *et al.* 1997) siguiendo a Koretsky *et al.* (2002). Para esta estimación, se calculó el espesor de la capa óxica (ver

Koretsky *et al.* 2002), empleando los perfiles radiales de O₂ fueron calculados a partir de los valores de Eh y pH medidos (Stumm & Morgan 1996). A todas las especies disueltas se le asignó el mismo valor de α . Los coeficientes de difusión a dilución infinita para cada especie fueron tomados de Furukawa *et al.* (2004) y corregidos con la porosidad del sedimento de Mar Chiquita (ver Tabla I.3). El modelado fue aplicado usando 100 combinaciones aleatorias de valores iniciales para las tasas de degradación de MO a distintas profundidades (*i.e.*, kG) para cada tratamiento B+C, B y NBC, con el fin de que la optimización conduzca a un mínimo global. Se debe destacar que, a diferencia de otros trabajos publicados, este procedimiento involucra el ajuste de un solo parámetro, el valor de kG, ya que todos los demás parámetros fueron obtenidos directa e independientemente, o estimados desde la literatura. Se estimó el error cometido en la concordancia entre perfiles medidos y modelados para que éste nunca supere el 10%.

Siguiendo las ecuaciones publicadas en Furukawa *et al.* (2004) y Meysman *et al.* (2005), se emplearon los resultados del modelo para determinar los perfiles verticales de degradación de MO por cada aceptor de electrones (*i.e.*, oxígeno, nitrato y sulfato). De acuerdo con las estequiometrías de reacción (ver Berg *et al.* 2003), se calcularon las tasas de consumo de oxígeno, nitrato y sulfato debidas a la degradación de MO. Una vez estimada estas tasas, se calculó para cada tratamiento el uso relativo (%) de cada aceptor de electrón integrado en los 10 cm superiores de sedimento.

Análisis de agua de poro y sedimentos. En agua de poro se determinaron las concentraciones de cloruro (Cl⁻), sulfato (SO₄⁻²), nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺), y hierro (Fe⁺² y Fe⁺³). La concentración de cloruro fue medida como salinidad usando refractómetro de mano. Las concentraciones de sulfato y nitrato fueron analizadas por

medio de cromatografía iónica luego de la eliminación de Cl^- (columna Universal Anion[®] de 150mm, fase móvil $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1.25/0.85 mM, detección de conductividad con supresión). La concentración de amonio (NH_4^+) fue determinada con el método del azul de indofenol (Solórzano 1969), y el contenido de hierro disuelto (Fe^{+2} y Fe^{+3}) fue medido con el método de la 1,10-fenantrolina (Tamura 1974) antes y después del tratamiento de la muestra con clorhidrato de hidroxilamina 1M. El hierro en fase sólida (*i.e.*, Fe(II) y Fe(III)) fue medido en los pellets de sedimentos inmediatamente después de la centrifugación. Fe(II) y Fe(III) fueron extraídos de los pellets de sedimento con HCl 0.5 M durante 1h bajo atmósfera de N_2 (“Fe extraíble con HCl”; Kostka & Luther 1994) y analizado con el método de la 1,10-fenantrolina.

Los perfiles verticales y radiales de potencial redox (Eh) para cada tratamiento experimental ($n = 5$) fueron medidos *in situ* con un electrodo combinado de Pt con referencia interna de Ag/AgCl. Los valores obtenidos fueron corregidos con respecto al electrodo de referencia de hidrógeno.

RESULTADOS

Efecto de las cuevas de *Neohelice granulata* en la interfase agua-sedimento. La densidad de cuevas fue diferente a través de los niveles del intermareal, siendo mayor en los niveles alto y medio de la marisma, y más baja en la planicie de marea media y baja (test K-W: $H_{6, 70} = 55.33$, $p < 0.001$; Fig. I.1A). El volumen de sedimento no ocupado por cuevas fue mayor en los niveles medio y bajo de la planicie de marea, y en la marisma alta (test K-W: $H_{6, 70} = 50.15$, $p < 0.001$; Fig. I.1B). El área de intercambio agua-sedimento fue diferente entre las distintas zonas intermareales, mostrando los menores valores en la planicie de marea media y baja, y en la marisma alta (test K-W:

$H_{6,70} = 50.23$, $p < 0.001$; Fig. I.1C).

Características del agua de poro en áreas naturales bioturbadas y no bioturbadas.

La salinidad fue más alta en sedimentos de la superficie en los dos sitios, mostrando efecto de interacción entre sitio y profundidad (Sitio x Profundidad: $F_{5,48} = 4.10$, $p < 0.05$, Fig. I.2A). La concentración de sulfato en sedimento superficial fue similar para el cangrejal (*i.e.*, áreas naturales con altas densidades de cangrejos y cuevas) y el no-cangrejal (*i.e.*, áreas naturales sin cuevas; $x = 62.59$, $DE = 12.4$ mM, $n = 5$; $x = 60.33$, $DE = 8.56$ μ M, $n = 5$; respectivamente), pero en sedimento profundo las concentraciones más altas fueron encontradas en el cangrejal (Sitio x Profundidad: $F_{5,48} = 2.74$, $p < 0.05$; Fig. I.2B). Las concentraciones de nitrato mostraron interacción entre el sitio y la profundidad (Sitio x Profundidad: $F_{5,48} = 2.48$, $p < 0.05$; Fig. I.2C). Los perfiles de nitrato en sedimento con cangrejos presentan la concentración máxima entre los 0.5 y 1.5 cm de profundidad. La concentración de nitrato integrada en los 10 cm de profundidad fue mayor en el cangrejal que en el sitio no-cangrejal ($x = 15.59$, $DE = 8.05$ μ M, $n = 30$; $X = 12.80$, $DE = 5.70$ μ M, $n = 30$; respectivamente). En sedimento sin cangrejos, el amonio mostró concentraciones bajas para todas las profundidades, mientras en sitios con cangrejos, el amonio alcanzó la concentración máxima entre los 3 y 4 cm de profundidad (Sitio x Profundidad: $F_{5,48} = 10.67$, $p < 0.05$; Fig. I.2D). El contenido de hierro disuelto fue menor que el límite de detección (1 μ M). La proporción Fe (II)/Fe (II+III) mostró efecto de interacción entre los factores (Sitio x Profundidad: $F_{5,48} = 8.07$, $p < 0.05$). En los sitios desnudos, esta proporción mostró un valor máximo entre 2 y 3 cm de profundidad, mientras en los sitios de cangrejal los valores no cambiaron con la profundidad.

La salinidad alrededor de las cuevas de *N. granulata* no mostró diferencias con la distancia a la pared de la cueva (Fig. I.2E). La concentración de sulfato fue más alta entre los 0 y 1.5 cm de distancia a la cueva ($F_{5, 24} = 15.142$, $p < 0.05$; Fig. I.2F). La concentración de nitrato mostró el valor más alto entre los 3-4 cm de distancia a la cueva ($F_{5, 24} = 5.757$, $p < 0.05$; Fig. I.2G). El contenido de amonio no fue diferente entre las diferentes distancias a la pared de la cueva (Fig. I.2H). La proporción Fe (II) /Fe (II+III) no cambió con la distancia a la cueva.

Efecto de la actividad de *Neohelice granulata* en las características del agua de poro y del sedimento. La salinidad del agua de poro en ambos tratamientos del experimento de exclusión disminuyó con la profundidad, sin mostrar efecto de interacción (ANOVA de 2 vías, Profundidad: $F_{5, 35} = 16.15$, $p < 0.05$). En superficie, la salinidad fue superior en tratamientos NBC que en los B+C, mientras que en el intervalo de 7 a 10 cm de profundidad fue menor en NBC que en B+C (Tratamiento: $F_{1, 35} = 3.35$, $p < 0.05$; Fig. I.3A). La concentración de sulfato en ambos tratamientos NBC y B+C disminuyó con profundidad pero sin mostrar diferencias entre los tratamientos (Profundidad: $F_{5, 35} = 5.13$, $p < 0.05$; Fig. I.3B). La concentración de nitrato mostró efecto de interacción entre los tratamiento y la profundidad (Tratamiento x Profundidad: $F_{5, 35} = 3.00$, $p < 0.05$; Fig. I.3C). La concentración más alta de nitrato se encontró entre los 2 y 3 cm de profundidad en el tratamiento B+C. Sin embargo, no hubo diferencias en las capas más profundas. La concentración de amonio mostró interacción significativa (Tratamiento x Profundidad: $F_{5, 35} = 3.73$, $p < 0.05$). En las dos capas superiores, la concentración de amonio fue menor en el tratamiento no-bioturbado NBC, mientras que no hubo diferencias en el sedimento más profundo (Fig. I.3D). La proporción $\text{NO}_3^- / (\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+)$ mostró interacción entre el tratamiento y la profundidad (Tratamiento x

Profundidad: $F_{5, 35} = 9.80$, $p < 0.05$; Fig. I.4A). El test *a posteriori* indicó que esta proporción fue superior para tratamientos NBC en la capa superior. Sin embargo, en las capas más profundas esta relación de compuestos de N oxidados fue superior en los tratamientos B+C. La proporción de Fe(II)/Fe(II+III) extraíble mostró interacción entre los factores, y fue mayor en los intervalos superiores y más profundos en el tratamiento B+C, pero no hubo diferencias entre ambos tratamientos en el intervalo correspondiente a profundidades medias (Tratamiento x Profundidad: $F_{5, 35} = 3.81$, $p < 0.05$; Fig. I.4B).

La salinidad en el tratamiento B+C decreció en forma radial con la distancia a la pared de la cueva ($F_{5, 18} = 6.42$, $p < 0.05$; Fig. I.5A). La concentración de sulfato decreció con el incremento de la distancia a la cueva hasta los primeros 4 cm de distancia ($F_{5, 18} = 2.98$, $p < 0.05$; Fig. I.5B). El contenido de nitrato aumentó entre 1 cm y 6 cm de distancia a la cueva, y se mantuvo constante entre los 6 y 10 cm ($F_{5, 18} = 3.39$, $p < 0.05$; Fig. I.5C). La concentración de amonio fue más alta entre los 2 y 5 cm de distancia que en el resto del perfil radial ($F_{5, 18} = 3.75$, $p < 0.05$; Fig. I.5D).

Efecto de las cuevas de *Neohelice granulata* en las características del agua de poro y sedimento. La salinidad del agua de poro fue más alta en el tratamiento B+C que en los tratamientos B y NBC, sin mostrar diferencias con la profundidad para ninguno de los tratamientos (Tratamiento: $F_{2, 54} = 9.49$, $p < 0.05$; Fig. I.6A). La concentración de sulfato mostró efecto de interacción entre tratamiento y profundidad (Tratamiento x Profundidad: $F_{10, 54} = 7.11$, $p < 0.05$; Fig. I.6B). El test *a posteriori* LSD indicó que la concentración de sulfato fue mas alta para el tratamiento B+C en las capas superficiales de sedimento; sin embargo, no hubo deferencias en las capas más profundas. La concentración de nitrato en el agua de poro fue diferente entre los tres tratamientos y en las diferentes profundidades, mostrando efecto de interacción (Tratamiento x

Profundidad: $F_{10, 54} = 3.10$, $p < 0.05$; Fig. I.6C). La mayor concentración de nitrato se encontró en el intervalo de 0.5 - 1.5 cm de profundidad para B+C, y en general, la concentración de nitrato fue más alta en este tratamiento bioturbado que en NBC y B. En el tratamiento NBC la concentración de nitrato fue baja para todas las profundidades, mientras que en el tratamiento B la concentración de nitrato fue más alta en la capa superficial de sedimento (Fig. I.6C). La concentración de amonio mostró efecto de interacción (Tratamiento x Profundidad: $F_{10, 54} = 7.09$, $p < 0.05$; Fig. I.6D). El contenido de amonio fue bajo en la capa superficial de sedimento para todos los tratamientos, pero en los intervalos más profundos fue menor para el tratamiento B+C que para B y NBC. El Eh fue diferente para los tres tratamientos, mostrando efecto de interacción entre los factores (Tratamiento x Profundidad: $F_{10, 72} = 3.16$, $p < 0.05$; Fig. I.7). Los valores de Eh fueron más altos (condiciones óxicas) en el primer intervalo de profundidad para todos los tratamientos, y en las capas más profundas fue más alto para el tratamiento bioturbado B+C. Las diferencias fueron mayores entre los tratamientos sin cangrejos (NBC y B) que entre los tratamientos B+C y B. El Eh en torno a las cuevas en los tratamientos B+C y B mostró diferencias entre tratamientos y la distancia a la pared de la cueva (Tratamiento: $F_{1, 48} = 36.84$, $p < 0.05$; Distancia: $F_{5, 48} = 221.10$, $p < 0.05$; Fig. I.8). En B+C, los valores de Eh fueron más altos que en B; y en ambos tratamientos el sedimento fue óxico en el primer centímetro, volviéndose más reducido (menores valores de Eh) cuando aumenta la distancia a la pared de la cueva.

Efecto de *Neohelice granulata* en el transporte de material particulado en la columna de sedimento. El número de micro-esferas halladas por gramo de sedimento fue diferente para los dos tratamientos y para las distintas profundidades, mostrando efecto de interacción (Tratamiento x Profundidad: $F_{5, 48} = 16.40$, $p < 0.05$; Fig. I.9). En

la capa superficial, el contenido de micro-esferas fue similar para ambos tratamientos, pero en las capas más profundas este contenido fue menor en el tratamiento “sin cangrejos” que en el tratamiento “con cangrejos”.

El coeficiente de bioturbación (D_B) fue diferente entre los tratamientos (test- t : $t = 10.98$, g.l. = 4, $p < 0.001$). En el tratamiento bioturbado, el valor de D_B fue 15 veces mayor ($D_B = 251 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$, $DE = 47 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$) que en el tratamiento no bioturbado ($D_B = 15 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$, $DE = 6 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este Capítulo muestran que la actividad de *Neohelice granulata* y sus cuevas tienen importantes efectos en las características químicas del agua de poro de sedimentos intermareales. *N. granulata* afecta el transporte de material particulado en la columna de sedimento, mezclando los primeros centímetros de sedimentos en pocos días. Además, las actividades del este cangrejo incrementan el contenido de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y cambia la distribución de solutos en el agua de poro del sedimento. El potencial redox de sedimentos con actividad de bioturbación es más alto que el de sedimentos sin bioturbación, revelando que la bioturbación oxigena el sedimento. Los experimentos realizados muestran que la presencia y la actividad de este cangrejo tiene efectos más intensos que los producidos por la sola presencia de sus cuevas.

Las características de agua de poro en las áreas naturales bioturbadas y no-bioturbadas difieren de las observadas en los experimentos. Sin embargo, si los perfiles de agua de poro de áreas naturales se corrigen por la salinidad, esta inconsistencia desaparece. Los perfiles corregidos de agua de poro de áreas naturales están en

concordancia con los perfiles obtenidos en el experimento de exclusión realizado para evaluar el efecto de actividades del cangrejo en las características del agua de poro. Tanto los perfiles naturales como los correspondientes al primer experimento muestran un importante efecto de evaporación, que no estaba presente en el segundo experimento debido a cambios en las condiciones climáticas. La diferencia puede ser asociada con la alta temperatura y bajo nivel de lluvias durante el muestreo en áreas naturales y el primer experimento. Además, en los muestreos y en el primer experimento, la aireación puede incrementar la desnitrificación acoplada a la nitrificación, por el aumento de la disponibilidad de oxígeno y entonces estimulando la oxidación aeróbica de amonio (Rysgaard *et al.* 1994). Así, estas condiciones ambientales extremas que generan el desecamiento y aireación del sedimento serían responsables de las bajas concentraciones de amonio (consumido por oxidación aeróbica, ver Qiu & McComb 1996) en el sedimento medida durante en el muestreo y primer experimento, comparadas con las concentraciones del segundo experimento.

El sedimento superficial con o sin bioturbación es típicamente óxico (Fenchel *et al.* 1998, este Capítulo). El sedimento bioturbado permanece con valores de Eh superiores que el sedimento no-bioturbado (sin cangrejos o con cuevas no ocupadas), donde los valores Eh reflejan que las condiciones sulfhídricas son alcanzadas rápidamente a medida que la profundidad aumenta. Sin embargo, la interacción entre la profundidad y el tipo del sedimento (*i.e.*, bioturbado o no bioturbado por cangrejos) muestra que la bioturbación no sólo afecta los valores de Eh, sino que también afecta la forma de perfiles de Eh en función de la profundidad (*i.e.*, la disminución de Eh con la profundidad es menor en sedimentos bioturbados con respecto a sedimentos no-bioturbados). Los valores de Eh alrededor de cuevas ocupadas y no ocupadas muestran

un patrón similar. Estos resultados indican que *N. granulata* incrementa directamente (bioturbación) e indirectamente (presencia de cuevas) la oxigenación del sedimento. Así, los cangrejos pueden favorecer el crecimiento y la productividad de vegetación de la marisma (ver Bortolus & Iribarne 1999, Bortolus *et al.* 2002, 2004), reduciendo la producción de sulfuros en el sedimento, que puede ser tóxico para fauna bentónica (Herman *et al.* 1999) y para la vegetación (Bradley & Morris 1992); e incrementando disponibilidad de oxígeno. La proporción entre el incremento de área y el volumen de sedimento ocupado por cuevas (optimizando el área de intercambio y la disponibilidad de sedimento, Fig. I.1D) sugiere que los cangrejos producen un mayor efecto positivo para la vegetación en los sedimentos de la marisma que en la planicie de marea. En la marisma, la presencia de cangrejos es facilitada por la presencia de plantas (Bortolus *et al.* 2002), donde las cuevas de los cangrejos también tienen efectos positivos en plantas (Bortolus & Iribarne 1999, Bortolus *et al.* 2002) debido a la disminución de niveles de anoxia durante los períodos de inundación.

Trabajos previos han mostrado la influencia de otros organismos bioturbadores, como poliquetos y otros cangrejos, en las actividades microbianas (Aller 1994), características físico-químicas (Kostka *et al.* 2002) y ciclos de nutrientes (Kristensen & Blackburn 1987) en sedimentos de marismas. Sin embargo hasta el momento, el impacto de grandes bioturbadores como *N. granulata* ha recibido poca atención (pero ver Ziebis *et al.* 1996). Por ejemplo, las cuevas de los cangrejos violinistas *Uca pugnax* se extienden entre 5 y 25 cm de profundidad, con densidades de 224-480 cuevas m⁻²; incrementando los valores de Eh, mezclando continuamente los primeros 2-3 cm de sedimento (Bertness 1985), e incrementando el transporte de partículas y el intercambio entre agua-sedimento por medio de sus actividades (Kristensen 1985). Similarmente, *N.*

granulata mezcla completamente al menos los primeros 10 cm de sedimento en 1 mes (este Capítulo). El coeficiente de bioturbación para sedimentos de Mar Chiquita ($250 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$) es bajo en comparación con los estimados para sedimentos bioturbados por *Uca pugnax* ($\sim 1000 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$). Sin embargo, los valores de D_B para el presente sitio de estudio es similar a los reportados para planicies de marea bioturbadas por *Macoma balthica* (Paalberg *et al.* 2005), y es alto si es comparado con valores de entre 0.2 y $150 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$ estimados para sedimento bioturbado por poliquetos (Wheatcroft 1992; Berg *et al.* 2001, 2003; François *et al.* 2002). El alto grado de mezcla generado por este cangrejo tiene un gran efecto en el transporte de aceptores de electrones y de materia orgánica (tanto disuelta como particulada), estimulando así los procesos de remineralización. La tasa neta de remineralización de MO estimada por el modelo diagenético es mucho más alta en sedimentos bioturbados ($k_G = 10.6$, $DE = 6.1 \mu\text{M s}^{-1}$) que en sedimentos no-bioturbados ($k_G = 4.9$, $DE = 17.8 \mu\text{M s}^{-1}$ si hay cuevas no habitadas; y $k_G = 0.02$, $DE = 0.013 \mu\text{M s}^{-1}$ si no hay cuevas). Por otra parte, en sedimentos no-bioturbados, la mayor parte de la remineralización de MO está restringida a los primeros 5 mm de sedimento (capa óxica), mientras que en sedimentos bioturbados, la remineralización de MO también tiene lugar en las capas más profundas de sedimento (ver Fig. I.10A). Las diferencias encontradas entre cuevas ocupadas y no ocupadas indican que la alta tasa de remineralización de MO se debe tanto al incremento en la penetración de oxígeno en el sedimento como al transporte activo de MO (y de aceptores de electrones) entre las capas superficiales y profundas del sedimento. Así, estos resultados muestran que *N. granulata* estimula directa- (actividad de bioturbación) e indirectamente (presencia de cuevas) la tasa de remineralización de MO.

La actividad de *Neohelice granulata* también afecta las vías de remineralización de MO. Los resultados del modelo aquí aplicado muestran que la tasa aeróbica de remineralización de MO integrada en la columna de sedimento es varios órdenes de magnitud más alta en sedimentos bioturbados ($78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con cuevas ocupadas, $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con cuevas no ocupadas) que en sedimentos no-bioturbados ($4.3 \times 10^{-5} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por otra parte, las vías anaeróbicas también son estimuladas por *N. granulata*. Los perfiles verticales de tasas de desnitrificación (Fig. I.10B) indican que la mayor parte de este proceso tiene lugar entre el primer y tercer centímetro de sedimento en sitios bioturbados, aunque este proceso sea estimulado en toda la columna de sedimento. Así, el uso relativo de nitrato para la remineralización de MO integrado en la columna de sedimento es varias veces más alto en sedimento bioturbado (5.9 % y 2.2 % para sedimentos con cuevas ocupadas y no ocupadas, respectivamente) que en sedimento no-bioturbado (1.6 % de utilización de nitrato).

Al igual que ocurre en sedimentos bioturbados por el poliqueto *Nereis diversicolor*, donde la nitrificación ocurre entre los 0.9 y 1.5 mm de profundidad y la reducción de nitrato ocurre en las capas más profundas concentradas en nitrato (Nielsen *et al.* 2004), *N. granulata* también afecta las concentraciones de nitrato en relación con la profundidad y distancia a las cuevas. Por otra parte, la interacción entre la profundidad y el tipo de sedimento (*i.e.*, sin cuevas, con cuevas no ocupadas o con cuevas ocupadas) encontrada para el nitrato, indica que las diferencias en la concentración de nitrato son debidas tanto a la profundidad como a la presencia/ausencia de cuevas y/o cangrejos (*i.e.*, la concentración de nitrato no cambia con la profundidad en sitios sin cuevas; muestra un máximo superficial cuando hay cuevas no ocupadas; y muestra un máximo subsuperficial cuando hay actividad de

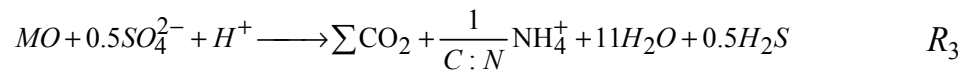
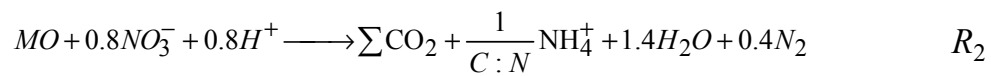
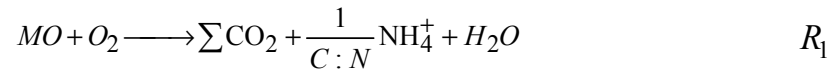
cangrejos dentro de las cuevas). En sedimentos bioturbados, la nitrificación está restringida a la capa superior óxica de sedimento (0.5-1.5 cm de profundidad). Perfiles radiales en torno a las cuevas de *N. granulata* muestran un patrón similar a este. Si hay cuevas no ocupadas, la tasa de desnitrificación es más alta en la capa comprendida entre los 0.5 y 1.5 cm, y la nitrificación ocurre predominantemente en los 5 mm superiores. El contenido de amonio en agua de poro de sedimentos bioturbados es menor que en sedimentos no bioturbados (aún cuando hay cuevas no ocupadas presentes), este patrón puede verse en la Fig. I.4A, donde la proporción entre las formas oxidadas y reducidas del nitrógeno es más alta en los sedimentos con cuevas ocupadas, probablemente debido a la alta condición redox de estos sedimentos. La menor concentración de NID integrada en la profundidad de sedimento analizada en sitios bioturbados comparada con sitios no bioturbados puede deberse al aumento del flujo de NID desde el sedimento a la columna de agua (ver Capítulo III) y como se ha descrito también para sedimentos bioturbados por poliquetos (*i.e.*, *N. diversicolor*, Kristensen & Hansen 1999). Así, a pesar del aporte de nitrógeno vía excreciones de cangrejos y vía depositación pasiva de sedimento rico en materia orgánica y nitrógeno orgánico dentro de las cuevas (Botto *et al.* 2006), las paredes de las cuevas de cangrejos pueden actuar como las paredes de cuevas de poliquetos, estimulando la actividad microbiana (Hansen *et al.* 1980, Kristensen 1985, estos resultados), y aumentando no sólo la producción sino también la exportación de nitrógeno remineralizado.

Una de las fuentes más importantes de nutrientes para las aguas estuarinas y costeras proviene de la materia orgánica estuarial, aunque sólo una pequeña fracción de la misma es exportada como detritos (Nixon 1980). En estuarios con sedimentos bioturbados, esto puede deberse a la deposición pasiva de materia orgánica particulada

dentro de las cuevas (ver Botto *et al.* 2006) o al enterramiento en el sedimento (Gutiérrez *et al.* 2006), pero también a las altas tasas de remineralización de MO que tienen lugar en sedimentos bioturbados (Kostka *et al.* 2002, Gribsholt *et al.* 2003, Furukawa *et al.* 2004, este Capítulo). Los metabolitos y nutrientes producidos por la degradación de MO pueden ser consumidos en el estuario (soportando la trama trófica estuarial), o exportado hacia el océano costero como materia orgánica disuelta y nutrientes disueltos. Considerando la extensión tanto geográfica como local de los cangrejales (ver Iribarne *et al.* 2005, Botto *et al.* 2006), las altas densidades de *N. granulata*, el gran tamaño de sus cuevas y sus altas tasas de remoción de sedimentos (Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000), esperamos que los efectos en ciclos biogeoquímicos tengan importantes consecuencias a gran escala. Los grandes cambios biogeoquímicos inducidos por este cangrejo afectan las tasas y vías de degradación de materia orgánica en sedimentos intermareales, y es de esperarse un importante efecto en los procesos microbianos y flujos de nutrientes hacia sistemas vecinos. Así mismo, se esperan efectos similares para otros estuarios habitados por otras especies cavadoras (*i.e.*, *Callinassa* y *Upogebia* en la costa oeste de USA; Posey 1986, Posey *et al.* 1991) que mantienen cuevas permanentemente abiertas.

Tabla I.1. Reacciones químicas de las especies geoquímicas consideradas en el modelo diagenético (Berg *et al.* 2003).

Reacciones redox primarias:



Reacciones secundarias:

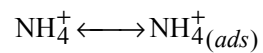
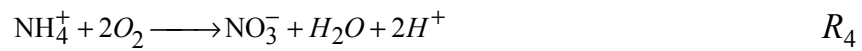


Tabla I.2. Expresiones de las leyes de velocidad (Berg *et al.* 2003), y tasas de reacciones netas consideradas en el modelo diagenético (Furukawa *et al.* 2004).

Leyes de velocidad:

$$R_1 = kG \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]}$$

$$R_2 = kG \frac{[NO_3^-]}{K_{NO_3^-} + [NO_3^-]} \frac{K'_{O_2}}{K'_{O_2} + [O_2]}$$

$$R_3 = kG \frac{[SO_4^{2-}]}{K_{SO_4^{2-}} + [SO_4^{2-}]} \frac{K'_{NO_3^-}}{K'_{NO_3^-} + [NO_3^-]} \frac{K'_{O_2}}{K'_{O_2} + [O_2]}$$

$$R_4 = k_4 [NH_4^+] [O_2]$$

Reacciones de equilibrio:

$$[NH_4^+ (ads)] = \frac{\phi}{\rho(1-\phi)} k_N [NH_4^+]$$

Tasas de reacción neta:

$$\sum R_{O_2} = \frac{1-\phi}{\phi} R_1 - 2R_4$$

$$\sum R_{NO_3^-} = -0.8R_2 + R_4$$

$$\sum R_{SO_4^{2-}} = -\frac{1-\phi}{\phi} \frac{1}{2} R_3$$

$$\sum R_{NH_4^+} = \frac{1-\phi}{\phi} (C:N)(R_1 + R_2 + R_3) - R_4$$

$$\sum R_{\Sigma CO_2} = \frac{1-\phi}{\phi} (R_1 + R_2 + R_3)$$

Tabla I.3. Parámetros empleados en el modelo diagenético inverso para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC.

Parámetro	Valor			Comentarios
	C+B	B	NBC	
Densidad de cuevas (cueva m ⁻²)	30	30	0	
Radio de cuevas (m)	0.018	0.018	-	Iribarne <i>et al.</i> 1997, Botto & Iribarne 2000
ρ (g m ⁻²)	1.72	1.72	1.77	Densidad del sedimento.
φ	0.555	0.555	0.435	Porosidad del sedimento.
C:N	19.5	19.5	19.5	F Botto datos no publicados
D_B (m ² s ⁻¹)	7.8×10^{-10}	1.14×10^{-10}	1.14×10^{-10}	
α (s ⁻¹)	1.06×10^{-7}	0	0	
ω (cm año ⁻¹)	0.01	0.01	0.01	Tasa de sedimentación
$D_B^{O_2}$ (m ² s ⁻¹)	1.23×10^{-9}	5.69×10^{-10}	5.5×10^{-10}	Coeficientes de difusión netos ($D_S + D_B$). D_S es el coeficiente de difusión molecular corregido por la tortuosidad: $D_S = \frac{D_O}{1 - 2 \ln \phi^2}$
$D_B^{NO_3^-}$ (m ² s ⁻¹)	1.17×10^{-9}	5×10^{-10}	4.84×10^{-10}	
$D_B^{NH_4^+}$ (m ² s ⁻¹)	1.18×10^{-9}	5.13×10^{-10}	4.97×10^{-10}	
$D_B^{SO_4^{2-}}$ (m ² s ⁻¹)	2.22×10^{-8}	2.15×10^{-8}	2.06×10^{-8}	
K_{O_2}, K'_{O_2}	8×10^{-6}	8×10^{-6}	8×10^{-6}	Constantes de Monod (Boudreau <i>et al.</i> 1998)
$K_{NO_3^-}, K'_{NO_3^-}$	3×10^{-5}	3×10^{-5}	3×10^{-5}	
$K_{SO_4^{2-}}, K'_{SO_4^{2-}}$	0.001	0.001	0.001	
k_N	1.4	1.4	1.4	Constante de adsorción de N (Mackin & Aller 1984)
k_4 (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	6.3×10^{-1}	6.3×10^{-1}	6.3×10^{-1}	Constante de velocidad para la oxidación de amonio con O ₂ (Berg <i>et al.</i> 2003)
$[O_2]_b$ (mol L ⁻¹)	1.5×10^{-4}	1.5×10^{-4}	1.5×10^{-4}	Concentraciones en la interfase agua- sedimento.
$[NO_3^-]_b$ (mol L ⁻¹)	5×10^{-6}	5×10^{-6}	5×10^{-6}	
$[NH_4^+]_b$ (mol L ⁻¹)	4×10^{-5}	4×10^{-5}	4×10^{-5}	
$[SO_4^{2-}]_b$ (mol L ⁻¹)	0.02	0.02	0.02	

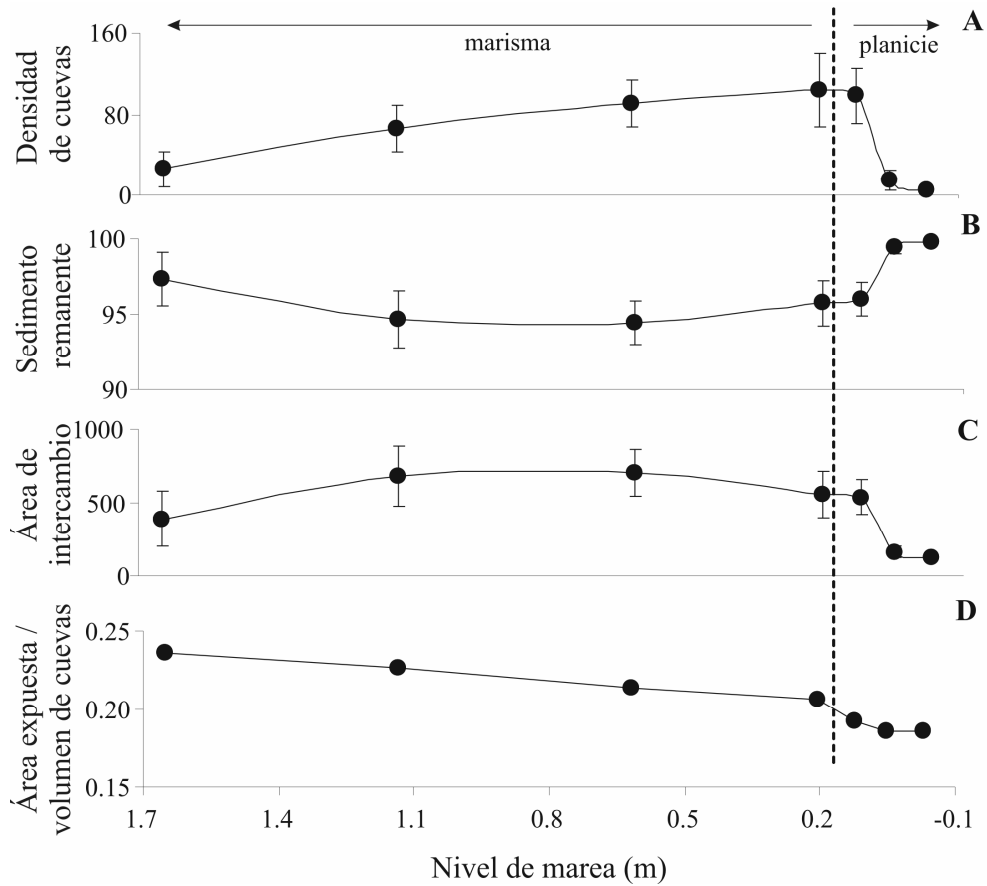


Fig. I.1. (A) Densidad de cuevas de *N. granulata* (cuevas · m⁻²) a través de la zona intermareal; (B) Volumen (m³) sin cuevas por m³ de sedimento a través de la zona intermareal (%); (C) Área de intercambio generada por la presencia de cuevas en un m² de área superficial (%); (D) Proporción entre el área de intercambio y el volumen de sedimento ocupado por cuevas a través de la zona intermareal. Las líneas verticales separan el area de la marisma y de la planicie de marea.

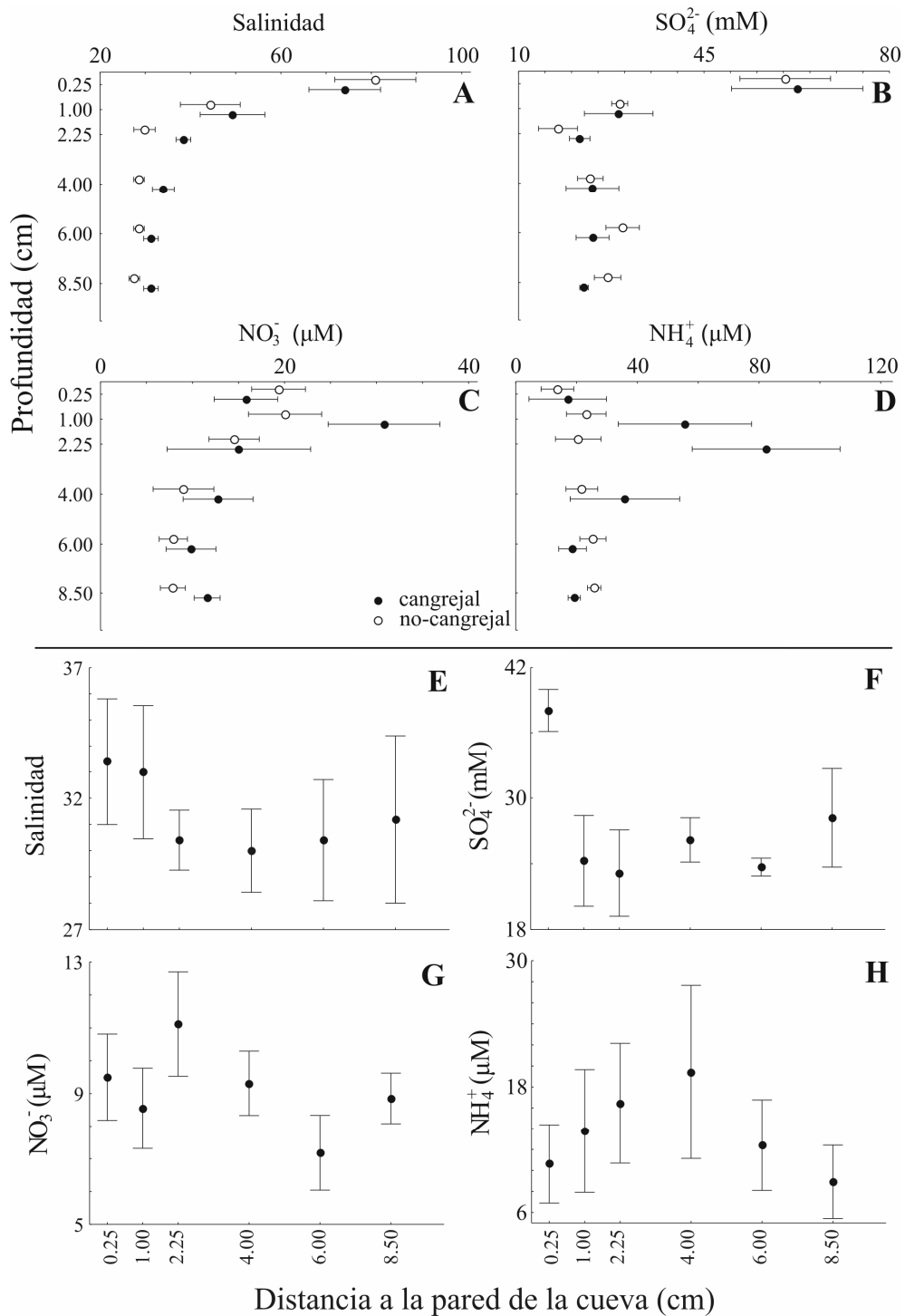


Fig. I.2. Perfiles verticales de: (A) salinidad; (B) concentración de sulfato; (C) concentración de nitrato; y (D) concentración de amonio en cangrejales y no-cangrejales; y perfiles radiales de (E) salinidad; (F) concentración de sulfato; (G) concentración de nitrato; y (H) concentración de amonio en la zona de cangrejales.

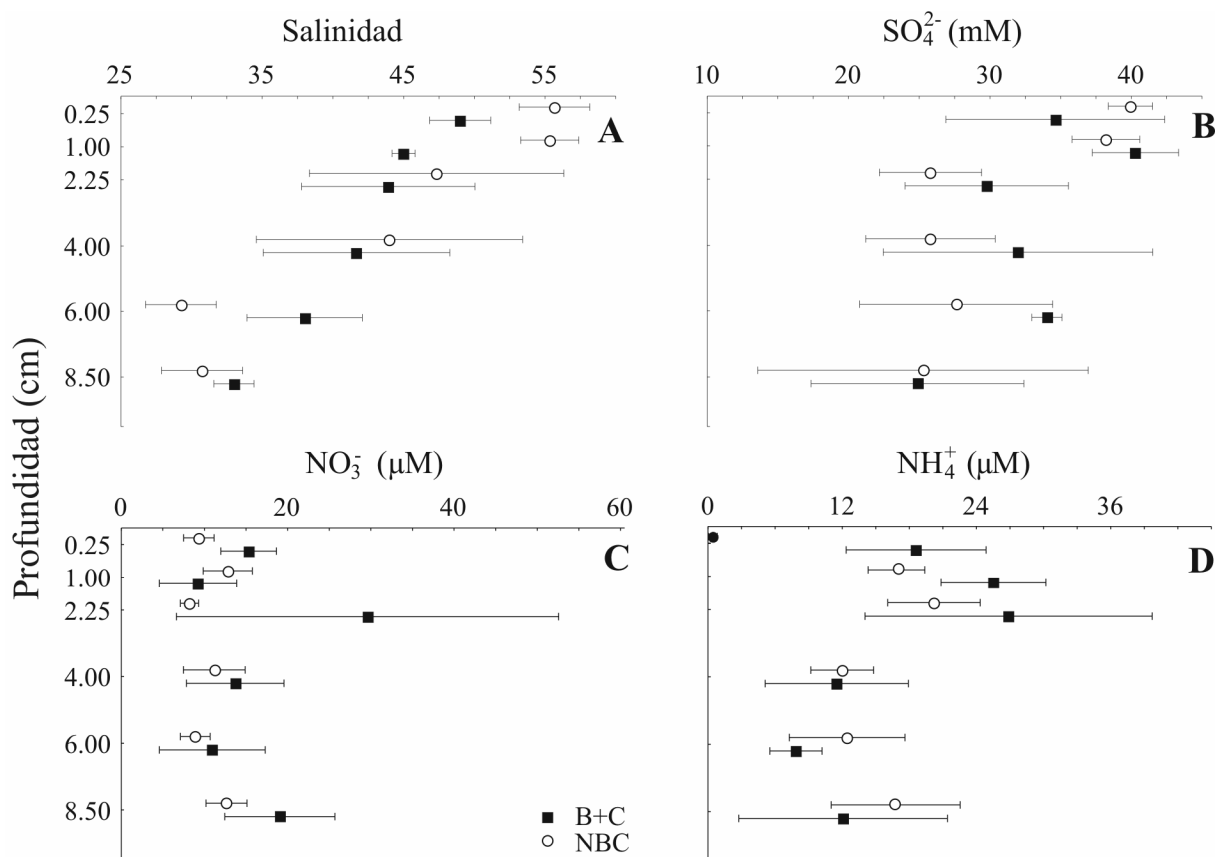


Fig. I.3. Perfiles verticales de: (A) salinidad; (B) concentración de sulfato; (C) concentración de nitrato; y (D) concentración de amonio en los tratamientos experimentales B+C y NBC.

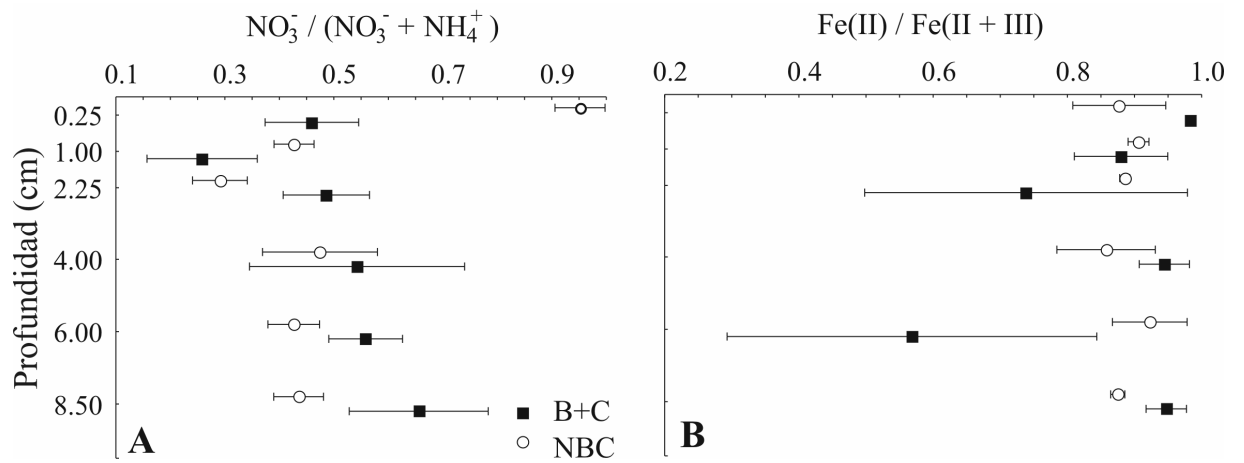


Fig. I.4. Perfiles verticales de: (A) $\text{NO}_3^- / (\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+)$; y (B) $\text{Fe(II)} / \text{Fe(II + III)}$ en los tratamientos experimentales B+C y NBC.

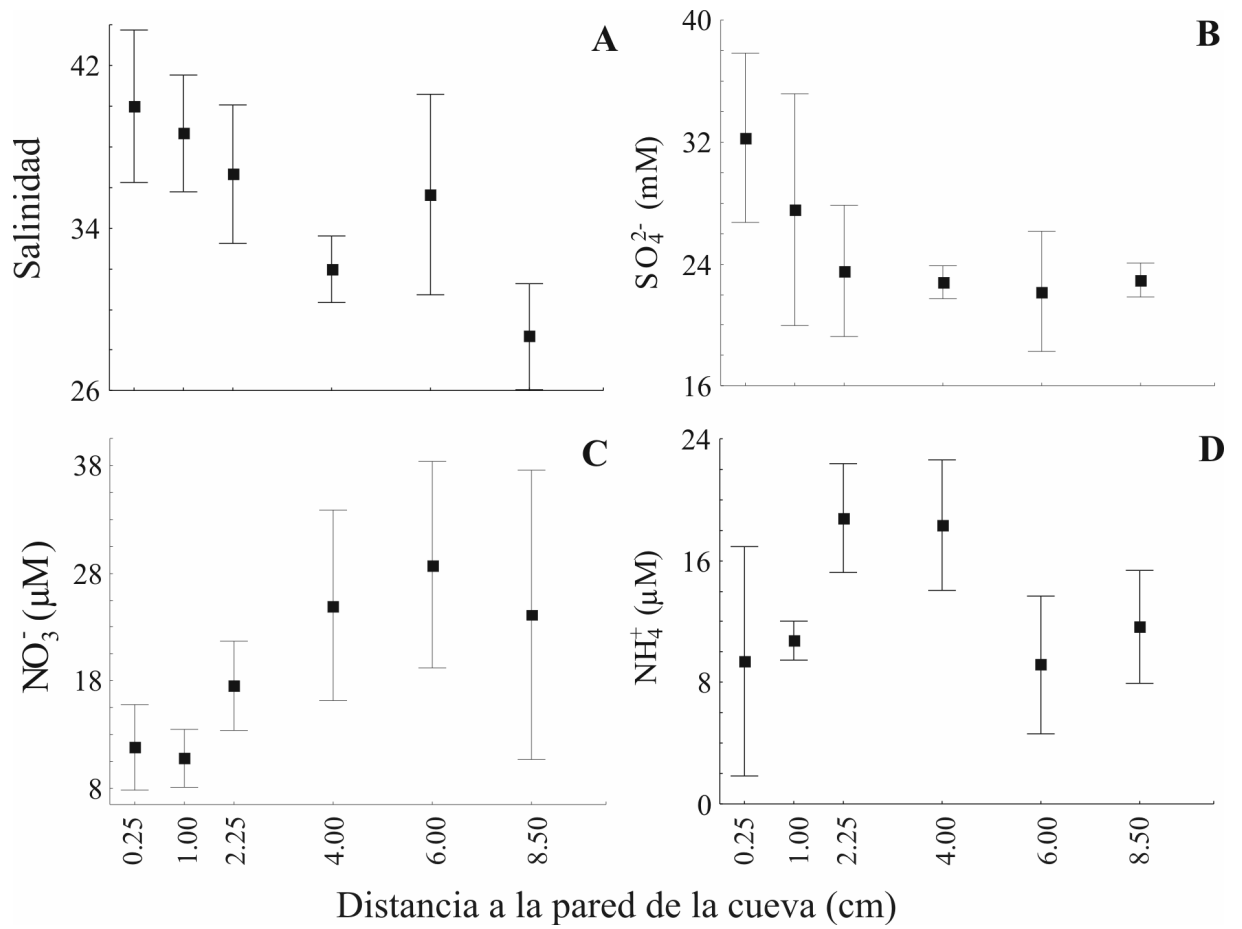


Fig. 1.5. Perfiles radiales de: (A) salinidad; (B) concentración de sulfato; (C) concentración de nitrato; y (D) concentración de amonio en el tratamiento experimental B+C.

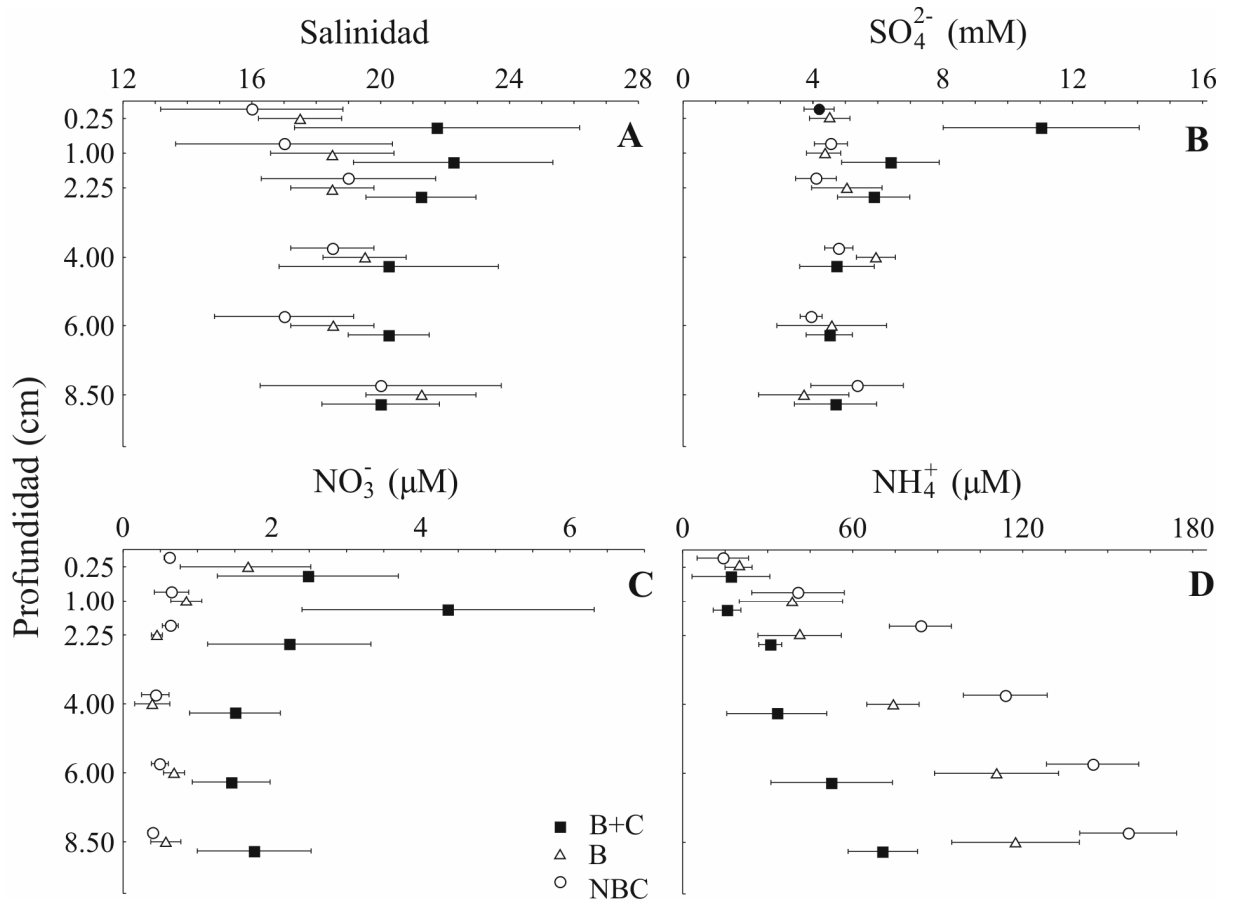


Fig. 1.6. Perfiles verticales de: (A) salinidad; (B) concentración de sulfato; (C) concentración de nitrato; y (D) concentración de amonio en los tratamientos experimentales B+C, B y NBC.

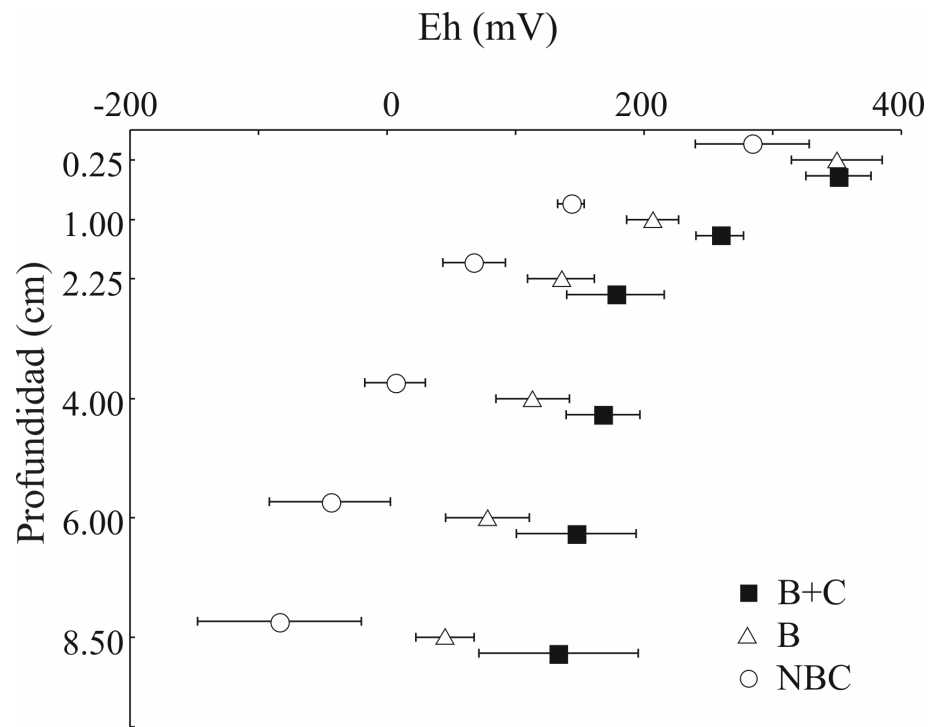


Fig. I.7. Perfiles verticales de potencial redox (Eh) de los tratamientos experimentales B+C, B y NBC.

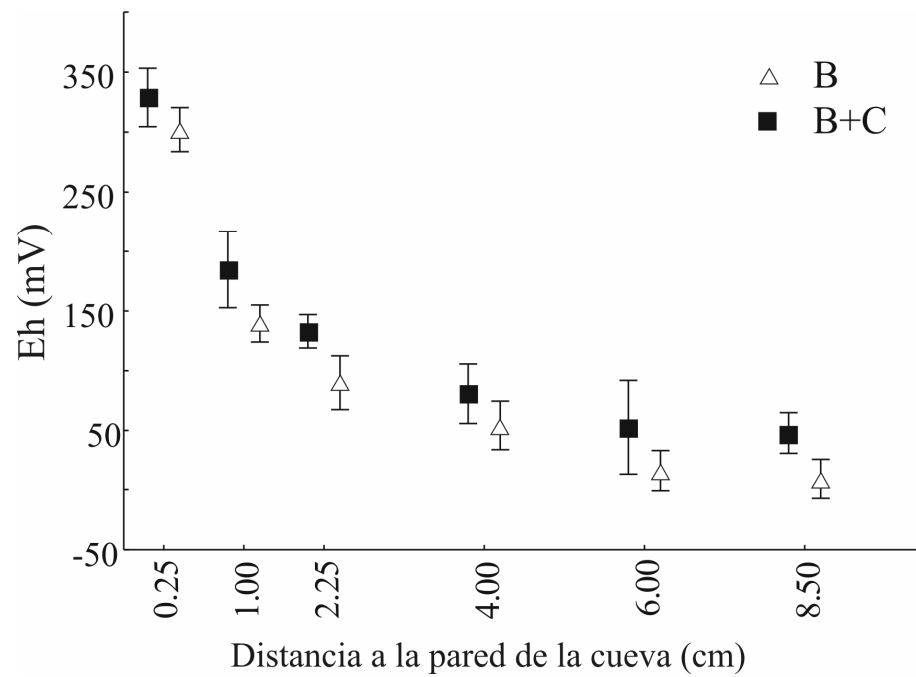


Fig. I.8. Perfiles radiales de potencial redox (Eh) de los tratamientos B+C y B.

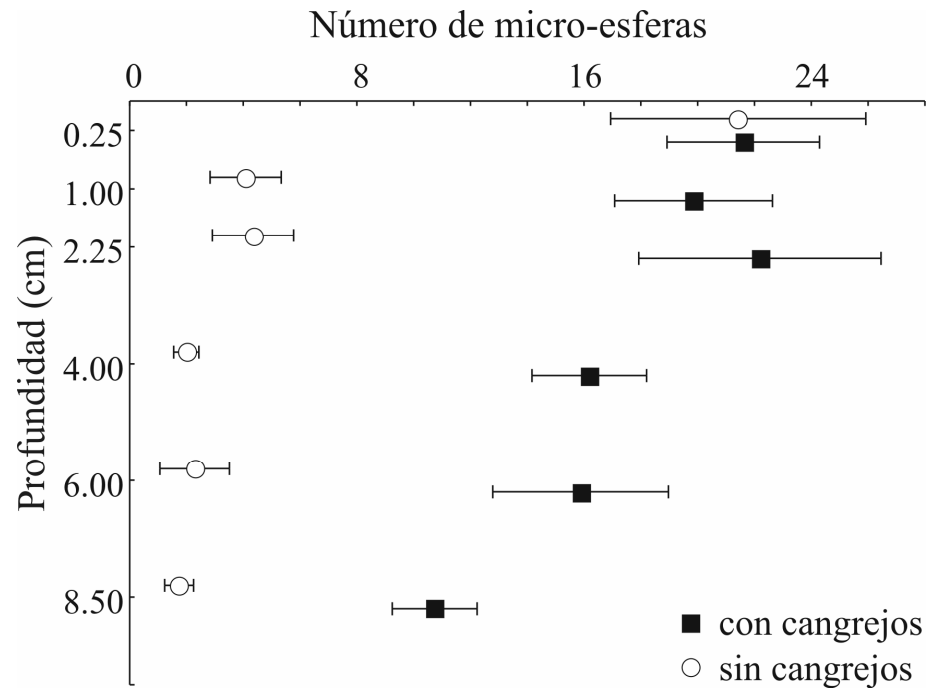


Fig. I.9. Redistribución de micro-esferas como resultado de la actividad de bioturbación de *N. granulata*.

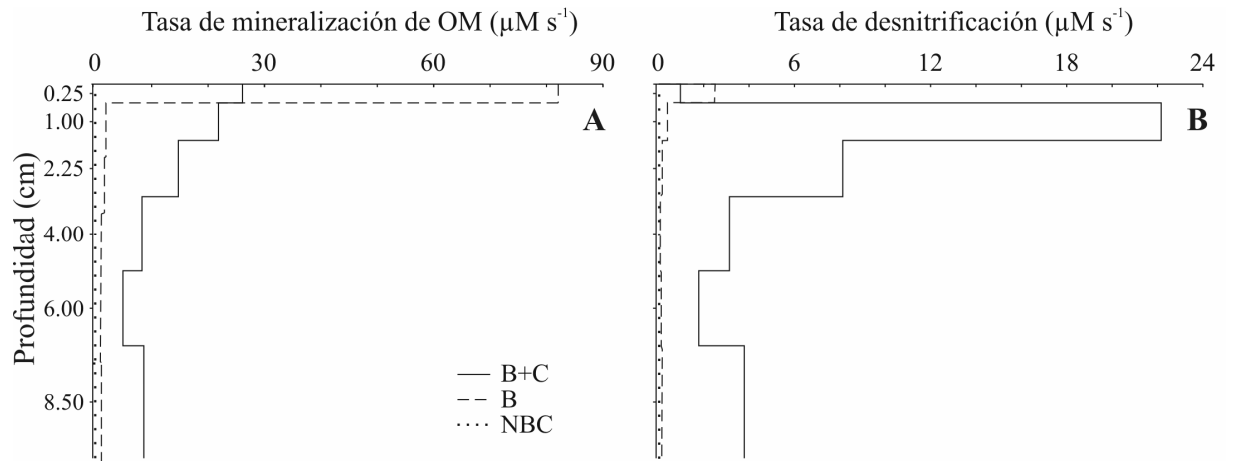


Fig. I.10. Tasas de mineralización de MO modeladas (A), y tasas de consumo de nitrato debido a la remineralización de MO (B) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC.

CAPÍTULO II

Efecto del cangrejo cavador intermareal *Neohelice granulata* sobre la carga de nutrientes del agua freática que ingresa al área costera *

* Este Capítulo corresponde a la publicación científica:

Fanjul E, Grela MA, Canepuccia A, Iribarne O. 2008. The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79: 300-306.

INTRODUCCIÓN

Las descargas de agua subterránea pueden ser una fracción importante de la descarga total de agua dulce en áreas costeras, principalmente en zonas donde no existen aportes significativos de ríos (Moore 1996, Lambert & Burnett 2003). En algunos casos, la descarga subterránea hacia el mar puede influenciar la productividad, biomasa y composición específica, y zonación mediante las alteraciones en parámetros tales como salinidad y concentración de nutrientes y contaminantes disueltos (Johannes 1980). Además, la tasa de aporte de nutrientes puede ser importante debido a la alta concentración de éstos en las aguas subterráneas costeras en comparación con la concentración de las aguas costeras abiertas (Valiela 1990). Los nutrientes en las aguas subterráneas están involucrados generalmente con las transformaciones geoquímicas que ocurren durante su paso hacia los sedimentos superficiales (Slomp & Van Cappellen 2004). Aunque se sabe que el agua subterránea cruza a través de marismas y sedimentos submareales antes de alcanzar las aguas estuariales (*e.g.*, Harvey & Odum 1990), los posibles efectos biológicos en las características de este agua no han sido evaluados hasta el momento.

Las marismas generalmente constituyen la interfase entre los sistemas terrestres y los cuerpos de agua estuariales o costeros, así estos ambientes interactúan directamente con las descargas de agua subterránea (Harvey & Odum 1990). Las marismas son filtros muy efectivos y transformadores de nutrientes (*e.g.*, Correl 1981); la vegetación presente en ellas influencia fuertemente la actividad microbiana del sedimento debido a la excreción de sustancias orgánicas y oxígeno por las raíces (*e.g.*, Moriarty *et al.* 1986; Gribsholt & Kristensen 2002). Sin embargo, los organismos bioturbadores transportan partículas y fluidos cuando realizan actividades de excavado, alimentación,

construcción de tubos e irrigación de cuevas (*e.g.*, Aller 1988, Aller & Aller 1998, Capítulo I). Estos organismos aceleran los flujos agua-sedimento (Aller 1998, Kristensen *et al.* 1991, Christensen *et al.* 2000), estimulando los procesos de degradación anaeróbica (Andersen & Kristensen 1992, Banta *et al.* 1999, Capítulo I), y también influenciando la forma y velocidad con la que esos metabolitos son reincorporados a la columna de agua (Aller 1983, Kristensen & Kotska 2005). De esta manera, la macrofauna y flora bentónica pueden afectar tanto la actividad de la comunidad microbiana como los procesos de transporte y mezcla de sedimentos (Kristensen 1984, Duarte 1995, Capítulo I).

Trabajos recientes han mostrado que el cangrejo cavador *Neohelice granulata* tiene importantes efectos en la redistribución de partículas (Botto & Iribarne 2000, Escapa *et al.* 2008, Capítulo I), química del sedimento (Botto *et al.* 2005, Gutiérrez *et al.* 2006, Capítulo I), y drenaje (Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000) en estuarios y bahías del Atlántico Sudoccidental. Sus cuevas permanecen siempre abiertas; en las planicies de marea son cortas (hasta 40 cm de profundidad) con entradas en forma de embudo; y en las marismas las cuevas son tubos rectos y verticales mucho más profundos (más de 1 m de profundidad y 40 mm de diámetro medio) que alcanzan los niveles del agua freática (Iribarne *et al.* 1997, Bortolus & Iribarne 1999). Estas cuevas permanecen llenas de agua incluso durante la marea baja, y la presencia de cuevas con una o más aperturas o con interconexiones cueva-cueva puede promover los flujos subterráneos mediante bombeos inducidos por la presión diferencial que ocurre sobre cada abertura durante la marea alta (Allanson *et al.* 1992, Ridd 1996, Perillo *et al.* 2005). Así, los efectos de infiltración de agua subterránea en los taludes de canales de marea son promovidos por la presencia de cuevas (Perillo *et al.* 2005). Los reservorios

freáticos en las marismas del Atlántico Sudoccidental (ASO) a menudo circulan por debajo de áreas densamente perforadas por cuevas de cangrejos antes de descargar en aguas estuariales o costeras (Iribarne *et al.* 1997). Por otra parte, las cuevas promueven el contacto entre la atmósfera y las aguas freáticas afectando su estado redox, y la actividad de cangrejos impactaría entonces directamente en la composición química del agua freática.

La bioturbación ha sido considerada generalmente como un proceso difusivo (*i.e.*, continuo, simétrico y en con efecto a pequeña escala; Boudreau 1986, Boudreau *et al.* 1998), que estimula los flujos de nutrientes bentónicos desde los sedimentos intermareales hacia las aguas costeras (Aller 1988, Kristensen *et al.* 1991, Christensen *et al.* 2000). Sin embargo, hay muy poca información acerca del potencial efecto de grandes agregaciones de animales que construyan cuevas profundas (como *Neohelice granulata*) en las aguas subterráneas. Actualmente no existen trabajos que evalúen los efectos de la actividad de bioturbación en las descargas de agua subterráneas, incluso cuando se reconoce ampliamente que estas aguas son una fuente importante de nutrientes para las aguas costeras y sustenta gran parte de su productividad primaria (Johannes 1980, Moore 1999, Burnett *et al.* 2001). Debido a que las cuevas de *N. granulata* generalmente llegan hasta las aguas freáticas (Bortolus & Iribarne 1999) las características químicas de este agua podrían ser modificadas vía incorporación de sustancias atrapadas o producidas dentro de las cuevas (*i.e.*, excreciones de cangrejos y metabolitos resultantes de la actividad microbiana), y también como resultado de la oxigenación del agua facilitadas por la estructura de las cuevas. En este contexto, este Capítulo tiene como objetivo principal evaluar el efecto de el cangrejo cavador *N.*

granulata en las características químicas de el agua subterránea que descarga en aguas costeras, utilizando muestreos dirigidos y experimentos de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Las tareas de campo detalladas en este Capítulo fueron realizadas entre diciembre-2005 y abril-2006 en la Laguna Costera Mar Chiquita (Argentina, 37° 46' S, 57° 27' O; Fig. II.1). La laguna recibe contribuciones de agua subterránea de aproximadamente 0.8 hm³ año⁻¹, lo que representa alrededor de un 2.2% de su volumen medio (Fasano *et al.* 1982). La mayor parte de sus sedimentos intermareales se caracterizan por la presencia del cangrejo cavador *Neohelice granulata*, que genera extensos cangrejales con hasta 60 cuevas m⁻² (*e.g.*, Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000), que en la marisma alcanzan el nivel freático (ver Introducción).

Muestreos dirigidos (comparación entre zonas del intermareal). Se realizó un muestreo dirigido en marismas habitadas por *Neohelice granulata* (ver Fig. II.1) para evaluar si hay cambios en las características químicas del agua freática a medida que ésta cruza a través del cangrejal. Se construyeron pozos en el sustrato utilizando tubos de PVC (hasta alcanzar profundidades de entre 0 y 15 cm por debajo del nivel del agua freática, 10 cm de diámetro) para el muestreo de agua freática en cuatro zonas diferentes del intermareal definidas por su posición relativa al nivel de la marea (ver Figs. II.1 y II.2A) y por la presencia/ausencia de cangrejos en la marisma. Se realizaron veintiocho pozos en dos líneas diferentes paralelas a la línea de costa, ambas en zonas altas de la marisma (pastizales altos y marisma alta) con el fin de tomar muestras de agua freática antes de que ésta cruce la marisma (ver líneas de pozos en Figs. II.1 y II.2A, “PA” pastizal y “MA” marisma alta). Se realizaron catorce pozos en una línea paralela a la

costa en la zona media de la marisma (“MM” marisma media, ver Figs. II.1 y II.2A) para muestrear el agua freática cuando ésta está cruzando el cangrejal, y otros catorce pozos en el límite bajo de la marisma cuando comienza la planicie de marea (“PMA” planicie de marea alta) para tomar muestras de agua freática después de cruzar completamente el cangrejal. Simultáneamente al muestreo de agua en los pozos de los diferentes niveles se tomaron muestras de agua del canal de marea que irriga la marisma (“CM” canal de marea). Las muestras de agua para el análisis químico fueron tomadas durante períodos de marea baja, transportadas inmediatamente al laboratorio, filtradas y preservadas a -20° C hasta ser analizadas. Se determinó luego la salinidad, pH, concentración de oxígeno disuelto y concentración de sulfato, nitrato, y amonio. Para evaluar la ausencia de diferencias en las variables medidas entre las zonas del intermareal (Ho) se realizó un ANOVA sobre datos transformados (transformación logarítmica).

El contenido de sal en sedimentos fue medido para las zonas PMA, MM, MA y PA. Para esto se obtuvieron muestras de sedimento ($n = 14$ para cada zona) utilizando un cilindro de PVC (3 cm de diámetro, 10 cm de profundidad). Se determinó el contenido de agua en estas muestras como la diferencia entre el peso húmedo y seco (determinado después de secar las muestras en estufa a 60° C hasta peso constante). Luego, se tomaron submuestras (~ 10 g) para determinar salinidad en extractos de relación 1:2 sedimento seco:agua destilada. El contenido total de sal en sedimento fue calculado con los datos de salinidad de los extractos y la humedad del sedimento de cada zona del intermareal. La salinidad del agua de poro no pudo ser determinada de manera directa debido al bajo contenido de agua de poro en estos sedimentos. La

hipótesis nula de ausencia de diferencias en el contenido de sal entre las zonas del intermareal fue evaluada con ANOVA (Zar 1999).

Los sedimentos de estas marismas suelen estar sobresaturados de sal, ocasionalmente se pueden observar cristales de sal precipitada en superficie. Dado que durante la marea baja el agua freática circula y drena a través de sedimentos con alto contenido de sal, es esperable que ocurra un progresivo incremento en la salinidad del agua freática a medida que ésta cruza la zona intermareal. Asumiendo que el desplazamiento general del agua subterránea en zonas costeras es desde zonas de tierras altas (“PA”) hacia los canales de marea (“CM”), se utilizó un modelo de mezcla de dos fuentes descrito por la ecuación (1) para validar los gradientes de salinidad observados en el campo:

$$PW_i^{sal} = a_i \times PW_{i-1}^{sal} \times \left(\frac{S_{i-1} + S_i}{2} \right) \times d_i + (1 - a_i) \times W_5^{sal} \quad (1)$$

En la ecuación anterior i representa el sitio en la marisma (los sitios fueron numerados consecutivamente desde $i = 1$ en PA, hasta $i = 5$ en CM; ver Fig. II.1); PW_i^{sal} y S_i son la salinidad y el contenido de sal del sedimento medidos para cada sitio i ; W_5^{sal} es la salinidad del canal de marea; y d_i es la distancia normalizada entre los sitios i e $i-1$. Los factores a_i y $(1 - a_i)$ representan el volumen relativo de agua de las fuentes PA o CM respectivamente, que se mezclan en cada sitio i . Asumiendo que el volumen de agua de PA y del canal de marea que se mezclan en el sitio i (*i.e.*, a_i) es proporcional a la distancia entre el sitio i y las dos fuentes (*i.e.*, PA y CM), este modelo permite estimar las salinidades del agua freática para los sitios MA, MM, y PMA. Los datos de PW_i^{sal} y S_i fueron remuestreados independientemente ($n = 100$) para cada sitio de la marisma

(Manly 1998), para estimar las salinidades del agua freática para cada sitio según la ecuación (1). La hipótesis nula de no diferencia entre las salinidades del agua freática medidas y estimadas por la ecuación (1) para los sitios MA, MM, y PMA fue evaluada independientemente para cada sitio usando test de t (Zar 1999); los grados de libertad usados en estos test de t fueron calculados a partir de los datos originales, siguiendo una aproximación conservativa (Manly 1998).

Experimentos de campo evaluando los efectos de cangrejos y cuevas. Se realizó un experimento de campo con el fin de evaluar si la actividad de *Neohelice granulata* tienen algún efecto en la cantidad y calidad de los nutrientes inorgánicos disueltos en el agua contenida dentro de las cuevas. Esto fue realizado en la zona media de la marisma dominada por *Spartina* spp. (zona MM, ver Fig. II.1). El experimento fue compuesto por tres tratamientos para discriminar si los cambios en la calidad del agua de cuevas podrían ser explicados únicamente por el incremento del área de intercambio debido a la presencia de la cueva, o también por la actividad de cangrejos dentro de ellas (*i.e.*, bioturbación, alimentación y excreción). Los tratamientos utilizados fueron: (1) áreas con presencia de cuevas artificiales y cangrejos (cueva + cangrejo, en adelante llamado “B+C”); (2) áreas con cuevas artificiales pero sin cangrejos (cuevas solas, en adelante llamado “B”); y (3) áreas de exclusión de cangrejos sin efecto ni presencia de cuevas y/o cangrejos (tratamiento control, en adelante llamado “NBC”). En cada una de las cuevas de los tratamientos B+C se introdujo un cangrejo adulto. Cada unidad experimental estuvo separada de las demás por al menos 5 m, y fue cercada con una malla plástica (abertura 0.75 cm) de un metro de lado y 0.4 m de altura ($n = 8$ para cada tratamiento). Los tratamientos fueron asignados al azar para cada unidad, y todas las unidades experimentales fueron instaladas en áreas previamente desprovistas de cuevas

y cangrejos con el fin de comenzar el experimento sobre sedimentos no-impactados y poder evaluar el impacto real de las cuevas y los cangrejos. Las cuevas artificiales fueron construidas insertando tubos de PVC (4 cm de diámetro, 1.2 m de profundidad y con una densidad de 30 cuevas m⁻²) en el sustrato y removiendo el sedimento atrapado dentro del tubo (ver Iribarne *et al.* 2005). Las unidades experimentales fueron inspeccionadas semanalmente, para asegurar la presencia de cangrejos dentro de las cuevas para el tratamiento B+C, así como también la ausencia de cangrejos y/o nuevas cuevas en el tratamiento NBC. Las muestras de agua de las cuevas fueron tomadas luego de 4 meses del inicio del experimento en el campo. En los tratamientos B+C y B se tomó agua de las cuevas utilizando una jeringa (60 ml) provista de una manguera de acrílico (5 mm de diámetro) que fue inmersa 15 cm dentro de la cueva. Las muestras de agua para el tratamiento NBC fueron tomadas en pozos (15 cm) construidos previamente utilizando tubos de PVC (30 mm de diámetro). Estos pozos permitieron tomar muestras de agua representativas de una columna vertical de 15 cm de agua de poro. Todas las muestras de agua fueron tomadas durante períodos de marea baja, e inmediatamente transportadas al laboratorio, filtradas y conservadas a -20° C hasta su análisis. En estas muestras se midió salinidad, concentración de sulfato (SO₄²⁻), concentración de nitrato (NO₃⁻), concentración de amonio (NH₄⁺), concentración de oxígeno disuelto (O₂) y pH. La hipótesis nula de ausencia de diferencias en la concentración de nutrientes inorgánicos disueltos en el agua de cuevas entre los distintos tratamientos fue evaluada usando ANOVA (Zar 1999).

Análisis químicos. La salinidad, concentración de sulfato (SO₄²⁻), nitrato (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺), oxígeno disuelto (O₂) y pH fueron medidos en agua freática y en agua de cuevas (ver secciones anteriores). La salinidad, las concentraciones de sulfato, nitrato

y amonio fueron determinadas siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I. La concentración de oxígeno disuelto fue determinada *in situ* utilizando un oxímetro Oakton® Waterproof DO 300. El pH fue medido *in situ* utilizando un electrodo de pH (HI 1230B, Hanna Instruments).

RESULTADOS

Muestras dirigidos (comparación entre zonas del intermareal). La concentración de solutos en el agua freática fue diferente para las zonas del intermareal. La salinidad fue dos veces más baja en los sitios altos que en la línea media de la marisma (*PA*: media = 16, DE = 6, n = 14; *MM*: media = 35, DE = 1, n = 14); la salinidad de las zonas bajas de la marisma y planicies de marea (sitios *PMA*) también fue menor a la correspondiente a los sitios *MM*, y registró valores intermedios en los canales de marea (*CM*: media = 26, DE = 3, n = 14; ANOVA: $F_{4,65} = 40.39$, $p < 0.001$; Fig. II.2B). La concentración de sulfato fue más alta en las zonas medias de la marisma (*MM*), y mostró sus valores más bajos en los sitios altos de la marisma (ANOVA, datos transformados: $F_{4,65} = 12.45$, $p < 0.001$; Fig. II.2C). Los valores de pH fueron más bajos antes (*i.e.*, zonas altas *PA* y *MA*) que después de cruzar el cangrejal (*i.e.*, *PMA*, ver Fig. II.1) mostrando valores intermedios en las zonas *MA* y *MM* (ANOVA datos transformados: $F_{4,65} = 88.4$, $p < 0.001$; Fig. II.2D). La concentración de nitrato en el agua freática fue aumentando desde las zonas altas (*PA* y *MA*) hacia la marisma media (*MM*), mostrando los valores más bajos en la planicie de marea (*PM*) y los más altos en aguas abiertas dentro de canales de marea (*CM*; ANOVA datos transformados: $F_{4,65} = 20.31$, $p < 0.001$; Fig. II.2E). El contenido de amonio fue 2.5 veces en promedio mayor en *PMA* que en el resto de las zonas (ANOVA datos transformados: $F_{4,65} = 15.70$, $p <$

0.001; Fig. II.2F). La concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue mayor en las zonas CM y PMA que en las zonas PA, MA y MM (ANOVA datos transformados: $F_{4, 65} = 14.33$, $p < 0.001$; Fig. II.2G).

El contenido de sal del sedimento fue mayor en las zonas de marisma media (MM) que en las zonas altas PA y MA y bajas PMA. Este contenido de sal fue 14 veces más bajo en los pastizales altos (PA) que en el resto de los sitios (ANOVA: $F_{3, 36} = 38.28$, $p < 0.001$). No se hallaron diferencias entre la salinidad medida en agua freática y la estimada a partir del modelo de doble entrada para las zonas MA (*salinidad medida*: media = 28, DE = 3; *salinidad estimada por el modelo*: media = 24, DE = 9; $t = 1.71$, gl = 26, $p = 0.10$), MM (*salinidad medida*: media = 35, DE = 2; *salinidad estimada por el modelo*: media = 37, DE = 10; $t = 0.74$, gl = 26, $p = 0.468$), y PMA (*salinidad medida*: media = 33, DE = 2; *salinidad estimada por el modelo*: media = 32, DE = 5; $t = 0.27$, gl = 26, $p = 0.789$). De esta manera, el modelo de mezcla describió acertadamente el gradiente en salinidad del agua freática a través de las distintas zonas dentro de la marisma, indicando que el agua subterránea fluye desde los sitios altos hacia los bajos disolviendo sales precipitadas en los sedimentos de la marisma.

Experimentos de campo para testeo de efecto de cangrejos y cuevas. Los resultados de la manipulación experimental mostraron que la presencia de individuos de *Neohelice granulata* afecta la calidad del agua contenida en cuevas. La concentración de sulfato fue menor en agua de cuevas del tratamiento B y en agua de poro correspondiente al tratamiento NBC que en agua de cuevas del tratamiento B+C (ANOVA: $F_{2, 21} = 9.85$, $p < 0.05$; Fig. II.3B). La concentración de oxígeno disuelto fue mayor en agua de cuevas del tratamiento B+C que para los otros tratamientos, y esta concentración fue mayor en el agua de cuevas del tratamiento B que en el agua de poro correspondiente al

tratamiento NBC (ANOVA datos transformados: $F_{2, 21} = 725.01$, $p < 0.05$; Fig. II.3C). La salinidad, pH, concentración de amonio, concentración de nitrato, y concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en agua dentro de cuevas para el tratamiento B+C fue mayor que en agua de poro en sedimentos no-bioturbados correspondientes al tratamiento NBC (ANOVA *salinidad*: $F_{2, 21} = 4.31$, $p < 0.05$, Fig. II.3A; *pH*: $F_{2, 21} = 11.00$, $p < 0.05$, Fig. II.3D; *amonio*: $F_{2, 21} = 9.73$, $p < 0.05$, Fig. II.3E; *nitrato*: $F_{2, 21} = 6.52$, $p < 0.05$, Fig. II.3F; *NID*: $F_{2, 21} = 10.72$, $p < 0.05$, Fig. II.3G). Todas estas variables en el agua dentro de cuevas desocupadas (*i.e.*, tratamiento B) presentaron valores intermedios cuando fueron comparadas con el tratamiento B+C y NBC (Fig. II.3A, 3D-3G).

DISCUSIÓN

Los muestreos, observaciones y experimentos realizados en el presente Capítulo mostraron que el agua freática incrementa su concentración de NID cuando cruza a través de cangrejales de *Neohelice granulata*. Además, el experimento de manipulación en el campo reveló que la actividad de este cangrejo modifica la calidad del agua dentro de las cuevas, la cantidad de sustancias disueltas en agua de cuevas fue siempre mayor que en agua de poro de sedimentos no-bioturbados, mientras que el agua dentro de cuevas deshabitadas mostró siempre valores intermedios para esas cantidades de sustancias disueltas.

Circulación de agua freática debajo de cangrejales. Los cambios en la salinidad del agua freática entre las zonas de la marisma confirman que el agua subterránea en estas costas circula desde tierras más altas hacia los canales de marea. Estos datos muestran que los patrones horizontales de salinidad son típicos de un “estuario subterráneo”

(*sensu* Moore 1999; Fig. II.2B) en el que agua dulce y salada sufren procesos de mezcla. Durante la marea baja, los canales de marea contienen una mezcla de agua de mar y agua dulce superficial proveniente de la zona continental de tierras altas. En la Laguna Costera de Mar Chiquita, la salinidad del agua de los canales de marea fue menor que la salinidad del agua freática que circula debajo de los sedimentos de la marisma. Se sabe que gran parte del agua subterránea que es descargada hacia los estuarios es interceptada por las marismas, y también es considerada como una componente importante del agua de poro de la marisma sujeta a desecación (Harvey & Odum 1990). Además, se ha demostrado que la sal excretada por las raíces de las plantas de manglares puede causar incrementos en la salinidad de los sedimentos circundantes hasta llegar a valores por encima de los 50 kg m^{-3} (Passioura *et al.* 1992). Así, en el presente sitio de estudio, el agua freática circula a través de sedimentos desecados con altos contenidos de sal, posiblemente debidos a la evaporación de grandes cantidades de agua contenida dentro de cuevas de cangrejos durante la marea baja, y a la excreción de sal desde las raíces de *Spartina densiflora*. La salinidad medida en el agua freática en las distintas zonas de la marisma fue siempre igual a los valores estimados utilizando el modelo de mezcla, indicando que este modelo de mezcla de doble entrada describe eficientemente el gradiente de salinidad de agua freática existente en la marisma. De esta manera, los patrones de salinidad del agua freática encontrados en este sitio de estudio pueden ser explicados por la disolución de sal presente en sedimentos a medida que el agua freática se desplaza hacia zonas bajas, y también por la mezcla del agua freática con agua proveniente del canal de marea.

El incremento en la concentración de nitrato en el agua freática desde las zonas altas hacia las zonas medias de la marisma podría ser debido a la presencia de cuevas de

cangrejos (Fig. II.2E), ya que el agua dentro de cuevas tanto ocupadas como no ocupadas es muy rica en nitratos (Fig. II.3F). En estas zonas de la marisma, cantidades importantes de nitrato podrían percolar hacia el agua freática a través de las cuevas de cangrejos, que actuarían como conductos para sustancias disueltas (ver Stieglitz *et al.* 2000). Así, en esta área, los cangrejos serían responsables del incremento en el contenido de nitrato del agua freática (ver Resultados). La remoción de nitrato en marismas a través de procesos de desnitrificación y reducción no-asimilativa de nitrato, puede estar limitada por el alto potencial redox de estos sedimentos como resultado de la baja frecuencia de inundación de las zonas altas de la marisma, dado que las bacterias desnitrificadoras consumen nitrato sólo en condiciones anóxicas (Hebert 1999). La disminución de la concentración de nitrato en el agua freática desde la marisma media hacia la planicie de marea es resultado de su consumo biológico por plantas o por bacterias desnitrificadoras (o reductoras de nitrato) que consumen nitrato vía desnitrificación acoplada a procesos de oxidación de materia orgánica. Este último proceso, que ocurre en sedimentos anóxicos (ver Hebert 1999), es estimulado por la actividad de cangrejos (Capítulos I y III). En consecuencia, tanto la asimilación por plantas vasculares como la desnitrificación por bacterias podrían ser los principales sumideros de las altas concentraciones de nitrato halladas en agua freática y de cuevas en estas zonas. El agua dentro de cuevas también presentó elevadas concentraciones de amonio (ver Fig. II.3E), posiblemente debido a la acumulación de heces de cangrejos y a las altas tasas de degradación de materia orgánica (que produce amonio como producto final de nitrógeno, Hebert 1999) asociada al sedimento de las cuevas (Capítulo I). De esta manera, el agua freática aumenta progresivamente su concentración de amonio en la dirección del flujo subterráneo. Cuando este agua se mezcla luego con

agua rica en oxígeno proveniente de canales de marea, parte del amonio podría ser removido por nitrificación y convertido en nitrato (ver Slomp & Van Cappellen 2004). Considerando que los valores absolutos individuales de concentración de nitrato y amonio podrían estar influenciados por la evaporación de agua o por procesos de mezcla, se verificó que la relación nitrato-amonio y nitrógeno total (NID), libre de esa fuente de error, siguió la misma tendencia que los patrones de concentración de nitrato y amonio. Por ello, se puede concluir que los nutrientes presentes en aguas subterráneas están mayormente sujetos a transformaciones biogeoquímicas activas.

Incremento en nutrientes inorgánicos en agua de cuevas. Debido a que las marismas están ubicadas entre sistemas terrestres y marinos o estuariales, y a las altas tasas de transformaciones biogeoquímicas que en ellas se registran (Alongi 1998), muchos trabajos sugieren que estos sistemas funcionan como filtros de nutrientes (Nixon 1980, Correl 1981, Valiela *et al.* 2000). Así, por medio de la intercepción e inmovilizado de nutrientes derivados de sistemas terrestres, reducirían la descarga de nutrientes hacia el estuario o aguas costeras (Nixon 1980, Correl 1981, Valiela *et al.* 2000). Los resultados de este Capítulo muestran que los organismos bioturbadores podrían afectar esta capacidad filtro, influenciando la capacidad de estos sistemas de interceptar nutrientes ya que construyen conductos por donde los nutrientes salen del sistema vía agua freática. Además, en las marismas los cangrejos permanecen mucho tiempo dentro de sus cuevas, donde defecan y acumulan alimento (*i.e.*, plantas y detritos). Este proceso genera la acumulación de excreciones y nutrientes en diferentes estados de descomposición dentro de las cuevas que finalmente son removidos de la marisma vía agua freática.

El acoplamiento entre los sistemas pelágicos y bentónicos resulta un componente crítico del ciclado de nutrientes dentro de sistemas estuariales, y constituye el principal soporte de las tramas tróficas en estos sistemas (*e.g.*, Nixon 1980). Este acoplamiento consiste en la depositación y subsiguiente remineralización de materia orgánica (con liberación de nutrientes inorgánicos) y en el transporte de esos nutrientes disueltos hacia la columna de agua por medio de la interfase agua-sedimento (*i.e.*, flujos bentónicos; Jahnke *et al.* 2003). Varios factores controlan la degradación de materia orgánica en sedimentos intermareales, incluyendo la composición química de la materia orgánica, su estado de descomposición, absorción de las superficies minerales, bioturbación, y condiciones ambientales tales como la temperatura y la disponibilidad de aceptores de electrones (*e.g.*, Keil *et al.* 1994, Fenchel *et al.* 1998). En los sedimentos intermareales del ASO, intensamente bioturbados por *Neohelice granulata*, las altas tasas de degradación de materia orgánica (Capítulo I) producen altas cantidades de nutrientes remineralizados (Capítulo III) que son acumulados dentro de las cuevas (este Capítulo).

La bioturbación afecta la capacidad filtrante de la marisma. *Neohelice granulata* genera extensos cangrejales (*e.g.*, Iribarne *et al.* 1997, Botto *et al.* 2006). Durante la construcción y mantenimiento de sus cuevas estos organismos remueven grandes cantidades de sedimento (más de $6 \text{ kg m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) que es depositado en superficie (Iribarne *et al.* 1997, Escapa *et al.* 2008). Este proceso resulta en un alto coeficiente de bioturbación ($250 \text{ cm}^2 \text{ año}^{-1}$, *sensu* Wheatcroft 1992, Capítulo I). Además, en las marismas los cangrejos construyen cuevas tubulares y verticales de más de 1 m de profundidad (40 mm de diámetro, Iribarne *et al.* 1997), que directamente (bioturbación) e indirectamente (estructura de cuevas) aumentan la oxigenación del sedimento (Daleo *et al.* 2007, Capítulo I). Por otra parte, mediciones directas de perfiles radiales de

compuestos químicos en la interfase entre cuevas de *N. granulata*-sedimento indicaron que el espesor de la capa óxica (*i.e.*, la distancia radial desde la pared de la cueva en la que la concentración de oxígeno del agua de poro alcanza la concentración promedio del sedimento a una determinada profundidad) a 5 cm de profundidad es 0.875 cm (Capítulo I). De esta forma, los fuertes cambios que esta especie genera en las características físicas del sedimento (Botto & Iribarne 2000, Escapa *et al.* 2007), afectarían las tasas y las vías de degradación de materia orgánica (Capítulo I), y también es esperable que esto influya en los procesos microbianos y flujos de nutrientes hacia sistemas vecinos (ver Capítulo III).

Los sedimentos de marismas son en general poco permeables, debido al alto contenido de arcillas (*e.g.*, Botto & Iribarne 2000). Sin embargo, es esperable que la construcción de cuevas y galerías afecte la permeabilidad del sedimento (Meadows & Meadows 1991) proveyendo un eficiente sistema de transporte de agua y solutos desde y hacia el sustrato (Stieglitz *et al.* 2000). Las cuevas son entonces conductos para drenaje que incrementan la permeabilidad global (Jones & Jago 1993, Stieglitz *et al.* 2000); pero las sustancias mucosas secretadas por muchos invertebrados podrían disminuir la permeabilidad debido a la obturación de los espacios intersticiales del sedimento entre-cuevas (Frankel & Mead 1973). En los sedimentos intermareales del ASO, *Neohelice granulata* aumenta la porosidad del sedimento (ϕ) tanto en superficie como en profundidad ($\phi_{\text{promedio}} = 0.555$ para sedimentos bioturbados y $\phi_{\text{promedio}} = 0.435$ para sedimentos no-bioturbados; Capítulo I). Dado que *N. granulata* no secreta sustancias mucosas, pero construye cuevas profundas, es razonable pensar que aumenta la permeabilidad del sedimento. Considerando estos cambios en la permeabilidad del sedimento y el aumento en las tasas de remineralización producidos por la actividad de

cangrejos, a través de las cuevas de estos organismos podría entrar grandes cantidades de nutrientes en los reservorios freáticos. En este sentido, el transporte de nutrientes disueltos hacia la columna de agua estuarial vía agua freática sería también incrementado por la actividad de cangrejos y presencia de cuevas. Considerando la extensa distribución espacial local y geográfica de los cangrejales de *N. granulata* (Iribarne *et al.* 2005), sus altas densidades y el gran tamaño de sus cuevas (Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000), es esperable que afecten los flujos de nutrientes a gran escala. Los resultados aquí presentados muestran una nueva forma por la que los organismos bioturbadores pueden afectar cualitativa y cuantitativamente la exportación de nutrientes desde las marismas hacia las aguas abiertas marinas o estuariales. Es además posible que otras especies que construyan cuevas profundas semipermanentes en marismas, como las construidas por otras especies de cangrejos (*e.g.*, Letsch & Frey 1980, Bertness 1985) o anfípodos (*e.g.*, Posey 1986, Posey *et al.* 1991), tengan efectos similares al de *N. granulata*.

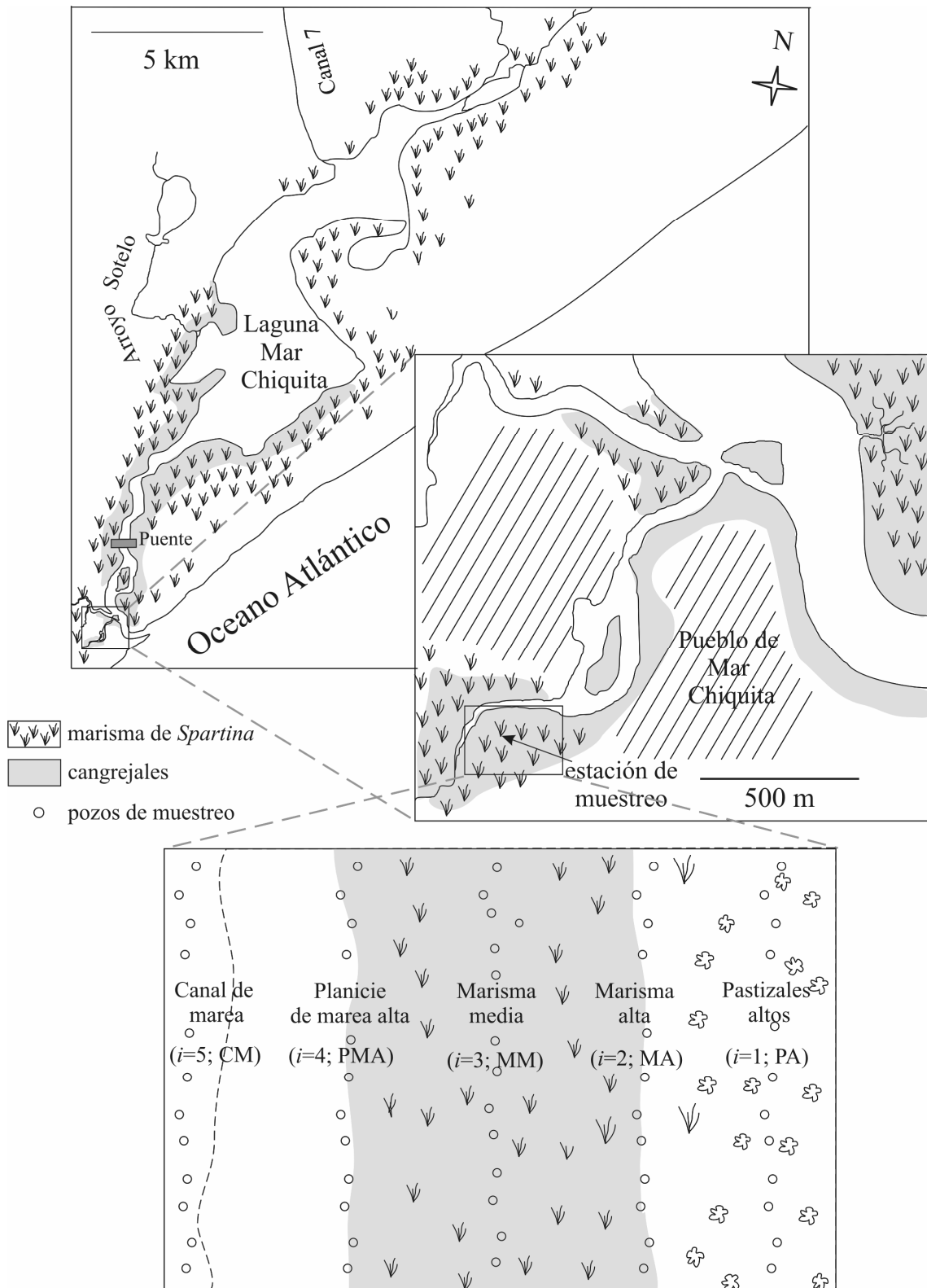


Fig. II.1. Mapa del área de estudio mostrando la distribución espacial de marismas de *Spartina densiflora* y cangrejales de *Neohelice granulata*, así como también la localización de los pozos de muestreo.

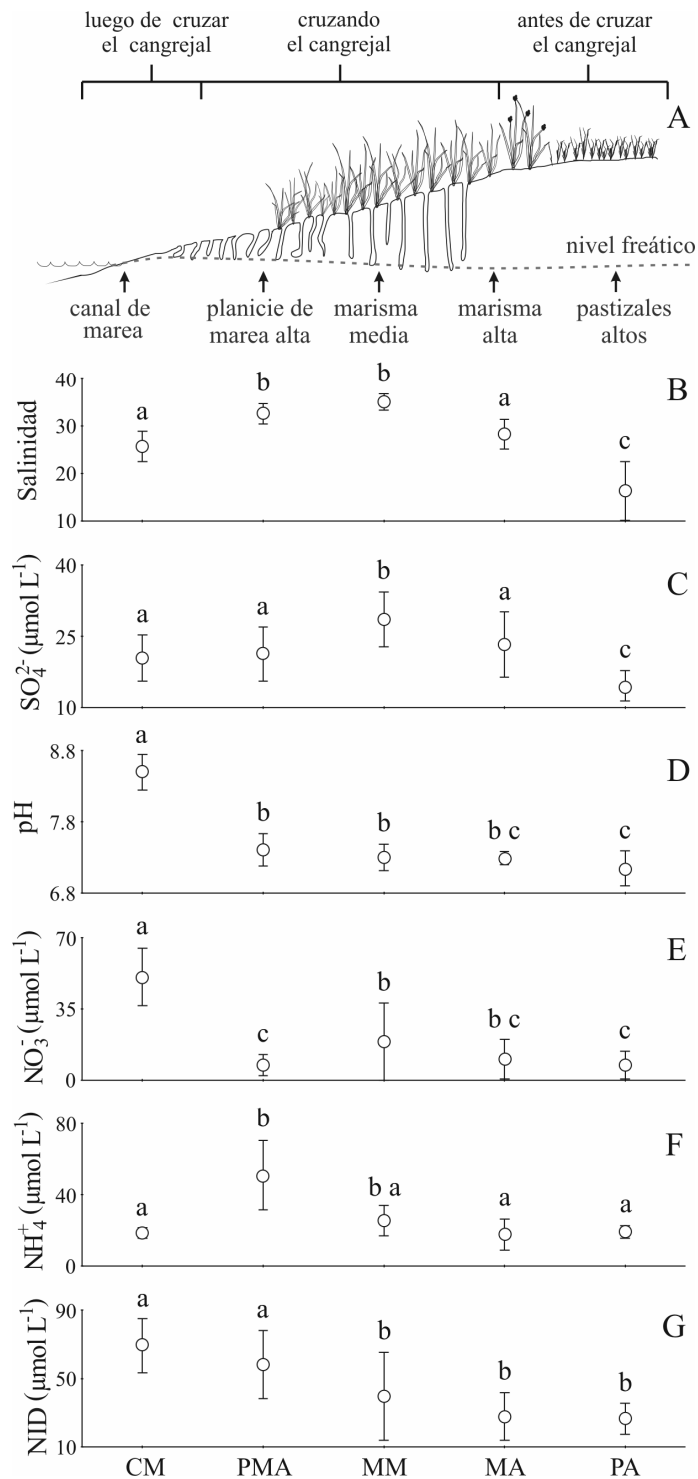


Fig. II.2. (A) Corte de una sección transversal típica de marismas bioturbados por *Neohelice granulata*. Características químicas del agua freática que cruza a través de la marisma: (B) Salinidad; (C) Concentración de sulfato; (D) pH; (E) Concentración de nitrato; (F) Concentración de amonio; y (G) Concentración de nitrógeno inorgánico disuelto. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

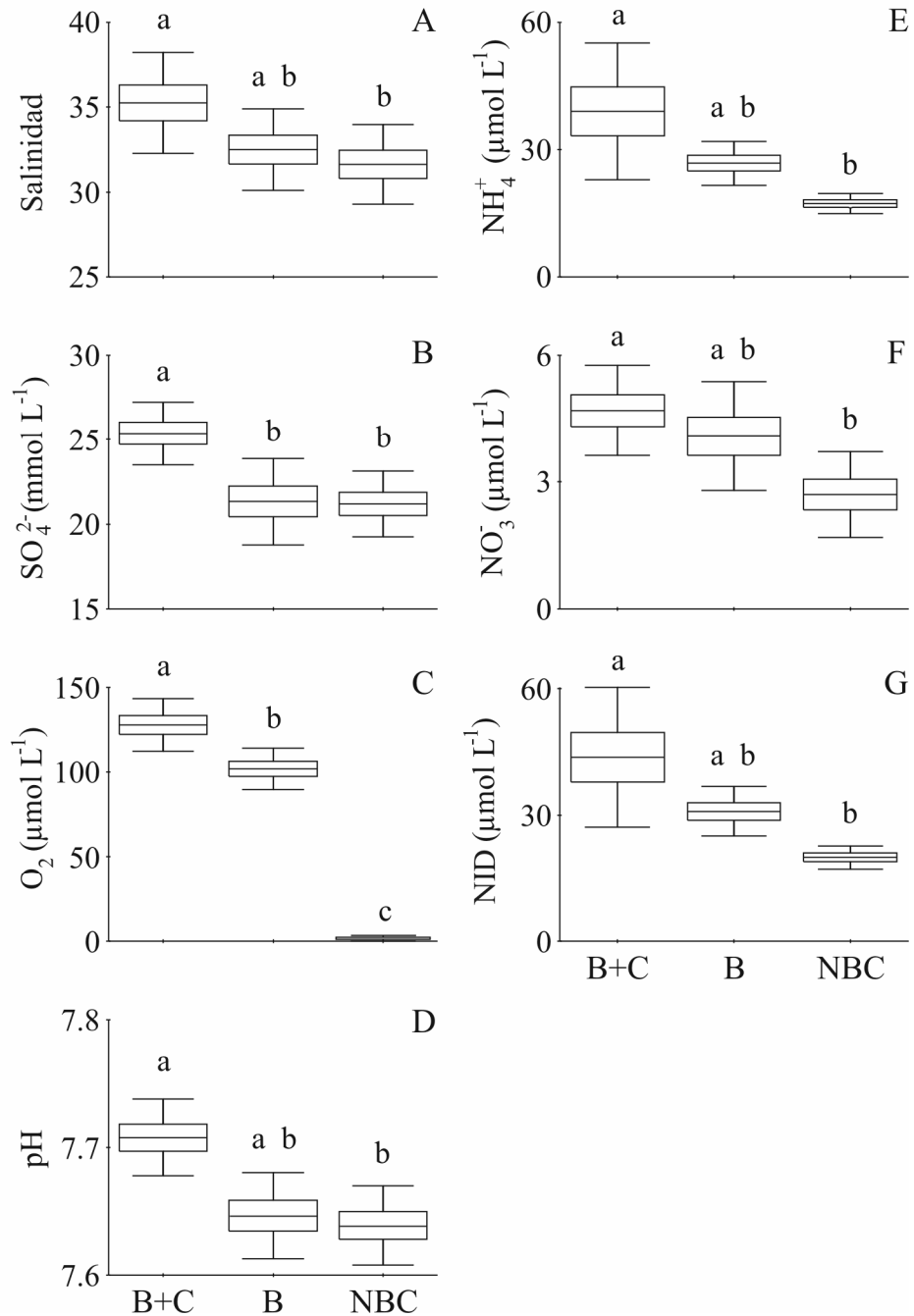


Fig. III.3. (A) Salinidad; (B) Concentración de sulfato; (C) Concentración de oxígeno disuelto; (D) pH; (E) Concentración de amonio; (F) Concentración de nitrato; y (G) Contenido de nitrógeno inorgánico disuelto del agua de cuevas de los tratamientos B+C, B y NBC. Diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

CAPÍTULO III

Impacto de la bioturbación en los flujos bentónicos de nutrientes y en la dinámica del N en sedimentos de marismas y planicies de marea del Atlántico SO.

INTRODUCCIÓN

Las zonas intermareales mantienen la productividad de la zona costera por medio del almacenamiento y reciclado de nutrientes que luego son exportados a las aguas costeras (Nixon 1986, Nixon 1992, Alongi 1998). Debido a que la columna de agua es somera, en estos sistemas los procesos bentónicos tienden a ser más importantes que los pelágicos (Sundbäck & McGlathery 2005). En áreas con fondos blandos, la mayor parte de los procesos biogeoquímicos ocurren en el sedimento, donde la densidad de microorganismos es varios órdenes de magnitud mayor que en la columna de agua (Sundbäck & McGlathery 2005). La conexión más importante entre las tramas tróficas bentónicas y pelágicas es la deposición de material orgánica en el sedimento, y su subsiguiente retorno a la columna de agua en forma de nutrientes reciclados (principalmente N y P, Alongi 1998). El flujo de estos nutrientes hacia la columna de agua está íntimamente acoplado a los procesos de remineralización que ocurren en los primeros centímetros de la columna de sedimento. Así, hay un fuerte y local acoplamiento entre la depositación de MO, su remineralización y flujos bentónicos de nutrientes (Jahnke *et al.* 2003).

La disponibilidad de N es uno de los principales factores que regulan la producción primaria en los ecosistemas costeros (Herbert 1999). El proceso que conduce el ciclo bentónico del N es la degradación de la materia orgánica depositada en el sedimento o exudada por las raíces de las plantas (Hines *et al.* 1989, Jensen *et al.* 1990). Así, la remineralización de N (la ruptura biológica de la materia orgánica que tiene como producto al amonio) es considerada una de las fuentes más importantes de N disponible en estos sistemas (Howarth *et al.* 1988, Herbert 1999). El nitrógeno remineralizado puede ser liberado desde el sedimento a la columna de agua,

frecuentemente por medio de una compleja serie de procesos mediados microbiológicamente que determinan la forma en la que el N es liberado, y consecuentemente su grado de disponibilidad para la nueva producción primaria (Risgaard-Petersen 2004). En este sentido, procesos como la nitrificación (*i.e.*, la conversión aeróbica de amonio a nitrato) y la desnitrificación (*i.e.*, la conversión anaeróbica de nitrato a nitrógeno gaseoso) son clave en la regulación de la disponibilidad de N en sistemas estuarinos (Risgaard-Petersen 2004), ya que el acoplamiento entre ambos procesos implica la pérdida del N remineralizado del sistema, principalmente en forma de N₂ atmosférico (Fenchel *et al.* 1998). Además, la mayor parte del N biodisponible es reciclada varias veces entre organismos autótrofos y heterótrofos, debido a que las tasas de ingreso de N vía fijación de N₂ atmosférico y su salida del sistema vía desnitrificación son al menos un orden de magnitud menor que las tasas de reciclado interno (Canfield *et al.* 2005).

El transporte de sustancias disueltas entre la interfase agua sedimento (*i.e.*, flujos bentónicos), conecta al sedimento con la columna de agua (Alongi 1998). Los procesos responsables de este transporte incluyen la difusión molecular (un proceso lento conducido por gradientes de concentración, Nedwell *et al.* 1999), procesos físicos como la advección de agua y resuspensión de sedimentos, y también procesos complejos mediados biológicamente como la bioturbación y la bioirrigación (Burdige 2006). En la mayoría de los sedimentos bioturbados, la bioturbación es el proceso de transporte más importante (Burdige 2006). Así, en sedimentos bioturbados se ha demostrado un importante impacto de poliquetos (Kristensen 1984, Kristensen 1988, Aller & Aller 1992) y crustáceos (Hugues *et al.* 2000, Webb & Eyre 2004) en los flujos de nutrientes entre el sedimento y la columna de agua. La influencia de la macrofauna en estos

procesos es compleja debido a que depende de múltiples factores como por ejemplo el tipo de bioturbador (el modo de alimentación y excavado, secreción de mucus, irrigación de las cuevas; ver Michaud *et al.* 2005, Pelegri & Blackburn 1995, Kristensen 2000), la disponibilidad de materia orgánica en el sedimento (Banta *et al.* 1999, Kristensen 2001), la interacción con micro- y meio-fauna (Solan & Wigham 2005), y la temperatura (Aller & Aller 1992). Sin embargo, la mayoría de los estudios revelan que la estructura de las cuevas aumenta el flujo de amonio a la columna de agua, incrementan la nitrificación, la desnitrificación y también la toma de nitrato por parte del sedimento (Mayer *et al.* 1995, Kristensen 1985, Nielsen *et al.* 2004). Por otra parte, en sistemas con macrófitas enraizadas como las marismas el metabolismo radicular de las plantas y su alta demanda de N para la producción primaria también pueden tener efectos en el ciclo del N. Por ejemplo, varios estudios muestran altas tasas de fijación de N_2 (*i.e.*, la asimilación de N_2 en moléculas con N fijado que son biológicamente disponibles) en la rizósfera, acopladas a la actividad fotosintética vía exudación de carbono lábil por el sistema radicular (ver revisión en Welsh 2000). Por otra parte, las tasas de nitrificación-desnitrificación dependen de las influencias relativas del aporte de oxígeno y la competencia por NID entre las plantas y las bacterias nitrificadoras y desnitrificadoras (Welsh *et al.* 2000). Así, los sedimentos de marismas están afectados por la presencia de vegetación; que a través de la inyección directa de oxígeno hacia el sedimento y la exudación de sustancias por sus raíces, incrementan la heterogeneidad ambiental creando un mosaico de micro-nichos de superficies óxicas y anóxicas (rizósferas; Holmer *et al.* 2002). La combinación e interacción entre la macrofauna y las raíces de las plantas en sedimentos de marismas aumentando los procesos de transporte y la heterogeneidad del sedimento, puede causar la coexistencia de múltiples vías de

remineralización de MO, con diversos efectos en los flujos bentónicos de nutrientes (Korestky *et al.* 2005). El efecto biológico neto en estos flujos está condicionado por las características del sedimento, disponibilidad y calidad de la material orgánica y estructura de la comunidad bentónica (Nielsen *et al.* 2004, Fenchel *et al.* 1998). Sin embargo, es generalmente aceptado que los organismos bioturbadores pueden incrementar varias veces los flujos de nutrientes entre agua-sedimento, cuando los comparamos con flujos controlados por difusión molecular (Burdige 2006).

Los extensos cangrejales del cangrejo cavador *Neohelice granulata* en marismas y planicies de marea del ASO (hasta un 80% del área intermareal; ver Iribarne *et al.* 2005, Botto *et al.* 2006) incrementan el área expuesta de sedimento, el drenaje, el potencial redox del sedimento (Capítulo I), y aumenta también la concentración de oxígeno en el sedimento (Daleo *et al.* 2007). Por medio de sus actividades de excavación los cangrejos mezclan continuamente al menos los primeros 10 cm de sedimento (Capítulo I). La mayoría de las investigaciones se han centrado en evaluar los efectos ecológicos de *N. granulata* a diferentes escalas, pero pocos trabajos han evaluado los efectos de este bioturbador en la biogeoquímica del sedimento (pero ver Capítulos I y II).

Así, considerando la extensión de los cangrejales (Iribarne *et al.* 2005, Botto *et al.* 2006), su impacto en la dinámica del sedimento (*e.g.*, Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 1999), en la química del agua de poro y en el transporte de partículas en la columna de sedimento (Capítulo I), se puede esperar que tengan efectos en los procesos microbianos y flujos de nutrientes a los sistemas vecinos. En este contexto, el objetivo de este Capítulo es evaluar si el cangrejo cavador *Neohelice granulata* afecta los flujos de nutrientes entre agua-sedimento, el ciclo del N, y el metabolismo bentónico de sedimentos de marismas y planicies de marea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Este estudio fue realizado en el extremo sur de la Bahía de Samborombón, en planicies de marea y marismas de *Spartina alterniflora* ubicadas en San Clemente entre Tapera de López y Punta Rasa (Este de la Bahía Samborombón, 36° 22' S, 56° 45' O). El área es afectada por un régimen de mareas semidiurno con una amplitud máxima de 1.4 m durante las mareas extraordinarias y una amplitud de marea mínima de 0.50 m durante las mareas de cuadratura. La planicie de marea está delimitada en su zona superior por marismas compuestas por *Spartina alterniflora* (en la zona baja de la marisma) y *Spartina densiflora* (en la zona alta de la marisma) (para una descripción detallada ver Isacch *et al.* 2006).

Diseño experimental. Para evaluar el efecto de *Neohelice granulata* en el metabolismo bentónico y flujos de sustancias disueltas a través de la interfase agua-sedimento, se realizó un experimento de campo manipulando las densidades de cuevas y de cangrejos dentro de cámaras de incubación, tanto en sedimentos de planicies de marea como en sedimentos de marisma. El experimento consistió en tres tratamientos en la marisma (n = 12 cada uno), y tres tratamientos en la planicie de marea (n = 12 cada uno): (1) inclusiones de individuos adultos de *N. granulata* dentro de cuevas artificialmente construidas (B+C); (2) cuevas artificialmente construidas no habitadas (B); y (3) exclusiones de cuevas y cangrejos usados como control no bioturbado (NBC). Las cuevas artificialmente construidas (30 cm profundidad; 30 cuevas m⁻²) fueron generadas introduciendo un tubo de PVC (3.5 cm diámetro) en el sedimento (Iribarne *et al.* 2005). Cada unidad experimental fue cercada con una malla plástica (abertura 0.5 cm) de 0.4 m de altura. Las mediciones se realizaron después de 2 meses de la colocación de las cajas de exclusión. Las cámaras para incubaciones bajo luz solar (n = 6) y en oscuridad (n =

6) fueron insertadas aproximadamente 12 cm en el sedimento de cada unidad experimental. La construcción de las cámaras de incubación es explicada en la siguiente sección.

Flujos a través de la interfase agua-sedimento. Los flujos de solutos a través de la interfase agua sedimento y el metabolismo bentónico fueron medidos en cada unidad experimental (ver arriba) usando el método *in situ* de las cámaras flexibles. Las cámaras flexibles (Asmus *et al.* 1998) fueron construidas montando un film de PVC cristal en la parte superior de un caño de PVC (20 cm de diámetro; 15 cm de alto). El otro extremo del film de PVC cristal fue fijado a un anillo de PVC (20 cm diámetro, 1.5 cm alto), al que se le colocó una tapa de acrílico transparente con dos membranas de silicona (9 mm) para el muestreo con jeringas, o medidas *in situ* con microsensores. Las incubaciones fueron realizadas durante marea alta tanto en la marisma como en la planicie de marea. Las cámaras fueron insertadas 12 cm dentro del sedimento en cada una de las unidades experimentales, teniendo especial cuidado de que no queden burbujas de aire atrapadas dentro de las mismas. Estas cámaras flexibles transfieren el movimiento del agua dentro de las mismas (Asmus *et al.* 1998), por lo que no es necesario mezclar la columna de agua artificialmente durante el período de incubación. Las incubaciones fueron realizadas en condiciones de luz y oscuridad; las incubaciones en oscuridad fueron logradas cubriendo las cámaras correspondientes con un film opaco de aluminio. Al final de la incubación, se determinó el volumen exacto de agua dentro de cada cámara midiendo la altura exacta de cada cámara. En las cámaras con cuevas (ver arriba), se determinó el volumen de las cuevas midiendo el volumen de agua necesario para llenar las mismas, y este volumen fue agregado al volumen de la cámara correspondiente.

Se tomaron muestras de agua (50 ml) al inicio de la incubación, y luego de 3 horas de iniciada la misma, tanto en las cámaras de la marisma como de la planicie de marea. En cada ocasión de muestreo, se midió *in situ* la temperatura del agua y concentración de O₂ disuelto. La concentración de O₂ disuelto fue medida *in situ* usando un microsensor de oxígeno (Unisense A/S). Las muestras de agua para el análisis de nutrientes fueron filtradas *in situ* (Whatman GF/F) y conservadas a -20°C hasta su análisis. En estas muestras se midió pH, salinidad, concentración de sulfato, amonio, nitrato y fosfatos. La salinidad fue medida usando refractómetro de mano. Sulfato y nitrato fueron analizados por medio de cromatografía iónica (columna Hamilton PRP X110 de 150 mm, fase móvil HCO₃⁻/CO₃²⁻ 2.2/2.8 mM, detección de conductividad), luego de la eliminación de Cl⁻ realizada pasando las muestras por cartuchos de Ag (cartuchos IC-Ag, 0.5 mL, Alltech). La concentración de NH₄⁺ fue medida usando el método del azul de indofenol (Solórzano 1969). El cambio en las concentraciones de oxígeno en cámaras expuestas a la luz sobre el tiempo de incubación debe ser el resultado neto de la producción primaria y respiración del sedimento. El cambio en las concentraciones de oxígeno en las cámaras incubadas en la oscuridad debe ser sólo resultado de respiración del sedimento (Howarth & Michaels 2000). La tasa de flujo de cada soluto para cada cámara fue calculada como diferencias en la concentración entre la muestra inicial y final, y relacionando esto con el volumen de cada cámara, y el tiempo de incubación. La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y de la exposición a la luz en los flujos bentónicos de cada sustancia medida fue evaluada con ANOVAs de dos vías, independientemente para cada sustancia y sitio (*i.e.*, marisma o planicie de marea) (Zar 1999). De aquí en adelante, cuando se encontró efecto de interacción, los efectos principales entre los factores no fueron considerados debido a la falta de

independencia entre los mismos (Underwood 1997). En el caso de encontrar diferencias entre los factores, se realizaron *a posteriori* test LSD de comparaciones múltiples (Underwood 1997).

Tasa de fijación de N₂. Para evaluar el efecto de los cangrejos en la tasa de fijación de N₂ en sedimentos de planicies de marea y marisma, se realizaron incubaciones similares a las anteriores (tratamientos B+C, B y NBC, expuesto a luz y en oscuridad) pero en presencia de acetileno (Stewart *et al.* 1967). Este método se basa en la baja especificidad de las enzimas nitrogenasas a su sustrato natural (N₂) y su capacidad de reducir otros triples enlaces de moléculas pequeñas, como el acetileno (C₂H₂). Así, el acetileno es preferentemente reducido por la nitrogenasa aún en presencia de N₂, produciendo rápidamente etileno (C₂H₄) (Candfield *et al.* 2005). Se realizaron múltiples inyecciones de agua destilada saturada en acetileno hasta conseguir una concentración final de 10% de acetileno dentro de cada cámara (Jørgensen & Sørensen 1985).

Se tomaron muestras de agua (5 ml) al inicio, a los 60 y 120 minutos de iniciada la incubación. Las muestras fueron tomadas con jeringas y transferidas a frascos con cierre hermético para gases (“gastight”) de 12 ml que contenían 2 ml de nitrato de plata amoniacal, para precipitar el exceso de acetileno (David *et al.* 1980). La concentración de etileno en los frascos fue determinada por cromatografía gaseosa usando un cromatógrafo Tracor 560 equipado con detector de ionización de llama, con una columna Porapak Q a 40°C y N₂ ultra puro como gas portador. La tasa de fijación de N₂ fue estimada usando la proporción teórica 3:1 entre el etileno producido y el N₂ fijado (*i.e.*, en presencia de acetileno se producen tres moléculas de etileno por cada molécula de N₂ que se fijaría en ausencia de acetileno, Capone 1988). La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y de la exposición a la luz en las tasas de fijación de N₂ fue

evaluada con ANOVAs de dos vías, independientemente para la marisma y la planicie de marea (Zar 1999). La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y los sitios (*i.e.*, marisma o planicie de marea) en las tasas de fijación de N_2 fue evaluada con ANOVAs de dos vías (Zar 1999), empleando los datos agrupados respecto a la condición de luz-oscuridad.

Tasa de desnitrificación. Con el fin de evaluar el efecto de los cangrejos en la tasa de desnitrificación en sedimentos de planicies de marea y marisma, se realizaron incubaciones de laboratorio de sedimentos de los tratamientos B+C, B y NBC, en las que se determinó el potencial de desnitrificación. Se extrajo de cada plot experimental ($n = 6$ cada tratamiento) un cilindro de sedimento de 20 cm de diámetro y 5 cm de profundidad, que fue pesado y homogeneizado en el laboratorio. Una submuestra (15 g) fue incubada en el laboratorio en presencia de acetileno (10 %) con el fin de determinar la máxima actividad de desnitrificación de la biomasa de enzimas presentes en el sedimento al momento del muestreo. El acetileno inhibe la reducción del N_2O , el paso enzimático terminal de la desnitrificación, haciendo que el N_2O sea el producto final de la misma (Balderston *et al.* 1976, Oremland & Capone 1988). Para que esta inhibición sea efectiva, son necesarias altas concentraciones de nitrato, por lo que es necesario agregar nitrato (500 μM) al medio de incubación, junto con 0.1 mg L^{-1} de cloramfenicol. Este antibiótico inhibe la síntesis *de novo* de enzimas en las bacterias desnitrificadoras en respuesta a las condiciones ideales generadas durante la incubación, pero preserva la actividad de las enzimas existentes (Bernot *et al.* 2003). Las incubaciones fueron realizadas en condiciones de oscuridad, y a temperatura ambiente (20°C) durante 24 horas. A las dos horas y a las 24 horas de iniciada la incubación, se midió la concentración de N_2O en la fase gaseosa por medio de cromatografía gaseosa,

usando un cromatógrafo Tracor 560 equipado con detector de conductividad térmica, columna Porapak Q a 35°C y He ultra puro como gas portador. La diferencia en la concentración de N₂O entre la muestra inicial y final fue relacionada con el área de sedimento incubado y el tiempo de incubación para calcular el potencial de desnitrificación. La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y los sitios (*i.e.*, marisma o planicie de marea) en las tasas de desnitrificación fue evaluada con ANOVA de dos vías (Zar 1999).

Además, la tasa *in situ* de desnitrificación fue medida durante incubaciones iguales a las realizadas para la medición de fijación de N₂ (en planicie de marea y marisma, tratamientos B+C, B y NBC, y condición de luz y oscuridad), pero con el agregado de nitrato (500 µM) y cloramfenicol (0.1 mg L⁻¹), además del acetileno (10 % de saturación). Se tomaron muestras (10 ml) para medir las concentraciones de N₂O al inicio y a los 30 y 210 minutos de la adición del C₂H₂. Las concentraciones de óxido nitroso se midieron *in situ* inyectando la muestra en un frasco previamente evacuado equipado con un microsensor de N₂O (Unisense A/S), y también por cromatografía gaseosa como se describió anteriormente.

Potencial de nitrificación y mineralización de N. Para evaluar el efecto de *N. granulata* en las tasas de nitrificación y mineralización de N en sedimentos de marismas y planicie de marea se realizaron incubaciones de sedimento en el laboratorio. Las muestras de sedimento fueron extraídas de los mismos tratamientos y sitios que las correspondientes a la medida del potencial de desnitrificación. Cada cilindro de sedimento (tratamientos B+C, B y NBC correspondientes a la marisma y a la planicie de marea) fue homogeneizado y fraccionado en dos submuestras. Una submuestra (2 gr) fue transferida al frasco de incubación, que fue mantenido en oscuridad y a temperatura

ambiente durante 28 días. La otra submuestra (2 gr) fue empleada para determinar el contenido inicial de amonio y nitrato, extrayéndolos con 10 ml de KCl 1M. Luego de finalizada la incubación, se extrajo el sedimento incubado con 10 ml de KCl 1M para determinar el contenido de amonio y nitrato final. La mineralización neta de N fue estimada como el incremento en la cantidad de amonio y nitrato al final de la incubación, para el tiempo de incubación y área de sedimento correspondiente. La nitrificación fue estimada como la diferencia entre la cantidad inicial y final de nitrato para el tiempo de incubación y área de sedimento correspondiente (Robertson *et al.* 1999). La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y los sitios en las tasas de mineralización de N y nitrificación fue evaluada con ANOVAs de dos vías (Zar 1999) para cada proceso.

RESULTADOS

Flujos a través de la interfase agua-sedimento. No se observaron cambios en la salinidad y pH del agua dentro de las cámaras durante la incubación en ninguno de los sitios ni condiciones de luz.

En sedimentos de planicie de marea, el consumo de oxígeno por el sedimento fue diferente entre los distintos tratamientos (*i.e.*, B+C, B y NBC) y también entre la condición de luz/oscuridad (Tratamiento: $F_{2, 30} = 83.5$, $p < 0.05$; luz-oscuridad: $F_{1, 30} = 13.4$, $p < 0.05$; Fig. III.1A). Los análisis *a posteriori* indicaron que los tratamientos con cuevas ocupadas presentaron los mayores consumos de O_2 , siendo éstos más altos en condición de oscuridad (luz: $-5147 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, oscuridad $-4605 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.1A). Los tratamientos con cuevas no ocupadas presentaron consumos de O_2 menores a los anteriores, y también mas altos para la condición de oscuridad (luz: -3220

$\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, oscuridad: $-2000 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.1A). Los menores consumos se registraron para los tratamientos no bioturbados (NBC; $-2100 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), sin diferencias entre luz/oscuridad. El flujo de amonio entre agua-sedimento mostró efecto de tratamientos y también de luz/oscuridad, sin interacción entre ambos factores (Tratamiento: $F_{2, 30} = 26.06$, $p < 0.05$; luz-oscuridad: $F_{1, 30} = 12.34$, $p < 0.05$; Fig. III.1B). Los flujos más altos desde el sedimento hacia la columna de agua fueron registrados en los tratamientos con cuevas ocupadas (luz: $-1430 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, oscuridad: $-960 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.1B), y los más bajos en los tratamientos sin cuevas ni cangrejos (luz: $156 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; oscuridad: $-84 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Los tratamientos con cuevas no ocupadas presentaron valores intermedios, y diferencias entre luz/oscuridad (luz: $670 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; oscuridad: $-34 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Para el flujo de nitrato, hubo interacción entre los tratamientos y la condición de luz/oscuridad (Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 18.0$, $p < 0.05$; Fig. III.1C). El sedimento expuesto a la luz mostró el mayor consumo de nitrato por el sedimento en el tratamiento con cuevas ocupadas ($-1904 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.1C), valores intermedios para el tratamiento con cuevas no ocupadas ($-905 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y los menores consumos para sedimento sin cuevas ni cangrejos ($-184 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). No se encontraron diferencias entre los tratamientos en condición de oscuridad, para los que los valores de flujos de nitrato fueron similares a los encontrados para el tratamiento NBC expuesto a la luz (entre $-120 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $9 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). En la planicie de marea, los flujos de sulfato mostraron efecto de interacción entre tratamientos y condición de luz u oscuridad (Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 4.50$, $p < 0.05$; Fig. III.1D). Análisis *a posteriori* indicaron que los menores consumos de

sulfato corresponden a los tratamientos NBC expuesto a luz y B+C en oscuridad; los mayores consumos de sulfato se observaron en el tratamiento NBC en oscuridad.

En sedimentos de marisma, los flujos de oxígeno, amonio, y nitrato mostraron interacción entre tratamientos y condición de luz/oscuridad (*oxígeno*: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2,30} = 156.77$, $p < 0.05$; *amonio*: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2,30} = 24.0$, $p < 0.05$; *nitrato*: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2,30} = 5.78$, $p < 0.05$; Fig. III.2). El mayor consumo de oxígeno por el sedimento se encontró en el tratamiento B+C en oscuridad (ver Fig. III.2A; $-9370 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que el tratamiento B mantenido en oscuridad mostró menores valores que el B+C ($-6890 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), pero mayores al encontrado en el tratamiento B+C expuesto a la luz ($-3330 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Los tres tratamientos restantes, mostraron menores consumos de oxígeno, y similares entre sí (entre -89 y $-500 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). El flujo de amonio hacia la columna de agua fue mayor en el tratamiento B+C en oscuridad ($+360 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.2B), seguido por el tratamiento B también en oscuridad ($+109 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). En los tratamientos restantes, el flujo de amonio fue desde la columna de agua hacia el sedimento, siendo menor en ambos tratamientos NBC y en el tratamiento B expuesto a la luz (entre -63 y $-108 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), y mayor en el tratamiento B+C expuesto a la luz ($-223 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). El mayor consumo de nitrato por el sedimento se observó en los tratamientos B+C con y sin exposición a la luz ($-815 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $-765 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ respectivamente); los tratamientos con cuevas no ocupadas mostraron valores menores, y también diferencias entre luz ($-637 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y oscuridad ($-483 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). El tratamiento NBC expuesto a la luz mostró consumos de nitrato menores aún ($-163 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), y no expuesto a la luz mostró flujos desde el sedimento a la columna de agua ($+196 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig.

III.2C). El flujo de sulfato mostró interacción entre la condición de luz-oscuridad y los tratamientos experimentales (Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 6.86$, $p < 0.05$). Ambos tratamientos NBC mostraron flujos de sulfato desde el sedimento hacia la columna de agua, de magnitud similar (ver Fig. III.2D). Los tratamientos con cuevas no ocupadas tampoco mostraron diferencias entre sí, pero a diferencia de los tratamientos NBC, mostraron consumo de sulfato por el sedimento. El tratamiento B+C expuesto a la luz mostró mayores consumos de sulfato que los tratamientos B, pero menores que el consumo registrado en el tratamiento B+C incubado en oscuridad.

También se observaron diferencias en el consumo de oxígeno entre los tratamientos y sitios para sedimentos expuestos a la luz (Tratamiento: $F_{2, 30} = 108.55$, $p < 0.05$; Sitio: $F_{1, 30} = 85.32$, $p < 0.05$; Fig. III.3A). El mayor consumo de O_2 se observó en los tratamientos B+C ($-4605 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para la planicie de marea y $-3328 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ para la marisma), los valores intermedios para los tratamientos B y NBC en la planicie (-2000 y $-2066 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ respectivamente) y los menores consumos para los tratamientos B y NBC en la marisma (-89 y $-113 \mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ respectivamente). El sedimento incubado en oscuridad mostró interacción entre los sitios y tratamientos (Tratamiento x Sitio: $F_{2, 30} = 140.71$, $p < 0.05$; Fig. III.3B). Todos los tratamientos fueron diferentes entre sí, y los mayores consumos fueron para los tratamientos con cuevas y cangrejos de la marisma, seguido por los tratamientos con cuevas ocupadas y no ocupadas de la planicie. Los menores consumos se observaron en los tratamientos sin cuevas ni cangrejos de la planicie y de la marisma (ver Fig. III.3B).

Los flujos de NID (agrupados para luz y oscuridad) mostraron interacción entre los tratamientos y el tipo de ambiente (*i.e.*, planicie de marea o marisma) (Tratamiento x Sitio: $F_{2, 30} = 9.51$, $p < 0.05$; Fig. III.4). Los análisis *a posteriori* indicaron que en la

planicie de marea, no hubo efecto de los cangrejos en los flujos de NID, mientras que en la marisma, las cuevas ocupadas estimularon la toma de NID por parte del sedimento.

Tasa de fijación de N₂. En sedimentos de planicie de marea, la tasa de fijación de N₂ mostró diferencias entre los tratamientos y entre la condición de luz/oscuridad, sin interacción significativa entre ambos factores (Tratamiento: $F_{2,30} = 40.79$, $p < 0.05$; luz-oscuridad: $F_{2,30} = 8.73$, $p < 0.05$; Fig. III.5A). Los análisis *a posteriori* indicaron que los tratamientos con cuevas ocupadas, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, presentaron los menores valores para la tasa de fijación de N₂ (luz: $5.62 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; oscuridad $7.34 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.5A). Los tratamientos con cuevas no ocupadas presentan tasas de fijación de N₂ con valores intermedios, sin diferencias en cuanto a la presencia/ausencia de luz (luz: $13.34 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; oscuridad: $10.80 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. III.5A). Los valores más altos fueron encontrados en el tratamiento sin cuevas ni cangrejos (NBC) en luz ($23.06 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

En sedimentos de marisma, se encontraron diferencias entre los tratamientos pero no entre la condición de luz u oscuridad (Tratamiento: $F_{2,30} = 14.01$, $p < 0.05$; Fig. III.5B). Los valores más altos fueron encontrados en sedimento activamente bioturbado (promedio luz-oscuridad: $102.17 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), para los tratamientos con cuevas no ocupadas se encontraron valores intermedios de tasas de fijación de N₂ (promedio luz-oscuridad: $51.52 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que los tratamientos no bioturbados presentaron las menores tasas (promedio luz-oscuridad: $29.14 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Por otra parte, para ambas condiciones de luz-oscuridad, las tasas de fijación de N₂ mostraron efecto de interacción entre el sitio (marisma o planicie de marea) y el tratamiento (ANOVA de 2 vías; Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2,66} = 37.84$, $p < 0.05$; Fig. III.6). Los análisis *a posteriori* indicaron que la mayor tasa de fijación de N₂

corresponde al tratamiento B+C en la marisma ($102.17 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y la menor al B+C en la planicie de marea ($6.48 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Los tratamientos no bioturbados (NBC) de la marisma y de la planicie de marea no muestran diferencias entre sí ($29.14 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $19.82 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente), y presentaron valores intermedios entre los tratamientos B+C de la marisma y de la planicie de marea. El tratamiento B de la marisma tuvo tasas de fijación de N_2 menores que el B+C de dicho sitio, y mayores que las de los NBC; y el tratamiento B de la planicie de marea mostró tasas mayores que el B+C de este sitio pero menores que los NBC (ver Fig. III.6).

Tasa de desnitrificación. Los potenciales de desnitrificación fueron más altos en sedimentos de la marisma de *S. alterniflora* que en sedimentos de la planicie de marea (Sitio: $F_{1, 30} = 83.81$, $p < 0.05$; Fig. III.7). Además, en ambos sitios se observaron diferencias entre los distintos tratamientos (Tratamiento: $F_{2, 30} = 20.06$, $p < 0.05$; Fig. III.7). Los análisis *a posteriori* indicaron que en la marisma el potencial de desnitrificación fue mayor para sedimentos activamente bioturbados (cuevas ocupadas: $63.24 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que los menores valores fueron registrados para sedimentos sin cuevas ni cangrejos ($31.58 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$); con valores intermedios para los sedimentos con cuevas no ocupadas ($51.82 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Por otra parte, en la planicie de marea se observó un patrón similar, con los mayores potenciales de desnitrificación en sedimentos con cuevas ocupadas y no ocupadas (29.16 y $22.81 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ respectivamente), y los menores en sedimentos sin cuevas ni cangrejos ($8.30 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Las tasas de desnitrificación *in situ* fueron menores que el límite de detección del método empleado ($1 \mu\text{mol N}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), tanto para la marisma como para la planicie de marea y en condición de luz y oscuridad, por lo cual no fueron incluidas en este análisis.

Potencial de nitrificación y mineralización de N. La tasa de mineralización de N mostró efecto de interacción entre los sitios y tratamientos (Tratamiento x Sitio: $F_{2, 30} = 45.65$, $p < 0.05$; Fig. III.8A). Las mayores tasas de mineralización de N fueron encontradas para sedimentos con cuevas ocupadas en la marisma ($4028.6 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y en segundo lugar para cuevas ocupadas en la planicie de marea y cuevas no ocupadas en la marisma ($1848.35 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $1527.60 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Los menores valores correspondieron a cuevas no ocupadas en la planicie de marea, y a ambos tratamientos sin cuevas ni cangrejos.

La tasa de nitrificación también mostró efecto de interacción entre los factores (Tratamiento x Sitio: $F_{2, 30} = 142.31$, $p < 0.05$; Fig. III.8B). Los mayores valores se registraron para sedimentos con cuevas ocupadas en la marisma ($3107.44 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y en segundo término para cuevas no ocupadas también en la marisma ($1158.92 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). Los tratamientos con cuevas ocupadas de la planicie de marea y sin cuevas ni cangrejos de la marisma presentaron tasas intermedias de nitrificación, sin diferencias entre ambos ($453.56 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y $381.47 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Las menores tasas de nitrificación fueron encontradas para los tratamientos B y NBC de la planicie, sin diferencias entre ambos.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente Capítulo muestran un importante impacto de la actividad de *Neohelice granulata* en el metabolismo bentónico, flujos de nutrientes disueltos entre el sedimento y la columna de agua, y también en los procesos relacionados con el ciclo del N, tanto en marismas de *Spartina alterniflora* como en las planicies de marea adyacentes a las mismas. Además, los efectos de la actividad de este

cangrejo fueron contrastantes entre marismas y planicie de marea para muchos de los procesos evaluados. La presencia y actividad de los cangrejos estimula el metabolismo bentónico de la planicie de marea y de la marisma, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. De la misma manera, en ambos sitios los procesos de mineralización de N, nitrificación y desnitrificación resultan también favorecidos. Sin embargo, la fijación de N_2 es estimulada en la marisma, pero inhibida en sedimentos de planicies de marea. Por otra parte, en la planicie de marea, los cangrejos incrementan los flujos de amonio desde el sedimento hacia la columna de agua tanto en presencia de luz como en oscuridad, mientras que en la marisma, estimulan la toma de amonio por parte del sedimento (*i.e.*, flujo desde la columna de agua hacia el sedimento). A su vez, en la marisma aumentan el consumo de nitrato tanto en luz como en oscuridad, mientras que en la planicie de marea sólo lo hacen en presencia de luz. Los experimentos realizados muestran que la presencia y la actividad de este cangrejo tienen efectos más intensos que los efectos producido por la presencia de sus cuevas para todos los procesos evaluados.

Estudios previos sugieren que la macrofauna y las macrófitas afectan sustancialmente los ciclos geoquímicos de los elementos en ambientes marinos (ver Kostka *et al.* 2002, Pedersen *et al.* 2004, Kristensen & Kostka 2005), pero pocos estudios con enfoque experimental determinaron directamente los efectos biogeoquímicos de estos macroorganismos, y su impacto en los flujos bentónicos y ciclo del N. En este Capítulo se muestra, por medio de experimentos de campo, que *N. granulata* tiene un importante impacto en el intercambio de O_2 , SO_4^{2-} , y NID (*i.e.*, NH_4^+ y NO_3^-) entre el sedimento y la columna de agua, tanto en marismas como en planicies de marea. El metabolismo bentónico (entre -90 y -9300 $\mu\text{mol } O_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) y el efecto de la macrofauna en el consumo de O_2 (entre 2.75 y 35-90 veces más altos en sedimentos

bioturbados que en sedimentos no-bioturbados, para planicies de marea y marismas, respectivamente) son altos comparados con los rangos previamente reportados para otros sistemas costeros (Hansen & Kristensen 1997, Alongi 1998, Gribsholt & Kristensen 2003). El consumo de O₂ por el sedimento es el resultado del metabolismo aeróbico y anaeróbico de los macro- y micro- organismos bentónicos, vegetación (microfitobentos en planicies de marea; microfitobentos y macrófitas en marismas), y de la interacción entre el oxígeno difundiendo hacia el sedimento y la re-oxidación de los compuestos metabólicos que difunden desde el sedimento. Las actividades de los cangrejos y sus cuevas estimulan la toma de oxígeno en la marisma y planicie de marea en condiciones de oscuridad; sin embargo en condiciones de luz, este proceso es sólo estimulado por la actividad bioturbadora del cangrejo pero no por la presencia de sus cuevas. Las diferencias entre los consumos de oxígeno en luz y oscuridad para cada tratamiento (ver Figs. III.1A y III.2A) indican que la actividad de los cangrejos y la presencia de sus cuevas estimulan la producción primaria, siendo mayor este incremento en la marisma que en la planicie de marea.

Los ecosistemas costeros de aguas someras son importantes sitios para la remineralización de materia orgánica (Burdige 2006, Herbert 1999, Jørgensen & Revsbech 1989). Varios estudios indican que la remineralización de N mediada por la actividad heterotrófica de macro-organismos y microbiota tiene un rol importante en el sustento de la producción primaria tanto en ambientes dominados por fitoplancton o por macrófitas (La Roche 1983, McGlathery *et al.* 2004). En los sedimentos intermareales del ASO, *N. granulata* incrementa la remineralización de MO por medio del aumento de la interfase agua-sedimento (*i.e.*, cuevas) y por medio de sus actividades de bioturbación (Capítulo I). La producción de nitrógeno inorgánico disuelto ocurre en

conjunto con la producción de carbono orgánico disuelto, por medio de la hidrólisis del material orgánico particulado (Fenchel *et al.* 1998). Así, la producción de amonio (o remineralización de N) esta enlazada y es dependiente de la remineralización de carbono orgánico (Fenchel *et al.* 1998). En este sentido, los presentes resultados muestran que los cangrejos aumentan más los potenciales de remineralización de N y nitrificación en la marisma que en la planicie de marea; además, cerca del 75% del N remineralizado en la marisma es nitrificado, mientras que en la planicie de marea solo se nitrifica el 10-25% del N remineralizado. Sin embargo, el incremento de las interfaces óxicas/anóxicas producido por las estructura de las cuevas y por la actividad de bioturbación, puede aumentar la desnitrificación tanto directamente al incrementar el flujo de nitrato hacia el sedimento, como indirectamente incrementando la nitrificación (Piegri *et al.* 1999, Nizzoli *et al.* 2002, Nielsen *et al.* 2004). Los resultados del presente Capítulo muestran que tanto los cangrejos como sus cuevas estimulan el potencial de desnitrificación en marismas y planicies de marea (ver también Capítulo I), pero las tasas de desnitrificación *in situ* fueron muy bajas en ambos sitios (debajo de $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{h}^{-1}$) comparadas con las registradas en sistemas similares (ver Hamersley & Howes 2005, Herbert 1999). En sedimentos de planicies de marea, la actividad de bioturbación incrementó los flujos de amonio hacia la columna de agua, en sedimentos expuestos a la luz y en oscuridad, posiblemente debido a que el incremento en la remineralización de N excede los requerimientos del microfitobentos y las tasas de nitrificación (ver McGlathery *et al.* 2004, Hamersley & Howes 2005). En las planicies de marea estudiadas en este Capítulo, los cangrejos estimulan la producción primaria del microfitobentos y también la toma de nutrientes por el sedimento expuesto a la luz (ver Resultados); por lo que probablemente, como ocurre en muchas planicies de marea

donde el amonio no es limitante, la producción de oxígeno por el microfitobentos promueve el acople entre la nitrificación y desnitrificación (Canfield *et al.* 2005, An & Joye 2001, Howes & Teal 1994).

En sedimentos de marismas, hay un aumento en las tasas de consumo de amonio remineralizado por el sedimento, cuando los cangrejos o sus cuevas están presentes en sedimento mantenido en oscuridad, indicando que en oscuridad la producción de amonio por mineralización de MO excede su consumo por las raíces de las macrófitas (*i.e.*, *Spartina alterniflora*) y los requerimientos de organismos nitrificadores (McGlathery *et al.* 2004, Hamersley & Howes 2005). Sin embargo, en sedimentos expuestos a la luz, los cangrejos estimulan la toma de amonio por el sedimento por medio de la estimulación de la toma e inmovilización de nutrientes por parte de las plantas y el microfitobentos (Daleo *et al.* 2007, Pedersen *et al.* 2004). En oscuridad, el nitrato es exportado desde el sedimento hacia la columna de agua, pero es consumido por el sedimento en condiciones de luz, como resultado de los requerimientos de las plantas y bacterias heterótrofas (Fenchel *et al.* 1998). Sin embargo, tanto las actividades de los cangrejos como sus cuevas cambian el flujo de nitrato saliente a entrante (*i.e.*, consumo por el sedimento) cuando el sedimento permanece en oscuridad; y aumentan el consumo de nitrato del sedimento expuesto a luz. Debido a que las tasas de desnitrificación son muy bajas (para revisiones completas ver Hamersley & Howes 2005, Herbert 1999), y a que la mayor parte de los organismos autótrofos prefieren amonio y no nitrato como fuente primaria de N (Fenchel *et al.* 1998), este incremento del consumo de nitrato estimulado por la bioturbación en oscuridad no puede ser explicado por medio de estos procesos. Trabajos recientes han mostrado que la reducción no-asimilativa de nitrato a amonio (DNRA, de “dissimilatory nitrate

reduction to ammonium”), que incluye la reducción de nitrato acoplada a la oxidación de sulfuro, puede ser un proceso importante en sedimentos intermareales y estuarinos (Burdige 2006, Tobias *et al.* 2001, An & Gardner 2002). Por otra parte, tanto los cangrejos como la presencia de sus cuevas invierten el flujo de sulfato desde el sedimento hacia a la columna de agua (sedimento no bioturbado) a consumo de sulfato por el sedimento; indicando que las actividades de bioturbación estimulan la reducción de sulfato (y la producción de sulfuro) en mayor grado en la oscuridad (*e.g.*, Aller & Yingst 1978, Hansen *et al.* 1996). Así, las altas tasas de consumo de nitrato y sulfato en sedimentos bioturbados de marismas en períodos de oscuridad, podrían estar relacionadas entre sí por medio de la amonificación de nitrato (DNRA) acoplada a la reoxidación de sulfuro. De esta forma, los cangrejos y sus cuevas estarían estimulando directa e indirectamente, el flujo de amonio hacia la columna de agua. Así, las plantas no solo compiten con otras plantas sino que también compiten con microorganismos (*e.g.*, desnitrificadores o reductores de nitrato) y con procesos químicos por los nutrientes inorgánicos disueltos (en este caso nitrato) (Pedersen *et al.* 2004). De esta forma, los nutrientes que son asimilados por las plantas permanecen temporalmente inmovilizados y entonces no disponibles para otros procesos biogeoquímicos que consuman nutrientes.

Los flujos bentónicos de N pueden ser usados como una medida neta de los procesos individuales involucrados en el reciclado de este elemento en el sedimento (Blackburn & Henriksen 1983, Herbert 1998). Cuando se evalúan los flujos de NID tanto para sedimentos de planicies de marea como para marismas, indistintamente de la condición de luz u oscuridad (Fig. III.4), se observa que en los sedimentos de planicies de marea no hay efecto de bioturbación, y no hay un intercambio neto de NID entre el

sedimento y la columna de agua; mientras que en la marisma, tanto las cuevas no ocupadas como las ocupadas incrementan el flujo de NID hacia el sedimento. Este efecto contrastante de los cangrejos en los flujos bentónicos de NID para marismas y planicies de marea puede ser explicado si se tiene en cuenta que, si bien en ambos sitios los cangrejos estimulan la degradación de MO (ver Capítulos I y IV) y el metabolismo bentónico (ver resultados); en la marisma también estimulan el consumo de NID por los productores primarios (*e.g.*, Daleo *et al.* 2007, Bertness 1985, Montague 1982). Esto explicaría el incremento en el flujo de NID hacia la columna de agua en la planicie de marea, y la estimulación del consumo de NID por el sedimento en la marisma. Esto resultaría en una mayor disponibilidad de NID en el sedimento bioturbado en la planicie de marea, y una menor disponibilidad de estos nutrientes en el sedimento bioturbado de la marisma. La disponibilidad de N fijado es considerada como el principal factor que regula la producción primaria en ambientes marinos someros (Valiela *et al.* 1978, Herbert 1999, Hauxwell & Valiela 2004). Debido a que el triple enlace $N\equiv N$ es muy estable, la reducción biológica de N_2 a amonio (*i.e.*, fijación de N_2) es un proceso energéticamente costoso y no favorable en sitios donde el NID está disponible (Fenchel *et al.* 1998). En la planicie de marea, donde la luz no es un factor limitante pero sí lo es la disponibilidad de material orgánica (ver Capítulo IV), los organismos foto-autótrofos fijadores de N_2 (como las cianobacterias) tienen ventajas sobre los organismos fijadores de N_2 heterótrofos (Herbert 1999). En este sentido, en la planicie de marea la bioturbación por *N. granulata* reduce la tasa de fijación de N_2 , probablemente debido tanto al aumento de la disponibilidad de NID, como a la limitación de luz incidente sobre las cianobacterias por medio de su enterramiento continuo. En las marismas, la fijación de N_2 por cianobacterias es considerada una fuente de N poco importante

comparada con la fijación de N_2 heterotrófica (*e.g.*, por ejemplo por bacterias reductoras de sulfato; Fenchel *et al.* 1998). Varios trabajos sugieren que las plantas limitadas por N exudan carbono orgánico lábil en sus rizósferas, lo que activa la fijación de N_2 por bacterias reductoras de sulfato (Fenchel *et al.* 1998). En este sentido, la bioturbación por *N. granulata* aumenta la disponibilidad de carbono orgánico lábil (*e.g.*, incrementan el flujo de carbohidratos hacia la columna de agua; ver Capítulo IV), reducen la disponibilidad de NID (*i.e.*, aumentando el consumo de NID; estos resultados), y estimulan la actividad de las bacterias reductoras de sulfato (estimulan el consumo de sulfato; estos resultados). Así, las actividades de los cangrejos estimulan la fijación de N_2 en sedimentos de marismas de *S. alterniflora*, posiblemente realizada por un arreglo de bacterias reductoras de sulfato y otras bacterias heterótrofas fijadoras de N_2 (ver Herbert 1999).

Muchos trabajos previos sugieren que la macrofauna de sedimentos intermareales afecta la biogeoquímica del sedimento y el acoplamiento entre los sistemas bentónicos y pelágicos (Marinelli 1994, Marinelli & Williams 2003). Sin embargo, la mayoría de ellos están basados en medidas de campo descriptivas o incubaciones de laboratorio que incorporan la bioturbación como variable (pero ver Webb & Eyre 2004, Capítulos I y IV). Las mediciones de campo sólo muestran patrones descriptivos de los diferentes procesos biogeoquímicos; y las incubaciones en laboratorio demuestran los efectos de la bioturbación en estos procesos, pero generalmente no representan los efectos reales que la bioturbación puede tener en la naturaleza. En este sentido, por medio de mediciones *in situ* con cámaras bentónicas usadas dentro de experimentos de manipulación, los presentes resultados confirman los trabajos previos que sugerían que la macrofauna influencia profundamente el ciclo del N y los flujos de NID en sedimentos marinos; y

que muchos de estos efectos tienen en dirección opuesta en marismas y planicies de marea. Varios trabajos muestran que la bioturbación y las macrófitas enraizadas crean un ambiente redox oscilante (*e.g.*, Aller 1994, Holmer *et al.* 2002), donde las tasas de remineralización de MO son altas, y el metabolismo del sedimento y ciclo del N son muy afectados. Los resultados mostrados aquí no sólo demuestran que la bioturbación y las macrófitas pueden afectar el metabolismo bentónico y procesos del ciclo del N, sino también que la interacción entre bioturbación y macrófitas puede ser un componente importante afectando la exportación de nutrientes disueltos desde marismas hacia las aguas abiertas. Dado que el cangrejo cavador *N. granulata* y *S. alterniflora* co-existen en una amplia zona a lo largo de los estuarios y bahías del ASO (Botto *et al.* 2005, Alberti *et al.* 2007, Daleo *et al.* 2007), los efectos individuales y conjuntos de ambos organismos pueden ser el principal factor que controla las tramas tróficas estuarinas y costeras.

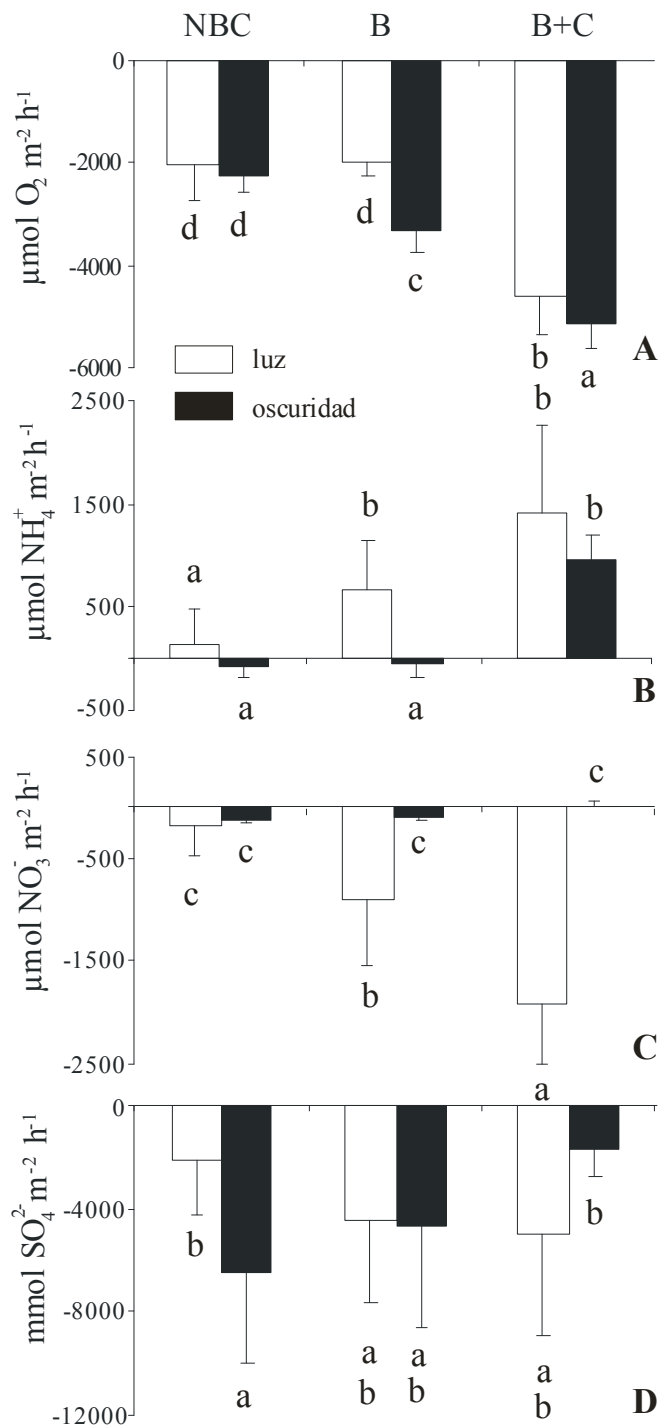


Fig. III.1. Flujos bentónicos de oxígeno (A), amonio (B), nitrato (C), y sulfato (D) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC en sedimentos de planicies de marea incubados en condiciones de luz y oscuridad. Valores negativos indican flujos desde la columna de agua hacia el sedimento. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

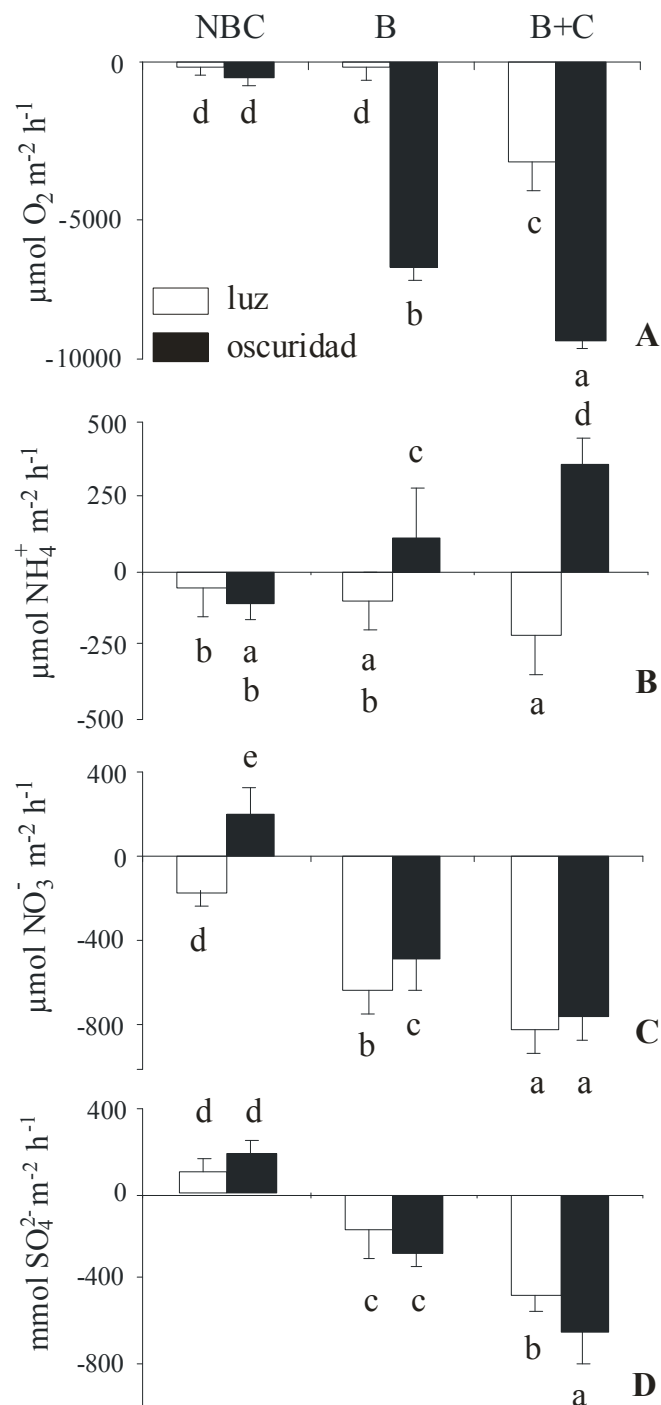


Fig. III.2. Flujos bentónicos de oxígeno (A), amonio (B), nitrato (C), y sulfato (D) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC en sedimentos de marismas incubados en condiciones de luz y oscuridad.

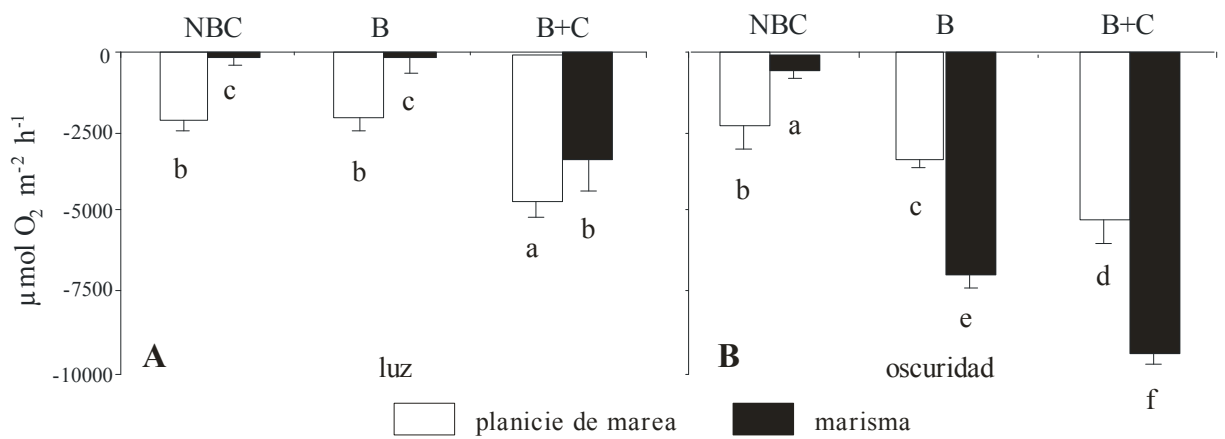


Fig. III.3. Consumo de oxígeno por el sedimento en marisma y planicie de marea en condiciones de luz (A) y oscuridad (B) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC.

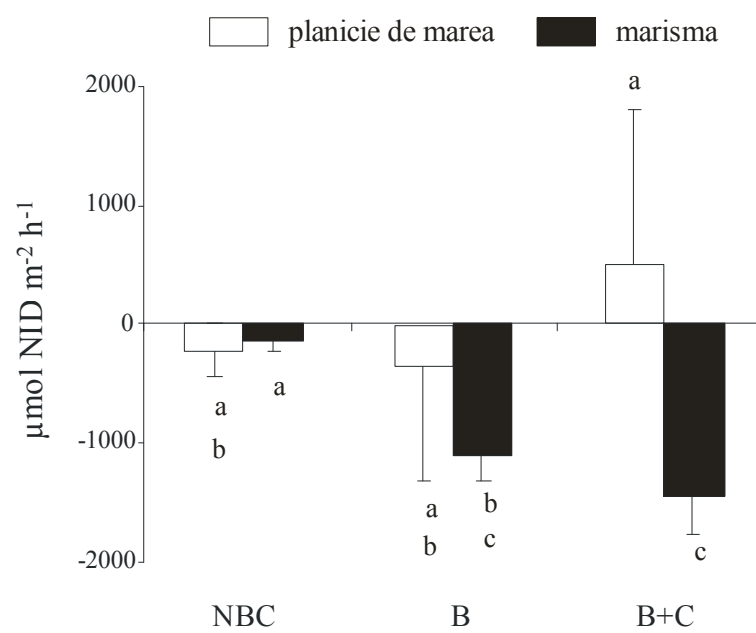


Fig. III.4. Flujos bentónicos de NID para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC de marisma y planicie de marea en condiciones de luz y oscuridad (datos agrupados para luz y oscuridad).

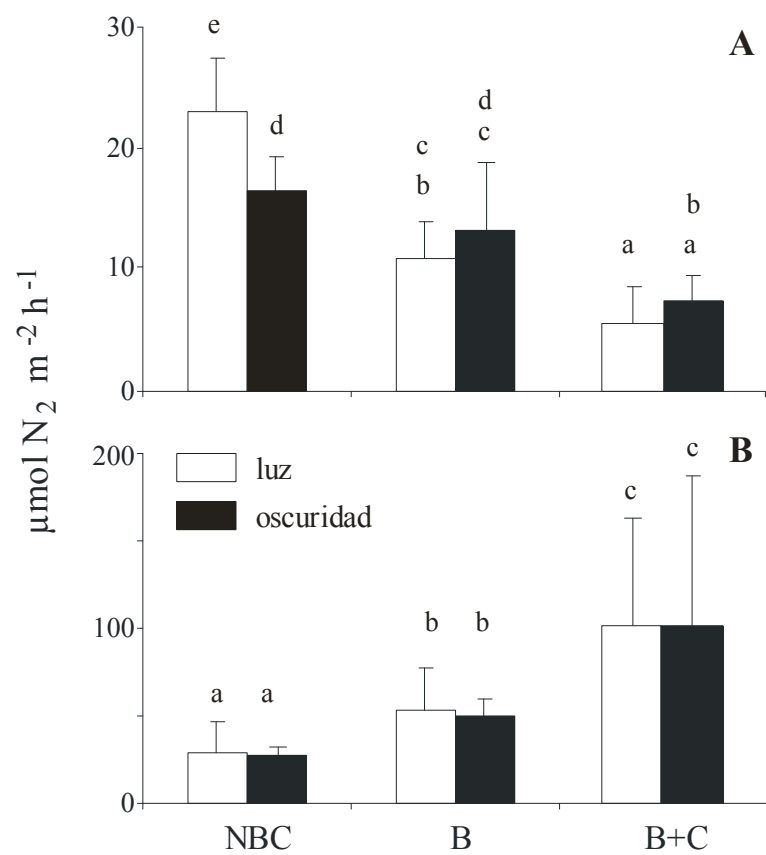


Fig. III.5. Tasas de fijación de N_2 en los tratamientos experimentales en la planicie de marea (A) y marisma (B) para sedimentos expuestos a luz y oscuridad.

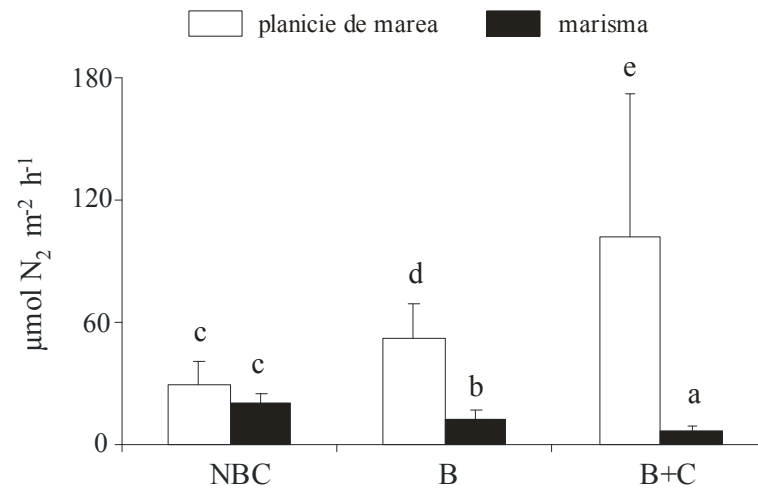


Fig. III.6. Tasa de fijación de N₂ comparando los tratamientos experimentales de la planicie de marea y de marisma para ambas condiciones de luz y oscuridad (datos agrupados para luz y oscuridad).

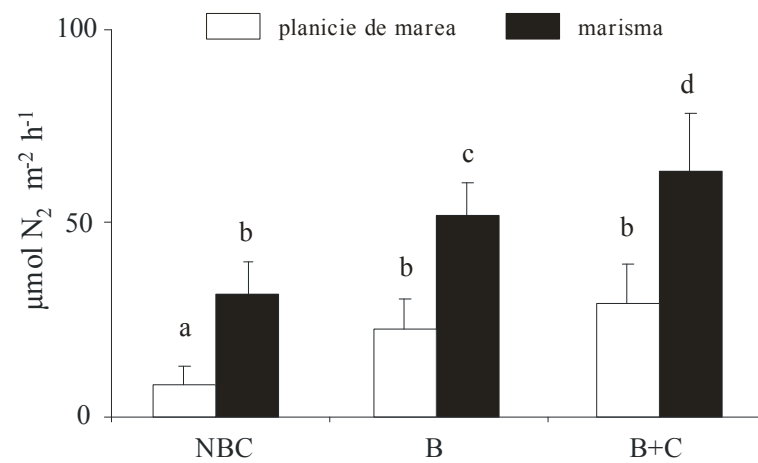


Fig. III.7. Potencial de desnitrificación para los tratamientos experimentales de la marisma y planicie de marea.

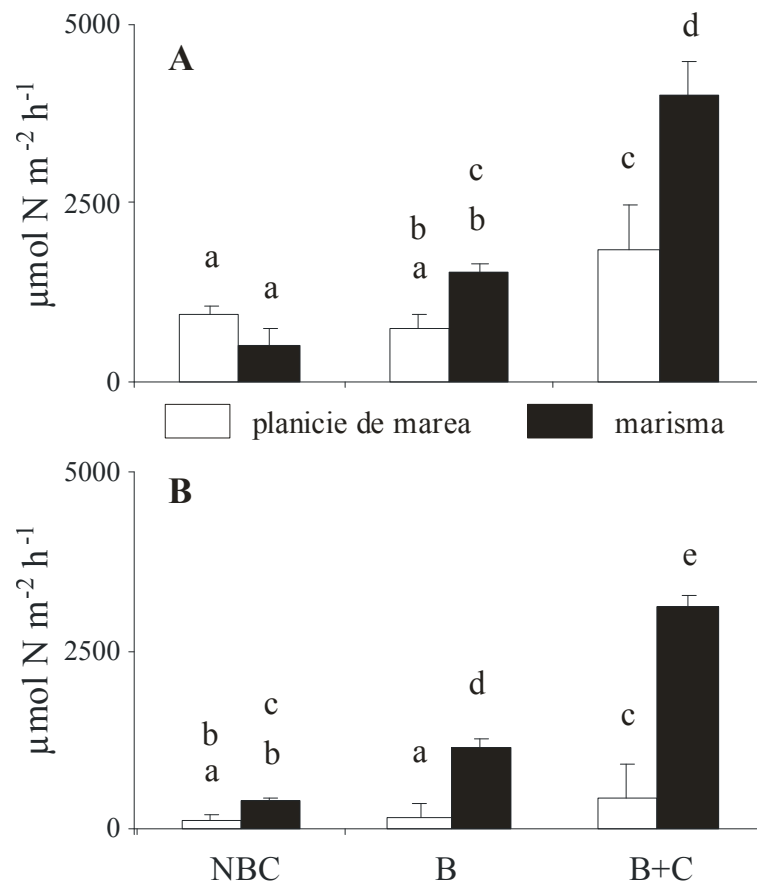


Fig. III.8. Tasas de mineralización de N (A) y nitrificación (B) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC en sedimentos de marisma y planicie de marea.

CAPÍTULO IV

Efecto del cangrejo *Neohelice granulata* en flujos bentónicos y calidad de materia orgánica en sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental

INTRODUCCIÓN

Los productores primarios son cuantitativamente importantes en la mayoría de los sistemas costeros someros, y aunque estas áreas representan menos del 2% de la superficie oceánica, en ellas se genera cerca del 20% de la producción primaria marina global (Charpy-Robaud & Sournia 1990, Pedersen *et al.* 2004). Mientras que algo del carbono fijado por los productores primarios es consumido por herbívoros, la mayor parte de este carbono entra a la trama trófica detritívora. Así, el ingreso de material orgánico al sedimento puede ser en forma de material particulado detrítico proveniente de tejidos muertos, pero también puede ser en forma de secreciones de sustancias solubles provenientes de las raíces de las plantas (Hines *et al.* 1989). Además, en sistemas someros las microalgas bentónicas pueden presentar tasas fotosintéticas muy altas (Revsbech & Jørgensen 1981); y la liberación de materia orgánica disuelta (MOD) por el microfítobentos está positivamente relacionada con la tasa fotosintética (Biddanda & Benner 1997). En este sentido, el microfítobentos, especialmente cuando forma matas de microalgas marinas, provee un sustrato lábil que sustenta muy altas tasas de metabolismo microbiano (Revsbech *et al.* 1983, Biddanda & Benner 1997). Este funcionamiento es análogo a las plantas vasculares enraizadas, pero a otra escala (Fenchel *et al.* 1998). Entonces, en sedimentos intermareales costeros, la biomasa en descomposición es convertida nuevamente a carbono inorgánico a través de la hidrólisis/fermentación (con formación de carbono orgánico disuelto) y su subsecuente mineralización (formación de CO₂) por organismos heterótrofos (Canfield 1993, Kristensen & Holmer 2001).

La principal característica de sedimentos y suelos es que son sistemas esencialmente heterotróficos, en los que los productos de la producción primaria son

remineralizados y reciclados nuevamente hacia los foto-autótrofos. A causa de esta función heterotrófica, la calidad y cantidad de material orgánico particulado que recibe el sedimento es el factor más importante que controla los procesos que ocurren en el mismo (Fenchel *et al.* 1998). En particular, la geoquímica de sedimentos marinos es controlada tanto por la composición del material inicialmente depositado en el sedimento, como por los procesos químicos, físicos y biológicos que afectan a este material luego de su depositación. Estos procesos entran dentro de la categoría general conocida como diagénesis temprana (*sensu* Berner 1980; Burdige 2006). Además, la degradación microbiana del carbono orgánico en el sedimento ocurre a escalas de tiempo que van desde horas (para la ruptura biológica de bio-moléculas simples), hasta millones de años (para la mineralización de material muy refractario en sedimentos marinos profundos; Canfield *et al.* 2005). Aunque se considera que la calidad de la materia orgánica (*i.e.*, su composición química) es un factor importante que afecta su utilización microbiana, hay relativamente poca información acerca de la relación entre la biodisponibilidad y composición química de esta materia orgánica disuelta (pero ver Henrichs 1992, Benner 2003, Canfield *et al.* 2005). La porción lábil de la materia orgánica principalmente consiste en compuestos simples o combinados (*i.e.*, biopolímeros), e incluye carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que son rápidamente remineralizados; mientras que la materia orgánica refractaria, compuesta por sustancias complejas como ácidos húmicos y lignina, es lentamente mineralizada (Henrichs 1992).

La infauna participa directamente en los procesos sedimentarios por medio del metabolismo de materia orgánica acoplada a la respiración aeróbica y excreciones metabólicas (Furukawa 2005). Los organismos infaunales también modifican las vías

metabólicas y los hábitats microbianos cambiando los regímenes de transporte, la disponibilidad de sustancias disueltas y particulada, y también por la creación de ambientes con fluctuaciones en sus estados redox (Furukawa 2005, Capítulo I). Usualmente, la bioturbación incrementa el metabolismo de toda la comunidad bentónica (*e.g.*, Kristensen 1985, Doering *et al.* 1987, Andersen & Kristensen 1992, Capítulos I y III). Por medio de la activa irrigación y el movimiento de sedimentos por organismos bioturbadores, se inyectan constantemente oxígeno y otros aceptores de electrones a las capas anóxicas del sedimento, y desplazan rápidamente partículas entre las capas óxicas y anóxicas (Aller 1994). Además, sedimentos y detritos en descomposición en capas óxicas superficiales pueden ser transportados a capas anóxicas de sedimento y viceversa durante la actividad de los bioturbadores, transfiriendo sustratos orgánicos lábiles a bacterias anaeróbicas y sustancias relativamente inertes a las bacterias aeróbicas capaces de degradarlas (Montagne 1982, Hansen & Kristensen 1998). Así, aunque en sedimentos costeros las bacterias son responsables de la descomposición de la materia orgánica sedimentaria, la tasa de diagénesis temprana y la biogeoquímica de sedimentos costeros son influenciadas por varios factores, incluyendo la tasa de aporte de material orgánico del sistema, la fuente de detritos (*i.e.*, calidad/composición), la temperatura, intensidad de bioturbación, y la tasa de sedimentación (Alongi 1998).

En sedimentos costeros, el carbono orgánico disuelto (COD) es producido como un intermediario en el proceso de remineralización de materia orgánica (Alperin *et al.* 1994, Burdige 2006). Debido a esto, y teniendo en cuenta procesos únicamente difusivos, esto implicaría que los sedimentos constituyen una fuente potencial de COD y nitrógeno orgánico disuelto (NOD) para las aguas costeras (Alperin *et al.* 1999, Burdige 2006). La identificación de las reacciones y los procesos de transporte que

afectan las concentraciones, distribución y composición (y reactividad) de la MOD en agua de poro es entonces crítico para entender los procesos que controlan la mineralización, metabolismo bentónico y los flujos de MOD hacia la columna de agua (Komada *et al.* 2004). Los sedimentos intermareales del Atlántico Sudoccidental presentan altos coeficientes de bioturbación (ver Capítulo I, Iribarne *et al.* 1997). En estas áreas, la intensa bioturbación ejercida por el cangrejo cavador *Neohelice granulata* afecta las tasas de remoción de sedimento (Capítulo I), incrementa la oxigenación del sedimento (Daleo *et al.* 2007), aumenta el metabolismo bentónico (Capítulo I, Capítulo III) y los flujos bentónicos de nutrientes inorgánicos (Capítulo III). Varios trabajos muestran que los extensos cangrejales de *N. granulata* son importantes áreas de retención de macrodetritos, sugiriendo que podrían reducir la cantidad de materia orgánica exportada desde las marismas, e incrementar localmente el contenido de materia orgánica del sedimento (Iribarne *et al.* 1997, Botto *et al.* 2006). En este contexto, el objetivo principal de este Capítulo es evaluar y cuantificar el efecto del cangrejo cavador *N. granulata* en: (1) la tasa de remineralización de materia orgánica (*i.e.*, metabolismo bentónico neto) en sedimentos intermareales; (2) el contenido, composición y labilidad de la materia orgánica del sedimento; y (3) los flujo de MOD entre el sedimento y la columna de agua, y la composición de esta MOD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. Este estudio fue realizado en el extremo sur de la Bahía de Samborombón, en planicies de marea y marismas de *Spartina alterniflora* ubicadas en las cercanías de San Clemente del Tuyú, entre Tapera de López y Punta Rasa (Este de la

Bahía de Samborombón, 36° 22' S, 56° 45' O). Para una descripción detallada ver Capítulo III.

Diseño experimental. Para evaluar el efecto de *Neohelice granulata* en el metabolismo bentónico, flujos de materia orgánica disuelta a través de la interfase agua-sedimento, y calidad de la materia orgánica del sedimento, se realizó un experimento de campo manipulando las densidades de cuevas y de cangrejos dentro de unidades experimentales, tanto en sedimentos de planicies de marea como en sedimentos de marisma. El diseño experimental consiste en tres tratamientos con 12 réplicas cada uno en sedimentos de marisma y planicie de marea. Los tratamientos fueron (1) inclusiones de individuos adultos de *N. granulata* dentro de cuevas artificialmente construidas (B+C); (2) cuevas artificialmente construidas no habitadas (B); y (3) exclusiones de cuevas y cangrejos usados como control no bioturbado (NBC). Ver detalles en Capítulo III.

Flujos a través de la interfase agua-sedimento. Los flujos de solutos a través de la interfase agua sedimento y el metabolismo bentónico fueron medidos en cada unidad experimental (ver arriba) usando el método *in situ* de las cámaras flexibles. Las cámaras fueron construidas de la misma forma que las del Capítulo III, siguiendo a Asmus *et al.* (1998). Las incubaciones fueron realizadas durante marea alta, insertando las cámaras 12 cm en el sedimento de cada una de las unidades experimentales, teniendo especial cuidado de que no queden burbujas de aire atrapadas dentro de las mismas. A la mitad de las cámaras de cada tratamiento se las dejó expuestas a la luz solar (n = 6 cada tratamiento), mientras que a la otra mitad (n = 6 cada tratamiento) se las cubrió con un film opaco de aluminio para generar condiciones de oscuridad en el interior de la cámara.

Se tomaron muestras de agua (50 ml) al inicio de la incubación, y luego de 3 horas de iniciada la misma, tanto en las cámaras de la marisma como de la planicie de marea. Las muestras fueron filtradas *in situ* a través de filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm de poro (GF/F Whatman, previamente mufleados a 550 °C durante 12 h), y conservadas a -20°C en frascos oscuros de vidrio. Todo el material usado para el muestreo y análisis de MOD fue lavado con ácido clorhídrico al 10 %, enjuagado con agua bidestilada y secado en estufa a 60 °C; el material de vidrio fue además mufleado a 550 °C (Burdige & Homstead 1994). En estas muestras se midió salinidad, concentración de proteínas, carbohidratos, y carbono inorgánico total disuelto (TCO₂). La salinidad fue medida usando refractómetro de mano. La concentración de carbohidratos fue medida colorimétricamente siguiendo a Dubois *et al.* (1956), usando glucosa como referencia. La concentración de proteínas disueltas fue determinada usando el método del azul de Coomassie, y expresada como equivalentes de albúmina siguiendo a Mayer *et al.* (1986). Las concentraciones de carbono inorgánico total (TCO₂) fueron medidas transfiriendo 2 ml de muestra a frascos herméticos previamente evacuados, y midiendo la concentración de CO₂ en la fase gaseosa de cada frasco por cromatografía gaseosa (Tracor 560 equipado con detector de conductividad térmica, columna Porapak Q a 35°C y He ultra puro como gas portador) luego de acidificar la muestra con 100 μL de ácido fosfórico 1N. La tasa de flujo de cada soluto para cada cámara fue calculada como la diferencia entre la concentración entre la muestra inicial y final, y relacionando esto con el volumen de cada cámara, y el tiempo de incubación. La hipótesis nula de no efecto de los cangrejos y de la exposición a la luz en los flujos bentónicos de cada sustancia medida fue evaluada con ANOVA de dos vías, independientemente para cada sustancia y sitio (*i.e.*, marisma o planicie de marea; Zar 1999). En el caso de encontrar

diferencias entre los factores, se realizaron *a posteriori* test LSD de múltiples comparaciones (Underwood 1997).

Características de la materia orgánica del sedimento. Con el fin de evaluar el efecto de los cangrejos en las características y contenido de la materia orgánica del sedimento de planicies de marea y marisma, se extrajo de cada unidad experimental (sólo tratamientos B+C y NBC; n = 6 cada tratamiento) sedimento correspondiente a montículos frescos (*i.e.*, sedimento depositado por los cangrejos en la superficie; ver Introducción General), pared de cuevas, sedimento superficial (0 a 0.5 cm) y sedimento profundo (10 a 11 cm) para los tratamientos B+C; y sedimento superficial (0 a 0.5 cm) y profundo (10 a 11 cm) para los tratamientos NBC. Las muestras de sedimento fueron tomadas de las cajas experimentales empleadas para la medición de los flujos a través de la interfase agua-sedimento (ver sección anterior), después de al menos 2 meses de realizada la misma. Estas muestras fueron pesadas y homogeneizadas en el laboratorio, donde se midió contenido de agua, contenido total de materia orgánica (TOC), carbohidratos totales, proteínas totales y lípidos. El contenido de agua (%) fue calculado como la diferencia entre el peso seco (72 hs a 60 °C) y húmedo; el contenido total de materia orgánica fue estimado como la pérdida de peso luego de la ignición de las muestras durante 8 hs a 550 °C. El contenido total de carbohidratos totales de carbohidratos fue determinado siguiendo a Gerchakov & Hatcher (1972), usando glucosa como estándar. El contenido de proteínas fue determinado tratando el sedimento con 0.5 N NaOH durante 4 hs, y determinando colorimétricamente la concentración de proteínas en el extracto usando la reacción del azul de Coomassie (Mayer *et al.* 1986), empleando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. El contenido de lípidos se determinó mediante extracciones con metanol y cloroformo

como describen Rontani & Volkman (2005), pesando el residuo seco luego de la completa evaporación del solvente. Los contenidos totales de carbohidratos, proteínas y lípidos fueron convertidos a equivalentes de carbono usando los factores de conversión de 0.45, 0.49, y 0.75, respectivamente (Fabiano *et al.* 1995). La suma del carbono en carbohidratos, proteínas y lípidos fue reportado como la fracción de carbono biopolimérica, y asumida como la fracción del carbono total potencialmente biodisponible para los consumidores (Fabiano & Danovaro 1994; Fabiano *et al.* 1995, Danovaro 1996). Para todos estos análisis, se empleó como blanco de reacción a sedimento correspondiente a cada muestra tratado en mufla a 550 °C durante 8hs. La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y las cuevas en la composición de la materia orgánica del sedimento fue evaluada con ANOVA de una vía, independientemente para cada sitio (*i.e.*, marisma o planicie de marea; Zar 1999).

Biodisponibilidad de la materia orgánica del sedimento. Con el fin de evaluar el efecto de los cangrejos en la biodisponibilidad potencial de la materia orgánica para los consumidores, se realizaron incubaciones de laboratorio en muestras de sedimento similares a las explicadas arriba. El carbono potencialmente lábil, de reactividad intermedia, y refractario (de aquí en adelante “C reactivo”, “C intermedio”, y “C refractario”, respectivamente) se determinó por medio de incubaciones aeróbicas de largo plazo (8 meses). El sedimento fue colocado en botellas de vidrio (10 mL) previamente lavadas con ácido (10% HCl), iniciando la incubación por medio del inoculado de las botellas con un 1% (vol:vol) de inóculo con un ensamble natural de microorganismos (*i.e.*, 1:1 vol:vol sedimento superficial sin tratar: agua de mar artificial estéril) con el fin de los microorganismos presentes fueran los mismos en todos los tipos de sedimentos. Las muestras fueron incubadas en la oscuridad a temperatura ambiente

(20 °C) y monitoreadas en cuanto a producción de CO₂ durante un período de 250 días. En cada ocasión de muestreo, la atmósfera de cada botella fue removida por ventilación con aire humidificado, y tapada nuevamente. Al inicio y luego de aproximadamente 5 hs, se muestreó y determinó la concentración de CO₂ en la atmósfera de cada botella. La concentración de CO₂ fue determinada por cromatografía gaseosa (ver arriba). Las fracciones de carbono lábil, intermedio y refractario fueron estimadas siguiendo a Robertson *et al.* (1999). El término C reactivo se refiere a la porción de C de la materia orgánica que es utilizado por los microorganismos dentro de un periodo de 12 días de incubación, bajo las condiciones experimentales. La hipótesis nula de no-efecto de los cangrejos y las cuevas en la biodisponibilidad de la materia orgánica del sedimento fue evaluada con ANOVA de una vía, independientemente para cada sitio (*i.e.*, marisma o planicie de marea; Zar 1999).

RESULTADOS

Flujos a través de la interfase agua-sedimento y metabolismo del sedimento. En sedimentos de planicie de marea, el flujo de dióxido de carbono entre el sedimento y la columna de agua fue diferente entre los distintos tratamientos (B+C, B y NBC) y también entre la condición de luz/oscuridad (ANOVA de 2 vías: Tratamiento: $F_{2, 30} = 23.18$, $p < 0.05$; luz-oscuridad: $F_{1, 30} = 4.4$, $p < 0.05$; Fig. IV.1A). Los análisis *a posteriori* indicaron que los tratamientos con cuevas ocupadas presentan flujos de CO₂ desde el sedimento hacia la columna de agua, mientras que los tratamientos restantes muestran consumo de CO₂ por parte del sedimento sin diferencias entre ellos (Fig. IV.1A). El flujo de hidratos de carbono (HCO) entre agua-sedimento mostró efecto de interacción entre ambos factores (ANOVA de 2 vías: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30}$

= 10.17, $p < 0.05$; Fig. IV.1B). Los tratamientos con cuevas ocupadas mostraron flujos desde el sedimento hacia la columna de agua para ambas condiciones de luz (*promedio*: $163 \mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que los tratamientos sin cuevas ni cangrejos mostraron consumo de hidratos de carbono por el sedimento, siendo este consumo mayor en condiciones de oscuridad ($-1489 \mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. IV.1B). Los tratamientos con cuevas no ocupadas presentaron valores intermedios, y diferencias entre luz-oscuridad (*luz*: $-709 \mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; *oscuridad*: $-258 \mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). El flujo de proteínas presentó interacción entre los tratamientos y la condición de luz-oscuridad (ANOVA de 2 vías: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 15.38$, $p < 0.05$; Fig. IV.1C). El sedimento sin cuevas ni cangrejos expuesto a la luz mostró el mayor consumo de proteínas (PRT) por el sedimento ($-2243 \mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que no se encontraron diferencias entre los demás tratamientos (*promedio*: $+102 \mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

En sedimentos de marisma, los flujos de CO_2 mostraron interacción entre tratamientos y condición de luz/oscuridad (ANOVA de 2 vías: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 38.28$, $p < 0.05$; Fig. IV.2A). El mayor flujo de CO_2 a la columna de agua se encontró en el tratamiento B+C expuesto a la luz (ver Fig. IV.2A; $+46757 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), seguido por este mismo tratamiento incubado en oscuridad ($+38106 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$). El tratamiento B mantenido en oscuridad mostró menores valores los B+C ($24914 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), pero mayores que los encontrados para los tratamientos restantes (Fig. IV.2A). El flujo de hidratos de carbono mostró efecto entre las condiciones de luz-oscuridad (ANOVA de 2 vías: luz-oscuridad: $F_{1, 30} = 4.86$, $p < 0.05$; Fig. IV.2B). El tratamiento B+C expuesto a la luz mostró flujos de hidratos de carbono desde el sedimento hacia la columna de agua ($+165 \mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. IV.2B),

siendo diferentes a los encontrados para los tratamientos B y B+C en oscuridad (+245 y +237 $\mu\text{mol glucosa m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). El flujo de proteínas mostró interacción entre la condición de luz-oscuridad y los tratamientos experimentales (ANOVA de 2 vías: Tratamiento x luz-oscuridad: $F_{2, 30} = 7.72$, $p < 0.05$; Fig. IV.2C). El tratamiento B+C expuesto a la luz mostró flujos de proteínas desde el sedimento hacia la columna de agua (+50 $\mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), mientras que los tratamientos restantes mostraron consumos de proteínas por el sedimento. Los mayores consumos fueron registrados para el tratamiento B en oscuridad (-157 $\mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$), y los menores consumos para el tratamiento B expuesto a la luz (-58 $\mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$; Fig. IV.2C), los tratamientos restantes presentaron valores intermedios de consumo de proteínas, sin diferencias entre sí (*promedio*: +108 $\mu\text{mol BSA m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Características de la materia orgánica del sedimento. En la planicie de marea, se encontraron diferencias en el contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos, y carbono orgánico total entre sedimentos bioturbados correspondientes a montículos generados por cangrejos, paredes de cuevas, sedimento superficial y sedimento profundo (B+C), y sedimento no-bioturbado (NBC) superficial y profundo (ANOVA; *carbohidratos*: $F_{5, 24} = 12.18$, $p < 0.05$, Fig. IV.3A; *proteínas*: $F_{5, 24} = 4.04$, $p < 0.05$, Fig. IV.3B; *lípidos*: $F_{5, 24} = 11.70$, $p < 0.05$; Fig. IV.3C; *carbono orgánico total*: $F_{5, 24} = 197.31$, $p < 0.05$, Fig. IV.3D). En la planicie de marea, el contenido más alto de carbono en carbohidratos totales fue encontrado en el sedimento superficial no bioturbado (3134 $\mu\text{g C-HCO g sedimento seco}^{-1}$), y los menores contenidos de carbohidratos totales fueron encontrados en sedimento de montículos (1069 $\mu\text{g C-HCO g sedimento seco}^{-1}$, ANOVA: $F_{5, 24} = 12.18$, $p < 0.05$; Fig. IV.3A). El resto de los tratamientos mostraron valores intermedios a estos, sin diferencias entre los mismos. El mayor contenido de

proteínas se encontró en el sedimento de montículos (19.54 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$), seguido por el sedimento de paredes de cuevas (12.04 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$). El menor contenido de proteínas se registró en el sedimento profundo del tratamiento B+C (6.8 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$), y el resto de los sedimentos mostraron valores intermedios sin diferencias entre ellos ($F_{5, 24} = 4.04$, $p < 0.05$; Fig. IV.3B). El contenido de lípidos (LIP) fue diferente entre los diferentes tipos de sedimento ($F_{5, 24} = 11.70$, $p < 0.05$; Fig. IV.3C). Los análisis *a posteriori* indican que la mayor concentración de lípidos corresponde a sedimento superficial no bioturbado (361.3 $\mu\text{g C-LIP g sedimento seco}^{-1}$), y los menores contenidos de lípidos fueron registrados en el sedimento de montículos y de pared de cuevas (228 y 221 $\mu\text{g C-LIP g sedimento seco}^{-1}$, respectivamente). De la misma forma, el contenido de carbono orgánico total fue diferente para los diferentes sedimentos ($F_{5, 24} = 197.31$, $p < 0.05$; Fig. IV.3D). Los menores contenidos de carbono se presentaron en los sedimentos de montículos, paredes de cuevas y sedimento profundo correspondiente al tratamiento bioturbado (10.53, 11.97 y 10.15 $\text{mg C g sedimento seco}^{-1}$, respectivamente), seguido por sedimento superficial de este mismo tratamiento (14.51 $\text{mg C g sedimento seco}^{-1}$), y luego por sedimento profundo no bioturbado (35.4 $\text{mg C g sedimento seco}^{-1}$). El contenido más alto de C fue encontrado en sedimento superficial no bioturbado (Fig. IV.3D).

En la marisma, la concentración de carbohidratos totales fue diferente entre los distintos tipos de sedimento analizados (ANOVA: $F_{5, 24} = 19.20$, $p < 0.05$; Fig. IV.3E). Análisis *a posteriori* indican que los mayores contenidos de carbohidratos totales fueron encontrados en sedimentos bioturbados correspondientes a montículos, paredes de cuevas, y sedimento superficial de los tratamientos bioturbados y no bioturbados

(*promedio*: 4198 $\mu\text{g C-HCO g sedimento seco}^{-1}$). El sedimento bioturbado profundo mostró valores más bajos (2708 $\mu\text{g C-HCO g sedimento seco}^{-1}$), pero mayores a los encontrados para sedimento profundo no bioturbado (1880 $\mu\text{g C-HCO g sedimento seco}^{-1}$; Fig. IV.3E). La concentración de proteínas fue diferente entre los distintos tipos de sedimento (ANOVA: $F_{5, 24} = 3.14$, $p < 0.05$; Fig. IV.3F), siendo más alta para sedimento bioturbado profundo (53.3 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$) que en el resto de los sedimentos. Los menores contenidos de proteínas se registraron en el sedimento profundo del tratamiento NBC (16.6 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$), y los otros tipos de sedimento mostraron valores intermedios entre estos valores (27.8 $\mu\text{g C-PRT g sedimento seco}^{-1}$; Fig. IV.3F). El contenido de lípidos fue diferente entre los diferentes tipos de sedimento ($F_{5, 24} = 5.37$, $p < 0.05$; Fig. IV.3G). Los análisis *a posteriori* indican que la mayor concentración de lípidos corresponde a sedimento superficial bioturbado (1625 $\mu\text{g C-LIP g sedimento seco}^{-1}$), seguido por sedimento superficial no bioturbado (1047 $\mu\text{g C-LIP g sedimento seco}^{-1}$); mientras que los montículos, paredes de cuevas, y sedimentos profundos bioturbados y no bioturbados mostraron los menores contenidos de lípidos (*promedio*: 628 $\mu\text{g C-LIP g sedimento seco}^{-1}$). El contenido de carbono orgánico total fue diferente para los diferentes sedimentos ($F_{5, 24} = 11.69$, $p < 0.05$; Fig. IV.3H). Los montículos presentaron los contenidos más altos de carbono orgánico (24.70 mg C g sedimento seco⁻¹), y el sedimento profundo no bioturbado presentó los valores más bajos (15.86 mg C g sedimento seco⁻¹). El resto de los sedimentos mostraron valores intermedios sin diferencias entre ellos (*promedio*: 19.58 mg C g sedimento seco⁻¹).

El contenido de carbono orgánico lábil (COL; *sensu* Fabiano & Danovaro 1994) fue diferente para los diferentes tipos de sedimentos (ANOVA: $F_{5, 24} = 24.92$, $p < 0.05$;

Fig. IV.4A). En la planicie de marea, el sedimento superficial no bioturbado presentó la mayor concentración de COL (16.44 mg C g sedimento seco⁻¹), los sedimentos de paredes de cuevas, superficial y profundo del tratamiento B+C presentaron concentraciones intermedias (*promedio*: 3.47 mg C g sedimento seco⁻¹), mientras que los sedimentos correspondientes a montículos y sedimento profundo no bioturbado mostraron las menores concentraciones de carbono orgánico lábil (1.32 y 2.96 mg C g sedimento seco⁻¹, respectivamente). En la marisma, también se observaron diferencias entre el contenido de carbono lábil y el tipo de sedimento (ANOVA: $F_{5, 24} = 20.44$, $p < 0.05$; Fig. IV.4B). Los mayores contenidos de carbono lábil ocurrieron en sedimentos superficiales tanto del tratamiento B+C (5.78 mg C g sedimento seco⁻¹) como del NBC (5.69 mg C g sedimento seco⁻¹), las paredes de cuevas y montículos mostraron valores más bajos. Los menores contenidos de carbono lábil se encontraron en el sedimento profundo del tratamiento NBC (3.38 mg C g sedimento seco⁻¹). Por otra parte, la fracción del carbono total que es carbono orgánico lábil (*i.e.*, % COL) también fue diferente entre los distintos tipos de sedimento, tanto para la planicie de marea como para la marisma (*planicie de marea*: $F_{5, 24} = 8.49$, $p < 0.05$; *marisma*: $F_{5, 24} = 16.02$, $p < 0.05$; Figs. IV.4C y IV.4D). El mayor porcentaje de COL en la planicie de marea se observó en el sedimento no bioturbado superficial (46.5 % del COT), para los sedimentos correspondientes a cangrejal profundo, superficial y pared de cueva se observó una contribución más baja del COL al carbono orgánico total (*promedio*: 29.0 % del COT), pero mayor a la encontrada para el sedimento profundo no bioturbado y sedimento de montículos (*promedio*: 12.8 % del COT). En la marisma, los mayores porcentajes de COL fueron encontrados en sedimento superficial tanto bioturbado (28.4 % del COT) como no bioturbado (30.3 % del COT), mientras que los menores

porcentajes de carbono lábil se presentaron en el sedimento no bioturbado profundo (15.6 %). Los contenidos relativos de carbono lábil en los demás tipos de sedimento fueron intermedios entre los anteriormente mencionados (*promedio*: 20.1 %; Fig. IV.4D).

La contribución del carbono en forma de carbohidratos (*i.e.*, C-CHO) a la fracción de COL fue diferente para los distintos tipos de sedimento tanto en la planicie de marea (ANOVA: $F_{5, 24} = 2.64$, $p < 0.05$; Tabla IV.1), como en la marisma (ANOVA: $F_{5, 24} = 3.27$, $p < 0.05$; Tabla IV.1). En la planicie de marea, la menor contribución de los carbohidratos al COL correspondió al sedimento de los montículos construidos por cangrejos, seguido por el sedimento profundo de ambos tratamientos, y luego por el sedimento de las paredes de cuevas y sedimento superficial (ver Tabla IV.1). En la marisma la mayor contribución de los hidratos de carbono a la fracción de C lábil correspondió al sedimento de montículos, seguido por sedimento de paredes de cuevas, superficial del tratamiento NBC y profundo del tratamiento B+C. Los menores porcentajes de C-HCO correspondieron a sedimento profundo NBC, y al sedimento superficial del tratamiento B+C. La mayor proporción de proteínas en el COL en la planicie de marea correspondió al sedimento de montículos (ANOVA: $F_{5, 24} = 7.53$, $p < 0.05$; Tabla IV.1); y en la marisma, al sedimento profundo del tratamiento B+C (ANOVA: $F_{5, 24} = 5.50$, $p < 0.05$; Tabla IV.1). La contribución de los lípidos a la fracción de COL en la planicie de marea fue mayor para sedimentos de montículos y sedimento profundo de ambos tratamientos, seguido por sedimento superficial de B+C y de paredes de cuevas, los menores aportes de lípidos correspondieron al sedimento superficial de NBC (ANOVA: $F_{5, 24} = 5.44$, $p < 0.05$; Tabla IV.1). En la marisma, los mayores porcentajes de lípidos se registraron en sedimento superficial del tratamiento

B+C y en sedimento profundo NBC, seguido por sedimento de paredes de cuevas, profundo B+C y superficial NBC, mientras que los montículos presentaron la menor contribución de lípidos al COL (ANOVA: $F_{5,24} = 3.40$, $p < 0.05$; Tabla IV.1).

Biodisponibilidad de la materia orgánica del sedimento. Los ensayos de biodisponibilidad de la materia orgánica del sedimento presentaron diferencias en los contenidos de materia orgánica altamente reactiva, de reactividad intermedia, y refractaria para los diferentes tipos de sedimento en los tratamientos experimentales de la marisma y de la planicie de marea. El contenido de carbono reactivo en el sedimento de la planicie de marea fue diferente para los distintos tipos de sedimentos (ANOVA: $F_{5,24} = 9.38$, $p < 0.05$; Fig. IV.5A). El sedimento de montículos presentó los menores contenidos de C reactivo ($1058 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), seguido por el sedimento de las paredes de las cuevas ($2096 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$) y los sedimentos profundos tanto del tratamiento B+C ($1425 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$) y NBC ($1766 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$). El sedimento superficial del tratamiento bioturbado ($3497 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$) mostró un alto contenido de C lábil, pero los máximos fueron encontrados en el sedimento superficial no bioturbado ($7432 \mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$). El contenido de carbono de reactividad intermedia fue mayor para el sedimento superficial correspondiente al tratamiento NBC que para los tratamientos restantes (ANOVA: $F_{5,24} = 5.20$, $p < 0.05$; Fig. IV.5A). El contenido de carbono refractario en la planicie de marea fue mayor para ambos tipos de sedimento del tratamiento NBC, que para los sedimentos correspondientes al tratamiento bioturbado (ANOVA: $F_{5,24} = 15.82$, $p < 0.05$; Fig. IV.5A). En la marisma, el contenido de C reactivo fue diferente entre los distintos tipos de sedimento (ANOVA: $F_{5,24} = 5.17$, $p < 0.05$; Fig. IV.5B). El menor contenido de C reactivo fue encontrado en los sedimentos profundos de ambos

tratamientos experimentales (921 y 908 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), mientras que los sedimentos de pared de cueva (2270 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$) y montículo (3200 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$) se encontraron valores mayores a los anteriores, pero menores a los correspondientes al sedimento superficial del tratamiento no bioturbado NBC (4716 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$). Los mayores contenidos de C reactivo se encontraron en el sedimento superficial bioturbado (5450 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$). En sedimentos de marisma, el contenido de C intermedio fue mayor para ambos sedimentos del tratamiento NBC que para los sedimentos restantes. El menor contenido de C intermedio fue encontrado en el sedimento profundo del tratamiento B+C (K-W test: $H_{5,30} = 11.18$, $p < 0.05$; Fig. IV.5B). El contenido de C refractario fue mayor para todos los tipos de sedimento del tratamiento B+C que para los del NBC (ANOVA: $F_{5,24} = 5.04$, $p < 0.05$; Fig. IV.5B). El menor contenido de carbono refractario se encontró en el sedimento superficial no-bioturbado (6149 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), mayores contenidos fueron encontrados para sedimento de montículos (15106 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), bioturbado profundo (14268 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), pared de cueva (11267 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$), y superficial bioturbado (9718 $\mu\text{g C g sedimento seco}^{-1}$).

En la planicie de marea, la proporción de C reactivo respecto del C total fue diferente para cada tratamiento (ANOVA: $F_{5,24} = 3.36$, $p < 0.05$), mientras que no se encontraron diferencias en los porcentajes de C de reactividad intermedia y C refractario para estos ambientes. Los análisis *a posteriori* indican que el mayor porcentaje de C lábil se encuentra en el sedimento superficial correspondiente al tratamiento B+C (23.5%), seguido por el sedimento superficial del tratamiento NBC (22.0%), el sedimento de paredes de cuevas (18.3%) y profundo del tratamiento B+C (14.8%). Los menores porcentajes de C reactivo se registraron en el sedimento de montículos (10.2%)

y en el sedimento profundo del tratamiento NBC (8.7%). En la marisma, la proporción de C reactivo respecto del carbono total también fue diferente para cada tipo de sedimento de ambos tratamientos experimentales (ANOVA: $F_{5, 24} = 15.8$, $p < 0.05$). Las mayores proporciones de C reactivo fueron encontradas para los sedimentos de paredes de cuevas y superficie del tratamiento B+C, y para sedimento de superficie del tratamiento NBC (16.6, 28.1 y 26.3 % respectivamente). El sedimento de montículos presentó valores menores a éstos (9.6%) pero mayores a los registrados para el sedimento profundo de los tratamientos B+C y NBC (5.2 y 6.0 % respectivamente). El porcentaje de C de reactividad intermedia y el porcentaje de C refractario no mostraron diferencias entre los distintos sedimentos.

DISCUSIÓN

Los resultados de este Capítulo muestran un importante efecto de la actividad del cangrejo cavador *Neohelice granulata* en el metabolismo bentónico neto, en los flujos bentónicos de materia orgánica disuelta, como así también en la calidad de la materia orgánica del sedimento de planicies de mareas y marismas. Para ambos ambientes (*i.e.*, planicie de marea y marismas), la presencia de las cuevas de los cangrejos y su actividad de bioturbación incrementan el metabolismo bentónico del sedimento expuesto a luz y en oscuridad. Además, en sedimentos no vegetados, la presencia de cuevas y la actividad bioturbadora estimulan el flujo de hidratos de carbono y proteínas desde el sedimento hacia la columna de agua sin importar si el sedimento está o no expuesto a la luz. En cambio, en la marisma, los cangrejos estimulan el flujo de hidratos de carbono y de proteínas desde el sedimento hacia la columna de agua sólo en condiciones de luz. En la oscuridad, los cangrejos no tienen efecto en los flujos

bentónicos de hidratos de carbono y proteínas. Además, el C biodisponible represento entre el 12 y 45 % del carbono total en la planicie de marea y entre el 15 y 30 % en la marisma. Para ambos ambientes, las mayores proporciones de C biodisponible correspondieron a sedimento superficial no-bioturbado; mientras que las menores correspondieron al sedimento profundo no-bioturbado. Por otra parte, los carbohidratos representan la fracción dominante del carbono orgánico lábil en todos los sedimentos analizados (*planicie de marea*: entre 71 y 95.1 %; *marisma*: entre 72.4 y 86.4 %), seguido por lípidos (*planicie de marea*: entre 4.8 y 27.0 %; *marisma*: entre 12.9 y 27.1 %) y proteínas (*planicie de marea*: entre 0.06 y 2.0 %; *marisma*: entre 0.5 y 1.6 %). La contribución de los carbohidratos a la fracción de carbono lábil es menor en el sedimento de montículos, seguido por el sedimento profundo de ambos tratamientos en la planicie de marea, mientras que en la marisma el menor aporte de carbohidratos a la fracción de C lábil se presenta en sedimento superficial bioturbado. La importancia relativa de las proteínas fue mayor para el sedimento de montículos en la planicie de marea y para sedimento profundo bioturbado en la marisma.

La materia orgánica de sedimentos y aguas naturales es una mezcla heterogénea compuesta por remanentes de plantas y animales frescos y reactivos y también por compuestos poliméricos poco reactivos. Los microorganismos tienden a consumir en primer término la fracción de materia orgánica lábil, por lo cual los componentes menos reactivos tienden a acumularse (Burdige 2006). De esta forma, la cantidad y calidad de la materia orgánica en sedimentos superficiales es considerada como uno de los principales factores que afectan la dinámica y metabolismo de la fauna bentónica (Graf *et al.* 1983, Grant & Hargrave 1987). En la mayoría de los sistemas intermareales, sólo una pequeña fracción de los detritos presentes está directamente disponible para los

consumidores bentónicos (Fabiano *et al.* 1995, Pusceddu *et al.* 1999). En este sentido, muchos trabajos sugieren que sólo entre el 5 y 15% de los detritos del sedimento están disponibles como alimento para los consumidores bentónicos en un momento determinado (Yingst 1976, Fabiano *et al.* 1995, Pusceddu *et al.* 1999). El contenido de C lábil, obtenido a partir del análisis de la composición química de la materia orgánica, constituye entre el 15.6 y el 30.0 % del C total en los sedimentos de marismas, y entre el 12.1 y el 46.5 % para sedimentos de planicies de marea estudiados en este Capítulo (ver Figs. IV.4B y IV.4D). A partir de los ensayos de degradabilidad se obtienen valores algo menores a los anteriores, ya que el C reactivo constituye entre el 5.2 y el 28.1 % del C total en marismas y entre el 8.7 y el 23.5 % en planicies de marea. Estos valores de C reactivo son altos comparados con los contenidos de C reactivos encontrados en la bibliografía (pero ver Papaspyrou *et al.* 2005). Por otra parte, a diferencia de lo encontrado en la bibliografía (*e.g.*, Aller & Aller 1986, Papaspyrou *et al.* 2005), los mayores porcentajes de carbono lábil no fueron encontrados en los distintos tipos de sedimento bioturbado (*e.g.*, sedimento de paredes de cuevas o montículos), sino que se registraron en el sedimento superficial no bioturbado. Sin embargo, muchos trabajos muestran que la bioturbación mezcla la columna de sedimento (Bertness 1985, Kristensen 1988, Berg *et al.* 2001, Paalberg *et al.* 2005, Capítulo I), y esta mezcla puede transportar la materia orgánica refractaria enterrada en el sedimento a la superficie del mismo (Andersen & Kristensen 1988, Kristensen *et al.* 1992, Burdige 2006). Los resultados presentados en esta Tesis, muestran que *N. granulata* mezcla continuamente el sedimento (ver Capítulo I), y así lo homogeneizan en cuanto a su contenido de carbono total (este Capítulo) y C reactivo o lábil (ver Figs. IV.4 y IV.5). Debido a esto, y que a diferencia de otros bioturbadores *N. granulata* no secreta mucus en las paredes

de sus cuevas (ver Kristensen 1985, Kristensen *et al.* 2005, Paspapyrou *et al.* 2005), los distintos tipos de sedimentos bioturbados presentan porcentajes de carbono biodisponible intermedios entre los hallados para sedimento no bioturbado superficial y profundo tanto en marismas como en planicies de marea.

Teniendo en cuenta la densidad de las cuevas de *N. granulata* (*marisma*: 30 cuevas m⁻² y *planicie de marea*: 30 cuevas m⁻²), el tamaño de las mismas (*marisma*: 4 cm de diámetro y 1 m de profundidad; *planicie de marea*: 3.6 cm de diámetro y 40 cm de profundidad; ver Iribarne *et al.* 1997, Botto & Iribarne 2000), y el área cubierta por los montículos (asumiendo un montículo por cueva; área de montículos correspondientes a cuevas de los tamaños mencionados, *marisma*: 49 cm² montículo⁻¹; *planicie de marea*: 28 cm² montículo⁻¹; observación personal), puede estimarse el contenido de C biodisponible por m² de sedimento para áreas bioturbadas y no bioturbadas de marismas y planicies de marea. Esta estimación permite ver que no hay diferencias en el contenido de C total entre sedimentos bioturbados y no bioturbados. Sin embargo, la fracción de este C que se encuentra biodisponible es mayor para el sedimento bioturbado en marismas (19.2 % del C total) y planicies de marea (31.1 % del C total) que para el sedimento no bioturbado (*marisma*: 16.4 % y *planicie de marea*: 16.1 % del C total). Todos estos valores son más altos que los encontrados en la mayoría de los sedimentos estuarinos eutróficos (3 % del C orgánico, Fabiano & Danovaro 1994), y se encuentran entre los reportados para sedimentos estuarinos y marinos oligotróficos (20% del C orgánico, Fichez 1991; 23.1% de la materia orgánica, Danovaro *et al.* 1993). En este sentido, Fabiano *et al.* (1995) sugieren que cuando un sistema oligotrófico cambia a una condición eutrófica, la calidad de la materia orgánica del sistema es menor, es decir, la fracción de C lábil disminuye. De esta forma, la

bioturbación por *N. granulata* incrementa la calidad nutricional de la materia orgánica presente en sedimentos de marismas y planicies de marea, contribuyendo al mantenimiento de estados oligotróficos para estos sistemas (Pusceddu *et al.* 2003). Esto concuerda con el rol de *N. granulata* aumentando la oxigenación del sedimento (Daleo *et al.* 2007, Capítulo I), incrementando la tasa de exportación de nutrientes disueltos (Capítulos II y III), y la estimulación de las tasas de desnitrificación (Capítulos I y III).

El contenido de nitrógeno orgánico (*i.e.*, proteínas) es considerado como el principal factor limitante para los organismos que se alimentan de sedimentos (Pusceddu *et al.* 1999). Uno de los parámetros empleados para estimar el estado de degradación de la materia orgánica lábil es la relación entre proteínas y carbohidratos totales (PRT:CHO). Esta proporción fluctúa entre valores por debajo de 0.1 para sedimentos oligotróficos (*e.g.*, sedimentos a 500-2400 m de profundidad en el Mar Mediterráneo, Danovaro *et al.* 1993), hasta valores mayores a 10 para sedimentos altamente eutróficos (Pusceddu 1997). La baja proporción entre proteínas y carbohidratos para todos los sedimentos analizados en este Capítulo (entre 0.035 y 0.0007) sugiere la presencia de materia orgánica con alto grado de degradación (*i.e.*, materia orgánica “aged”, Danovaro *et al.* 1993), y un claro rol de las proteínas como factor limitante para los consumidores (Fabiano *et al.* 1995). Sin embargo, si se analizan estos valores para cada tipo de sedimento en la planicie de marea, puede verse que la mayor proporción PRT:HCO se encuentra en el sedimento de montículos de cangrejos, y la menor en el sedimento superficial no bioturbado. Así, aunque el sedimento superficial no-bioturbado presente los mayores contenidos de carbono orgánico total, este carbono presenta una calidad nutricional relativamente baja en términos de aporte de N (Pusceddu *et al.* 1999). De la misma forma, en la marisma la mayor proporción

PRT:HCO se presenta en el sedimento bioturbado profundo, y aunque este tipo de sedimento no representa las mayores cantidades de MO, ésta puede ser importante en términos nutricionales. Así, aunque la actividad de *N. granulata* genera la homogenización de la columna de sedimento en cuanto a su proporción de C biodisponible; mediante la construcción y mantenimiento de sus cuevas también generan montículos, que aunque contienen bajas cantidades de materia orgánica y bajos porcentajes de C biodisponible (este Capítulo, Gutiérrez *et al.* 2006), presentan gran valor nutricional por su relativamente alto contenido de N orgánico (relación PRT:HCO un orden de magnitud mayor en montículos que en los otros sedimentos).

La mayor parte de la materia orgánica sedimentaria en los intermareales del ASO proviene de la marisma, y está constituida por detritos de hojas y tallos de *Spartina* spp. en diferentes estados de descomposición (Botto *et al.* 2006). Además, varios estudios han mostrado que la secreción de sustancias solubles de las raíces de *Spartina* spp. puede ser una fuente importante de C lábil para el sedimento (Hines *et al.* 1989), teniendo un gran impacto en los procesos diagenéticos del sedimento cercano a las raíces (Sundby *et al.* 2003, Holmer *et al.* 2002, Capítulo III). Así, por medio de los efectos ya mencionados en las reacciones diagenéticas, la interacción entre la macrofauna, las macrófitas, y las actividades microbianas podría tener un importante efecto en la preservación de materia orgánica en sedimentos marinos y costeros (*e.g.*, Burdige 2006, Woulds *et al.* 2007). Las altas tasas de metabolismo sedimentario neto (*i.e.*, producción de CO₂) en sedimentos de marismas, comparadas con las correspondientes a la planicie de marea, evidencian el impacto de la vegetación en la actividad microbiana tanto para sedimentos bioturbados o no por *N. granulata*. Por otra parte, la bioturbación estimula el metabolismo bentónico entre un 850% y un 8000% en

la marisma, y sólo un 200 % en la planicie de marea. Este mayor efecto en la marisma, puede deberse a que *N. granulata* estimula la producción primaria de *Spartina* spp. (Daleo *et al.* 2007); y se sabe que la actividad fotosintética está directamente relacionada con la secreción de C lábil por las raíces (Hines *et al.* 1989). El efecto de la bioturbación en el metabolismo bentónico es mucho más alto que los registrados para la otros bioturbadores comunes como cangrejos violinistas (*Uca* spp.: entre 200 y 300 %, Nielsen *et al.* 2003), o poliquetos (*Nereis virens*: 43 %, Kristensen 1985; *Arenicola marina*: hasta un 270%, Banta *et al.* 1999). Es importante destacar que este incremento en la producción de CO₂ en los sedimentos bioturbados activamente (*i.e.*, tratamientos B+C), es una combinación de la contribución metabólica directa de *N. granulata*, y de la estimulación indirecta de la actividad microbiana (Hansen & Kristensen 1998).

La estimulación del metabolismo microbiano aeróbico y anaeróbico generada por *Neohelice granulata* (Capítulo I), tiene como resultado directo un aumento en el consumo de O₂ (Capítulo III) y en la producción de CO₂ (este Capítulo), pero también incrementa la biodisponibilidad de la materia orgánica sedimentaria (este Capítulo). Esto, sumado a la mezcla constante de la columna de sedimento que producen durante la construcción y mantenimiento de sus cuevas (Iribarne *et al.* 1997, Capítulo I), y al aumento del área de intercambio que éstas producen, genera que la actividad de bioturbación de *N. granulata* también afecte los flujos de C orgánico lábil desde el sedimento hacia la columna de agua (ver resultados). Los resultados de este Capítulo muestran que en la planicie de marea, *N. granulata* invierte la dirección de flujos de carbohidratos disueltos, que son consumidos por el sedimento no-bioturbado, pero exportados a la columna de agua cuando *N. granulata* está presente, para ambas condiciones de luz, algo similar a lo que ocurre con las proteínas. Sin embargo, en la

marisma, los cangrejos sólo estimulan el flujo de carbohidratos y proteínas hacia la columna de agua cuando el sedimento está expuesto a la luz. Esto se debe a que la estimulación de la producción de exudados de C orgánico lábil por las raíces de *Spartina* ocurre sólo en condiciones de luz, por lo que estos compuestos estarían más disponibles para ser exportados durante períodos de luz. Todos los efectos en el metabolismo del sedimento y en la disponibilidad de la materia orgánica, tienen como consecuencia una reducción en la capacidad de almacenaje de materia orgánica de los sistemas intermareales costeros (ver Burdige 2006). Varios trabajos sugieren que las cuevas de *N. granulata* actúan como trampas pasivas de materia orgánica, incrementando (y no reduciendo como se muestra en este Capítulo) la capacidad de almacenaje del sistema, y disminuyendo así la tasa de exportación de material orgánico (Botto *et al.* 2006, Escapa *et al.* 2008). Sin embargo, a pesar de la aparente contradicción, los resultados del presente Capítulo junto con los resultados de los trabajos previos (Botto *et al.* 2006, Escapa *et al.* 2008), indicarían que las cuevas de cangrejos entrapan material orgánico (*i.e.*, detritos y sedimento con alto contenido de materia orgánica), que es degradado y remineralizado eficientemente en el sedimento bioturbado, y finalmente exportado del sistema como CO₂ o como materia orgánica disuelta. Si se tiene en cuenta que una de las fuentes más importantes de nutrientes para las aguas estuarinas y costeras proviene de la materia orgánica estuarial, y que sólo una pequeña fracción de la misma es exportada en forma de macrodetritos (Nixon 1980), este incremento en el flujo de materia orgánica disuelta a la columna de agua puede constituir un importante aporte para el sustento de las tramas tróficas de estos ambientes.

Tabla IV.1. Porcentajes de carbono lábil como carbono en hidratos de carbono (C-HCO), carbono en proteínas (C-PRT), y carbono en lípidos (C-LIP) para los tratamientos experimentales en la planicie de marea y en la marisma (valores promedios; desviación estándar entre paréntesis). Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

	C-HCO (%)	C-PRT (%)	C-LIP (%)
<i>Planicie de marea</i>			
B+C			
montículo	71,0 (26,2) ^b	2,0 (1,4) ^a	27,0 (25,7) ^a
pared	93,5 (0,9) ^a	0,3 (0,3) ^b	6,1 (0,7) ^{b, c}
superficie	88,0 (7,3) ^a	0,2 (0,1) ^b	11,4 (7,2) ^{a, b}
profundo	84,9 (7,3) ^{a, b}	0,2 (0,09) ^b	15,0 (2,7) ^a
NBC			
superficie	95,1 (2,7) ^a	0,06 (0,04) ^b	4,8 (2,7) ^c
profundo	79,1 (11,8) ^{a, b}	0,3 (0,3) ^b	20,6 (11,6) ^a
<i>Marisma</i>			
B+C			
montículo	86,4 (1,7) ^a	0,7 (0,2) ^a	12,9 (1,7) ^c
pared	83,4 (5,3) ^{a, b}	0,7 (0,3) ^a	15,9 (5,4) ^{b, c}
superficie	72,4 (12,2) ^c	0,5 (0,3) ^a	27,1 (12,2) ^a
profundo	79,9 (2,9) ^{a, b}	1,6 (0,9) ^b	18,4 (3,0) ^{b, c}
NBC			
superficie	81,3 (5,3) ^{a, b}	0,2 (0,04) ^a	18,4 (5,0) ^{b, c}
profundo	76,1 (4,4) ^{b, c}	0,6 (0,2) ^a	23,3 (4,5) ^{a, b}

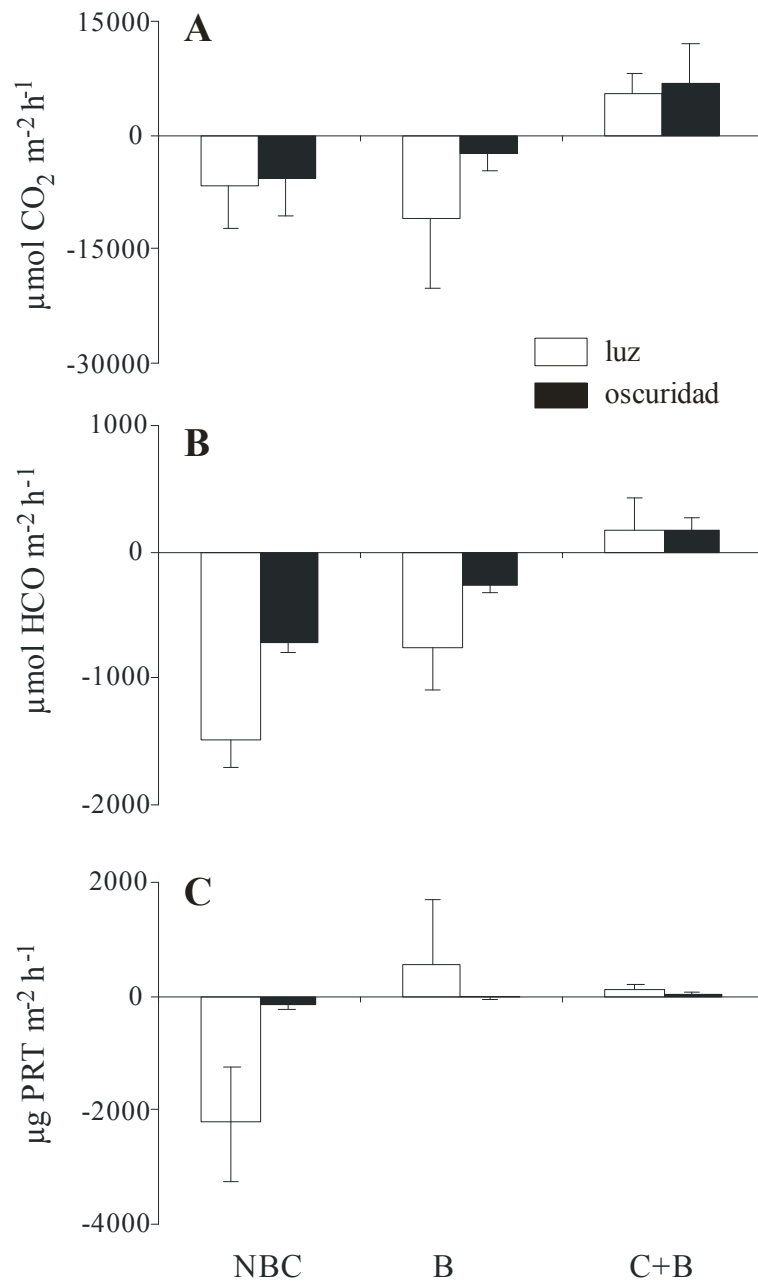


Fig. IV.1. Flujos bentónicos de dióxido de carbono (A), carbohidratos disueltos (B), proteínas disueltas (C), y carbono orgánico disuelto (D) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC en sedimentos de planicies de marea incubados en condiciones de luz y oscuridad. Valores negativos indican flujos desde la columna de agua hacia el sedimento. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

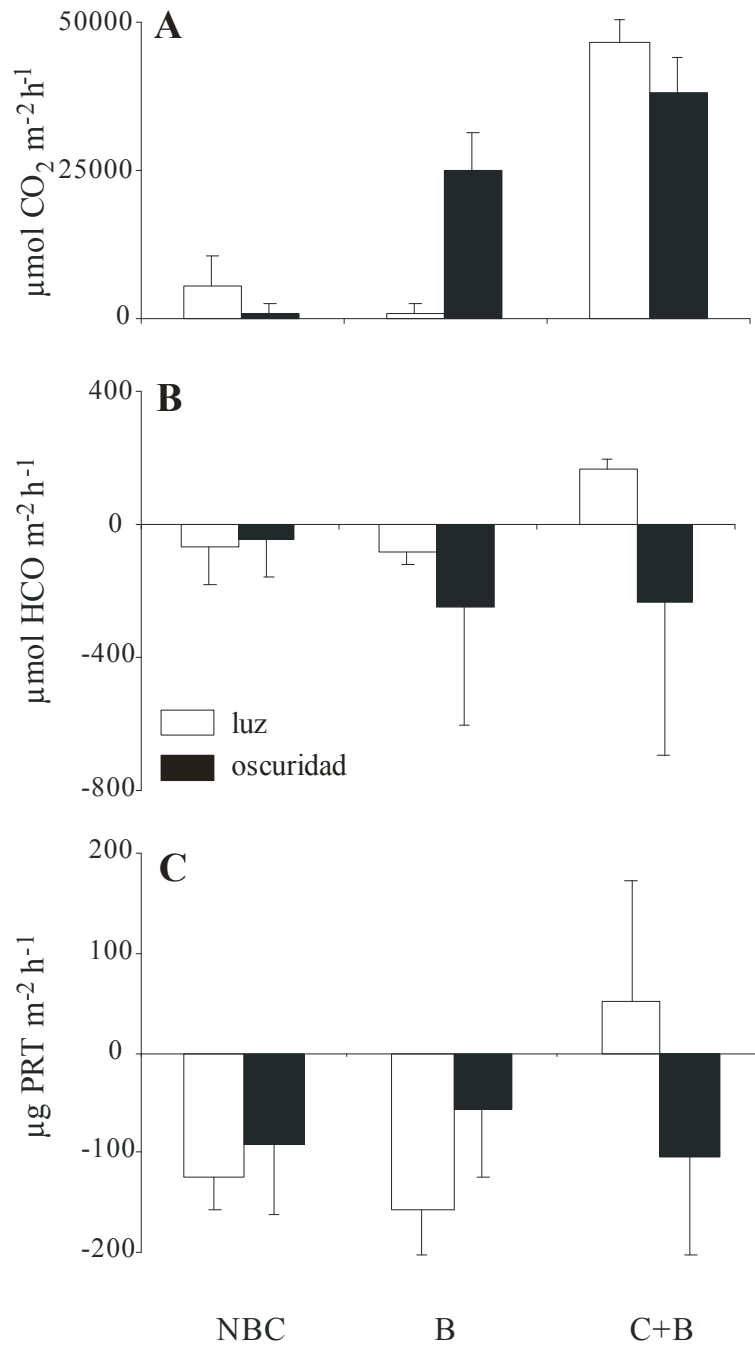


Fig. IV.2. Flujos bentónicos de dióxido de carbono (A), carbohidratos disueltos (B), proteínas disueltas (C), y carbono orgánico disuelto (D) para los tratamientos experimentales B+C, B y NBC en sedimentos de marismas incubados en condiciones de luz y oscuridad. Valores negativos indican flujos desde la columna de agua hacia el sedimento. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

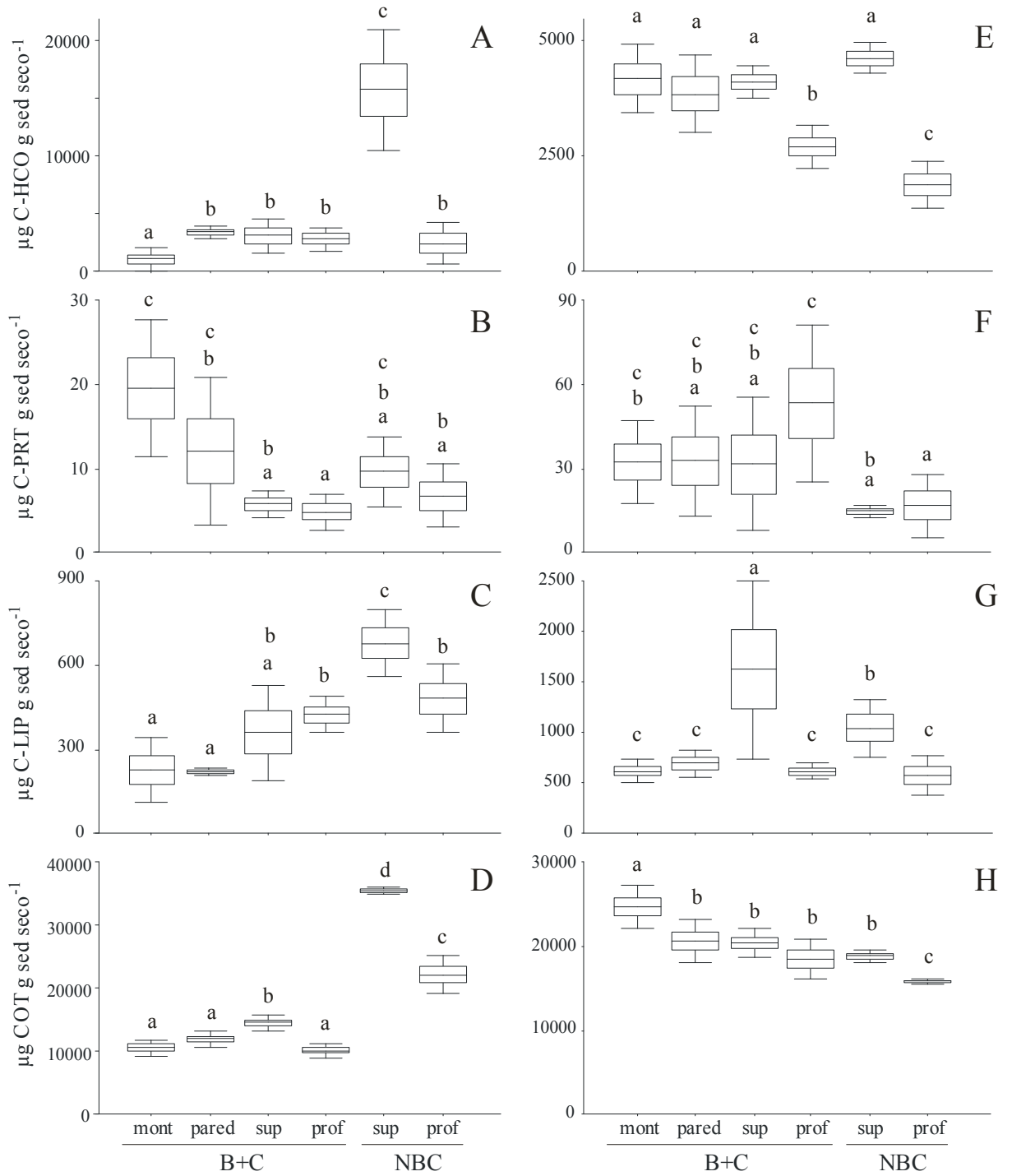


Fig. IV.3. Calidad de la materia orgánica del sedimento según los ensayos de biodisponibilidad para las distintas categorías de sedimentos de planicie de marea y de marisma. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

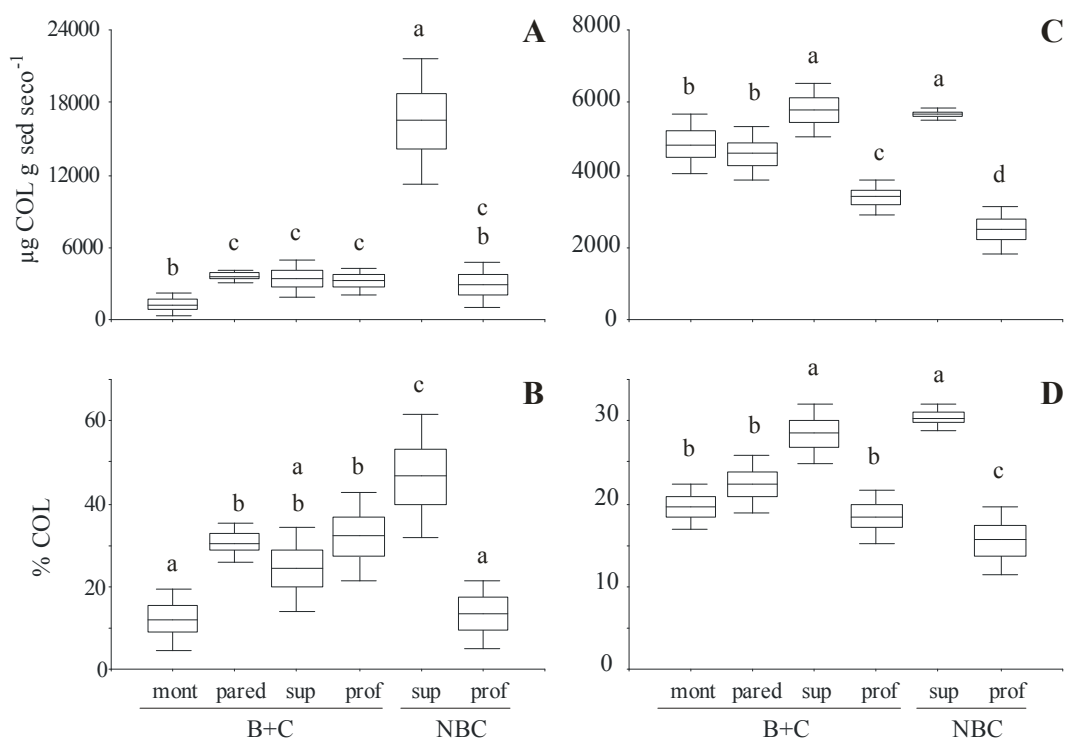


Fig. IV.4. Calidad de la materia orgánica del sedimento estimada según la composición química (siguiendo a Fabiano *et al.* 1995) para las distintas categorías de sedimentos de planicie de marea y de marisma. Las diferentes letras representan diferencias significativas (test LSD; $\alpha = 0.05$).

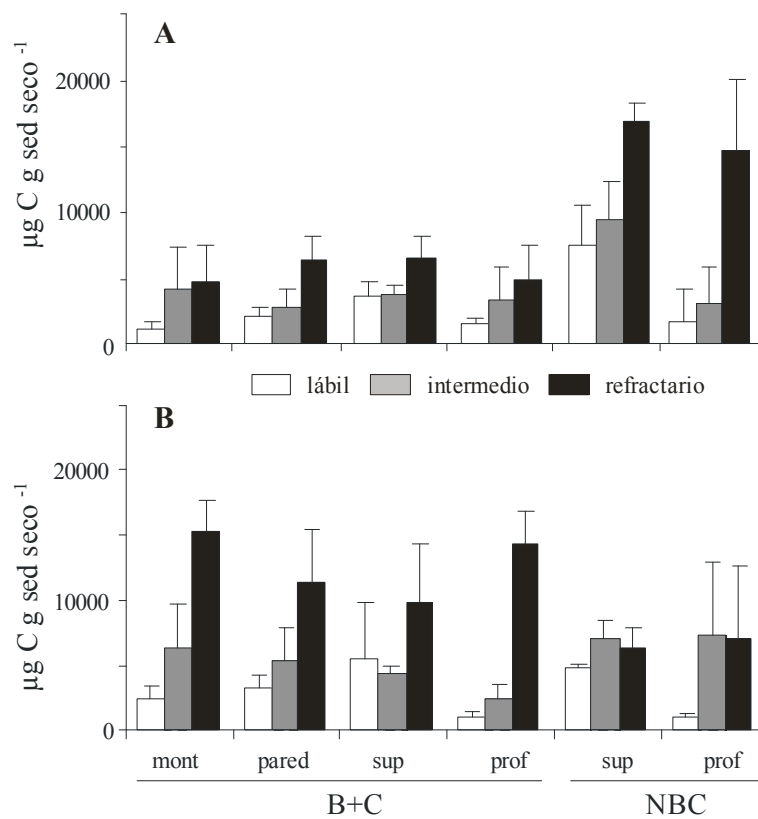


Fig. IV.5. Calidad de la materia orgánica del sedimento según los ensayos de biodisponibilidad para las distintas categorías de sedimentos de planicie de marea y de marisma.

CONCLUSIONES GENERALES

Los muestreos y experimentos de esta Tesis se centraron en determinar los efectos del cangrejo bioturbador *Neohelice granulata* y de sus cuevas en la dinámica de nutrientes inorgánicos y materia orgánica en sedimentos estuariales intermareales, discutiéndose sus posibles consecuencias sobre otros organismos que habitan estos ecosistemas. En el Capítulo I, se demuestra que la presencia y la actividad de *N. granulata* y sus cuevas determinan las características químicas de agua del poro y el estado redox del sedimento. La actividad de excavación incrementa el transporte de material particulado en la columna del sedimento, mezclando completamente los 7 cm superiores en solo unos pocos días. El sedimento bioturbado presenta un incremento en la oxigenación, y también cambios en los perfiles verticales de salinidad de agua de poro y en la distribución vertical del nitrógeno inorgánico disuelto y sulfato respecto a los sedimentos no-bioturbados. Además, las tasas de degradación de materia orgánica (MO) estimadas mediante el uso de un modelo diagenético fueron siempre mayores en sitios bioturbados (*i.e.*, con cuevas ocupadas y con cuevas no ocupadas) que en sitios no-bioturbados. De la misma manera, las vías por las cuales esta MO es degradada son también afectadas por la actividad de *N. granulata*. Así, debido a esta actividad de bioturbación, el metabolismo del sedimento bioturbado es fuertemente acelerado como consecuencia del mejor acoplamiento e incremento en las tasas de las diferentes vías de degradación de MO.

En el Capítulo II, se evaluó el efecto de este cangrejo y de sus cuevas en las características químicas del agua freática. En la marisma, los cangrejos pasan la mayor parte del tiempo dentro de sus cuevas, debido a que el fuerte estrés ambiental de estos ambientes es significativamente amortiguado dentro de ellas (Bortolus *et al.* 2002). En el interior de las cuevas almacenan alimento (*e.g.*, detritos) y defecan; lo que genera acumulación de nutrientes y detritos en diferentes estados de descomposición. Esto produce un marcado incremento en la concentración de nitrato, amonio y sulfato en el agua que se acumula dentro de las cuevas. Además, como se destacó anteriormente, las cuevas actuando solo como estructura física, tienen un impacto similar al de la mezcla (producida durante el excavado) produciendo un aumento de la oxigenación del sedimento. Cuando ocurren en las marismas, las cuevas constituyen conductos que descargan el agua acumulada en su interior directamente en el agua freática, por lo cual la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto en el agua freática se va incrementando a medida que ésta atraviesa los cangrejales, fluyendo desde zonas altas hacia canales de marea o aguas abiertas estuariales. Estos resultados confirman una novedosa e importante vía por la cual los organismos bioturbadores pueden afectar la exportación de nutrientes desde las marismas hacia las aguas abiertas. La visión clásica del rol de las marismas en los sistemas de interface entre ambientes terrestres y costeros las representa como efectivos filtros (*i.e.*, debido a la capacidad de absorción e inmovilización de nutrientes y contaminantes, y retención de sedimentos por la vegetación macrófita). Sin embargo, los resultados aquí presentados demuestran que esta capacidad puede ser afectada por organismos bioturbadores si estos son capaces de construir cuevas suficientemente profundas.

En los Capítulos III y IV, se muestra que la presencia y actividad de *N. granulata* y la presencia de sus cuevas, determinan además la magnitud y dirección del flujo de nutrientes disueltos entre el sedimento y la columna de agua, tanto para marismas como para planicies de marea (ver Fig. 1). La bioturbación estimula el flujo de nitrógeno inorgánico disuelto desde el sedimento hacia la columna de agua en las planicies de mareas, pero incrementa su tasa de consumo por el sedimento en la marisma. Además, la bioturbación estimula el metabolismo óxico y total del sedimento de marismas y planicies de marea, así como también los procesos de mineralización de N, nitrificación y desnitrificación. Además, la fijación de N₂ atmosférico es inhibida en la planicie de marea pero estimulada en la marisma. El efecto contrastante de la bioturbación en los flujos bentónicos de NID entre la planicie de marea y la marisma puede ser debido a que los cangrejos estimulan la mineralización de MO reciclando así nutrientes inorgánicos en ambos sitios, pero en las marismas promueven además la toma de nutrientes por parte de las macrófitas (Daleo *et al.* 2007) debido a la oxigenación que producen en el sedimento. Esto resulta en un incremento de la disponibilidad de nutrientes en la planicie de marea, y su consecuente flujo hacia la columna de agua; y una disminución de su disponibilidad en sedimentos de marisma, incrementando la fijación de N₂ y los flujos de NID desde la columna de agua hacia el sedimento. Si bien no hay marcadas diferencias en el contenido de materia orgánica entre sedimentos bioturbados y no-bioturbados, los cangrejos incrementan la proporción de carbono orgánico que es disponible para otros organismos infaunales y microorganismos, y también para ser exportado desde el sedimento hacia las aguas estuariales. Trabajos previos muestran que las cuevas de estos cangrejos actúan como trampas pasivas de detritos (Botto *et al.* 2006) y sedimentos (Escapa *et al.* 2008) probablemente ricos en

materia orgánica. Estos resultados, conjuntamente con los del Capítulo IV, sugieren que *N. granulata* afecta la forma en que la materia orgánica es exportada desde las marismas hacia el agua costera, pero no necesariamente su cantidad, ya que los detritos atrapados dentro de las cuevas son eficientemente remineralizados y exportados del sistema como CO₂ o como materia orgánica disuelta.

La mayor parte de la descomposición de la MO y de las reacciones de óxido-reducción que componen los ciclos globales de los elementos en ambientes marinos son mediadas por microorganismos. Además, la incorporación de MO en el sedimento y su remineralización son mediadas por la actividad de meio y macrofauna (Herman *et al.* 1999), que afectan la química del sedimento por medio de la construcción de cuevas, bioturbación, defecación, irrigación y/o secreción de mucus (Alongi 1998; Kostka *et al.* 2002, esta Tesis). Los organismos infaunales no sólo modifican los regimenes de las reacciones químicas, sino que también afectan los habitats microbianos por proveer sitios con intensas oscilaciones y gradientes geoquímicos y redox (Furukawa 2005, Marinelli & Waldbusser 2005). Así, la infauna sedimentaria afecta el curso de la diagénesis temprana; y su participación directa en la degradación de carbono orgánico y producción de metabolitos es cuantitativamente significativa (*e.g.*, Furukawa 2005, esta Tesis).

Los resultados de esta Tesis muestran que la bioturbación por *Neohelice granulata* incrementa la calidad y disponibilidad de los oxidantes (*i.e.*, aceptores de electrones) y de la materia orgánica sedimentaria, acelerando así las tasas de remineralización de esta materia orgánica. Esto tiene como consecuencia directa un incremento en la disponibilidad de metabolitos y nutrientes producidos durante la degradación de MO,

que pueden ser consumidos por otros organismos infaunales (soportando la trama trófica estuarial), o exportados hacia el agua costera como materia orgánica disuelta y nutrientes inorgánicos disueltos (ver Fig. 1). De esta forma, la actividad de *N. granulata* tiene un gran impacto en la preservación/exportación de la materia orgánica y en la fijación/remoción de nutrientes en los sistemas intermareales donde habita.

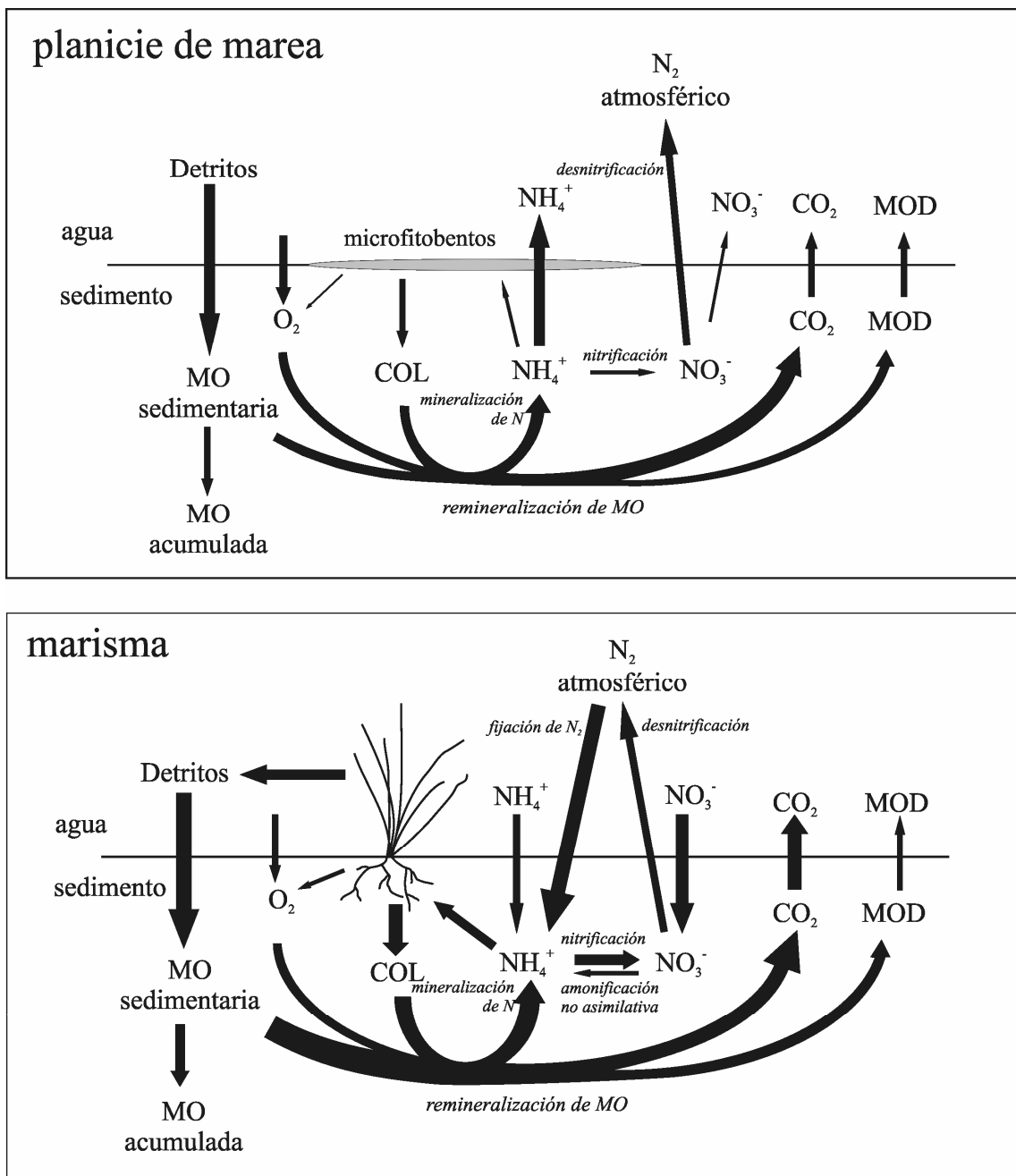


Fig. 1. Esquemas representando los efectos del cangrejo *N. granulata* sobre los ciclos biogeoquímicos de la materia orgánica y del N en sedimentos intermareales de marismas y planicies de marea. El tamaño de las flechas indica efectos positivos o de estimulación de los diferentes procesos, inducidos por la actividad de *N. granulata*.

Listado de símbolos y abreviaturas usados frecuentemente durante el desarrollo de esta Tesis.

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
COD	Carbono orgánico disuelto
COL	Carbono orgánico lábil
COT	Carbono orgánico total
C:N	Proporción entre contenido de carbono y nitrógeno orgánico
D _B	Coefficiente de bioturbación
Eh	Potencial redox
φ	Porosidad del sedimento
HCO	Hidratos de carbono
k _G	Tasa de degradación de materia orgánica
LIP	Lípidos
μM	Concentración micromolar
MO	Materia orgánica
MOD	Materia orgánica disuelta
NID	Nitrógeno inorgánico disuelto (amonio + nitrato)
NOD	Nitrógeno orgánico disuelto
PRT	Proteínas
ρ	Densidad del sedimento
TCO ₂	Carbono inorgánico total

- Adam P. 1990. Saltmarsh ecology. Cambridge studies in ecology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Allanson BR, Skinner D, Imberger J. 1992. Flow in prawn burrows. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 35: 253-266.
- Allen JRL, K Pye. 1992. Coastal saltmarshes: their nature and importance. *En: Allen JRL, Pye K [Eds.], Saltmarshes: Morphodynamics, Conservation and Engineering significance.* Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 1-18.
- Aller RC. 1983. The importance of the diffusive permeability of animal burrow linings in determining marine sediment chemistry. *Journal of Marine Research* 41, 299–322.
- Aller RC. 1988. Benthic fauna and biogeochemical processes in marine sediments: the role of burrow structures. *En: Blackburn TH, Sørensen J [Eds]. Nitrogen cycling in coastal marine environments.* John Wiley, New York, USA. pp. 301-338.
- Aller RC. 1994. Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* 114: 331-345.
- Aller RC. 2001. Transport and reactions in the bioirrigated zone. *En: Boudreau BP, Jørgensen BB [Eds.], The benthic boundary layer.* Oxford University Press. Oxford, UK. pp. 269-301.
- Aller JY, Aller RC. 1986. Evidence for localized enhancement of biological activity associated with tube and burrow structures in deep-sea sediments at the HEBBLE site, western North Atlantic. *Deep-Sea Research* 33: 755-790.
- Aller RC, Aller JY. 1992. Meiofauna and solute transport in marine muds. *Limnology & Oceanography* 37: 1018-1033.

- Aller RC, Aller JY. 1998. The effect of biogenic irrigation intensity and solute exchange on diagenetic reaction rates in marine sediments. *Journal of Marine Research* 56: 905-936.
- Aller RC, Yingst JY .1978. Biogeochemistry of tube dwellings: a study of the sedimentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy). *Journal of Marine Research* 36: 201-25.
- Alongi DM. 1998. Coastal ecosystem processes. CRC Press, Boca Ratón, USA.
- Alperin MJ, Albert DB, Martens CS. 1994. Seasonal variations in production and consumption rates of dissolved organic carbon in an organic-rich coastal sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 4909-4930.
- Alperin MJ, Martens CS, Albert DB, Suayah IB, Benninger LR, Blair NE, Jahnke RA. 1999. Benthic fluxes and porewater concentration profiles of dissolved organic carbon in sediments from the North Carolina continental slope. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63: 427-448.
- An S, Gardner WS. 2002. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as nitrogen sink, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology Progress Series* 237: 41-50.
- An S, Joye SB. 2001. Enhancement of coupled nitrification-denitrification by benthic photosynthesis in shallow estuarine sediments. *Limnology & Oceanography* 46: 62-74.
- Andersen FØ, Kristensen E. 1988. Oxygen microgradients in the rhizosphere of the mangrove *Avicennia marina*. *Marine Ecology Progress Series* 44: 201-204.

- Andersen FØ, Kristensen E. 1992. The importance of benthic macrofauna in decomposition of microalgae in a coastal marine sediment. *Limnology & Oceanography* 37: 1392-1403.
- Asmus RM, Jensen MH, Jensen KM, Kristensen E, Asmus H, Willel A. 1998. The role of water movement and spatial scaling for measurement of dissolved inorganic nitrogen fluxes in intertidal sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46: 221-232.
- Balderston WL, Sherr B, Payne WJ. 1976. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Applied Environmental Microbiology* 31: 504-508.
- Banta GT, Holmer M, Jensen MH, Kristensen E. 1999. Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 19: 189-204.
- Benner R. 2003. Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter. *En: Findlay SEG, Sinsabaugh RL [Eds.], Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter. Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 121-137.*
- Berg P, Rysgaard S, Funch P, Sejr MK. 2001. Effects of bioturbation on solutes and solids in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology* 26: 81-94
- Berg P, Rysgaard S, Thamdrup B. 2003. Dynamic modeling of early diagenesis and nutrient cycling. A case study in an Arctic marine sediment. *American Journal of Science* 303: 905-955.
- Berner RA. 1980 *Early Diagenesis*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Bernot MJ, Dodds WK, Gardner WS, McCarthy MJ, Sobolev D, Tank JL. 2003.

- Comparing denitrification estimates for a Texas estuary by using acetylene inhibition and membrane inlet mass spectrometry. *Applied & Environmental Microbiology* 69: 5950-5956.
- Bertness MD. 1985. Fiddler crab regulation of *Spartina alterniflora* production on a New England salt marsh. *Ecology* 66: 1042-1055.
- Biddanda B, Benner R. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology & Oceanography* 42: 506-518.
- Blackburn TH, Henriksen K. 1983. Nitrogen cycling in different types of sediment from Danish waters. *Limnology & Oceanography* 28: 477-493.
- Bortolus A. 2006. The austral cordgrass *Spartina densiflora* Brong.: its taxonomy, biogeography and natural history. *Journal of Biogeography* 33: 158-168.
- Bortolus A, Iribarne O. 1999. Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Marine Ecology Progress Series* 178: 78-88.
- Bortolus A, Laterra P, Iribarne O. 2004. Crab-mediated phenotypic changes in *Spartina densiflora* Brong. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 59: 97-107.
- Bortolus A, Schwint E, Iribarne O. 2002. Positive plant-animal interactions in a high marsh of a Southwestern Atlantic coastal lagoon. *Ecology* 83: 733-742.
- Boschi EE. 1964. Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense. *Boletín del Instituto de Biología Marina (Mar del Plata; Argentina)* 6: 1-99.
- Botto F, Iribarne O. 1999. Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* (Dana) on the benthic community of a SW Atlantic coastal lagoon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 241: 263-284.

- Botto F, Iribarne O. 2000. Contrasting effects of two burrowing crabs (*Chasmagnathus granulata* and *Uca uruguayensis*) on sediment composition and transport in estuarine environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51: 141-151.
- Botto F, Iribarne O, Gutiérrez J, Bava J, Gagliardini A, Valiela I. 2006. Ecological importance of passive deposition of organic matter into burrows of the SW Atlantic crab *Chasmagnathus granulatus*. *Marine Ecology Progress Series* 312: 201-210.
- Botto F, Palomo G, Iribarne O, Martínez MM. 2000. The effect of the Southwestern Atlantic burrowing crabs on habitat use and foraging activity of migratory shorebirds. *Estuaries* 23: 208-215.
- Botto F, Valiela I, Iribarne O, Martinetto P, Alberti J. 2005. Impact of burrowing crabs on C and N sources, control, and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Marine Ecology Progress Series* 293: 155-164.
- Boudreau BP. 1986. Mathematics of tracer mixing in sediments. II. Non local mixing and biological conveyor-belt phenomena. *American Journal of Science* 286: 199-238.
- Boudreau BP, Mucci A, Sundby B, Luther GW, Silverberg N. 1998. Comparative diagenesis at three sites on the Canadian continental margin. *Journal of Marine Research* 56: 1259-1284.
- Burdige DJ. 2006. *Geochemistry of marine sediments*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Burdige DJ, Homstead J. 1994. Fluxes of dissolved organic carbon from Chesapeake Bay sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 3407-3424.
- Burnett WC, Taniguchi M, Oberdorfer J. 2001. Measurement and significance of the direct discharge of groundwater into the coastal zone. *Journal of Sea Research* 46: 109-116.

- Bradley PM, Morris JT. 1992. Effect of salinity on the critical nitrogen concentration of *Spartina alterniflora* Loisel. *Aquatic Botany* 43: 149-161.
- Canfield DE. 1993. Organic matter oxidation in marine sediments. *En: Wollast R, Chou L, Mackenzie F. [Eds.], Interactions of C, N, P and S biogeochemical cycles.* Springer, New York, USA. pp. 333-363.
- Canfield DE, Thamdrup B, Kristensen E. 2005. *Aquatic Geomicrobiology, Volume 48 (Advances in Marine Biology).* Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Capone DG. 1988. Benthic nitrogen fixation. *En: Blackburn TH, Sørensen J [Eds.], Nitrogen cycling in coastal marine environments.* John Wiley, Chichester, UK. pp. 85-123.
- Capone DG, Kiene RP. 1988 Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnology & Oceanography* 33: 725-749.
- Charpy-Robaud C, Sournia A. 1990. The comparative estimation of phytoplanktonic, microphytobenthic, and macrophytobenthic primary production in the oceans. *Marine Microbial Food Webs* 4: 31-57.
- Christensen B, Vedel A, Kristensen E. 2000. Carbon and nitrogen fluxes in sediment inhabited by suspension-feeding (*Nereis diversicolor*) and non- suspension-feeding (*N. virens*) polychaetes. *Marine Ecology Progress Series* 192: 203-217.
- Conover WJ. 1980. *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed. Wiley, New York, USA.
- Correl DL. 1981. Nutrient mass balances for the watershed, headwaters intertidal zones, and basin of the Rhode River estuary. *Limnology & Oceanography* 26: 1142-1149.

- Daleo P, Fanjul E, Mendez Casariego A, Silliman BR, Bertness MD, Iribarne O. 2007. Ecosystem engineers activate mycorrhizal mutualism in salt marshes. *Ecology Letters* 10: 902-908.
- Danovaro R. 1996. Detritus-Bacteria-Meiofauna interactions in a seagrass bed (*Posidonia oceanica*) of the NW Mediterranean. *Marine Biology* 127: 1-13.
- Danovaro R, Fabiano M, Della Croce N. 1993. Labile organic matter and microbial biomasses in deep-sea sediments (Eastern Mediterranean Sea). *Deep Sea Research* 40: 953-965.
- David KAV, Apte SK, Banerji A, Thomas J. 1980. Acetylene reduction assay for nitrogenase activity: gas chromatographic determination of ethylene per sample in less than one minute. *Applied Environmental Microbiology* 39: 1078-1080.
- Day RW, Quinn GP. 1989. Comparison of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecological Monographs* 59: 433-463.
- Doering PH, Kelly JR, Oviatt CA, Sowers T. 1987. Effect of the hard clam *Mercenaria mercenaria* on benthic fluxes of inorganic nutrients and gases. *Marine Biology* 94: 377-383.
- Duarte C. 1995. Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. *Ophelia* 41: 87-112.
- 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.
- Escapa M, Iribarne O, Navarro D. 2004. Effects of intertidal burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on infaunal zonation patterns, tidal behavior and risk of mortality. *Estuaries* 27: 120-131.
- Escapa M, Perillo GME, Iribarne O. 2008. Sediment dynamics modulated by burrowing

- crab activities in contrasting SW Atlantic intertidal habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 80: 365-373.
- Escapa M, Minkoff DR, Perillo GME, Iribarne OO. 2007. Direct and indirect effects of burrowing crab activities on erosion of southwest Atlantic *Sarcocornia*-dominated marshes. *Limnology & Oceanography* 56: 2340-2349.
- Fabiano M, Danovaro R. 1994. Composition of organic matter in sediments facing a river estuary (Tyrrhenian Sea): relationships with bacteria and microphytobenthic biomass. *Hydrobiologia* 277: 71-84.
- Fabiano M, Danovaro R, Fraschetti S. 1995. Temporal trend analysis of the elemental and biochemical composition of the sediment organic matter in subtidal sandy sediments of the Ligurian Sea (NW Mediterranean): a three year study. *Continental Shelf Research* 15: 1453-1469.
- Fasano JL, Hernandez MA, Isla FI, Schnack EJ. 1982. Aspectos evolutivos y ambientales de la laguna Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Oceanologica Acta No. Spec.:* 285-292.
- Fenchel T, King GM, Blackburn TH. 1998. *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Fichez R. 1991. Composition and fate of organic matter in submarine cave sediments: implications for the biogeochemical cycle of organic carbon. *Oceanologica Acta* 14: 369-377.
- Frankel L, Mead DJ. 1973. Mucilaginous matrix of some estuarine sands in Connecticut. *Journal of Sedimentary Petrology* 43: 1090-1095.
- François F, Gerino M, Stora G, Durbec J-P, Poggiale J-C. 2002. Functional approach to sediment reworking by gallery-forming macrobenthic organisms: modeling and

- application with the polychaete *Nereis diversicolor*. Marine Ecology Progress Series 229: 127-136.
- Froelich PN, Klinkhammer GP, Bender ML, Luedtke NA, Heath GR, Cullen D, Dauphin P, Hammond D, Hartman B, Maynard V. 1979. Early diagenesis of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43: 1075-1090.
- Furukawa Y. 2005. Biogeochemical consequences of infaunal activities. *En*: Kristensen E, Haese RR, Kotska JE [Eds.], Interactions between macro- and micro- organisms in marine sediments. Coastal and Estuarine Studies 60. American Geophysical Union, Washington, USA. pp. 159-177.
- Furukawa Y, Smith A, Kostka J, Watkins J, Alexander C. 2004. Quantification of macrobenthic effects on diagenesis using a multicomponent inverse model in salt marsh sediments. *Limnology & Oceanography* 49: 2058-2072.
- Gambrell RP, Patrick Jr WH. 1978. Chemical and microbiological properties of anaerobic soils and sediments. In: Hook DD, Craw-Ford RMM [Eds.], Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, USA. pp. 375-421.
- Gerchakov MR, Hatcher PG. 1972. Improved techniques for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnology & Oceanography* 17: 943-989.
- Graf T, Shulz R, Peinert R, Meyer-Reil LA. 1983. Benthos response to sedimentation during autumn to spring at a shallow water station in the western Kiel bight. I. Analysis of the processes on the community level. *Marine Biology* 77: 235-246.
- Grant J, Hargrave BT. 1987. Benthic metabolism and the quality of sediment organic carbon. *Biological Oceanography* 4: 243-264.
- Greiser N, Faubel A. 1988. Biotic factors. *En*: Higgens RP, Thiel H [Eds.], Introduction

- to the study of meiofauna. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp. 79-114.
- Grenz C, Denis L. 2003 Spatial variability in sediment oxygen consumption under winter conditions in a lagoonal system in New Caledonia (South Pacific) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 286: 33-47.
- Gribsholt B, Kostka JE, Kristensen E. 2003. Impact of fiddler crabs and plant roots on sediment biogeochemistry in a Georgia saltmarsh. *Marine Ecology Progress Series* 259: 237-251.
- Gribsholt B, Kristensen E. 2002. Effects of bioturbation and plant roots on salt marsh biogeochemistry: a mesocosm study. *Marine Ecology Progress Series* 241: 71-87.
- Gribsholt B, Kristensen E. 2003. Benthic metabolism and sulfur cycling along an inundation gradient in a tidal *Spartina anglica* salt marsh. *Limnology & Oceanography* 48: 2151-2162.
- Gutiérrez JL, Jones CG, Groffman PM, Findlay SEG, Iribarne OO, Ribeiro PD, Bruschetti CM. 2006. The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems* 9: 647-658.
- Hamersley MR, Howes BL. 2005. Coupled nitrification–denitrification measured in situ in a *Spartina alterniflora* marsh with a $^{15}\text{NH}_4^+$ tracer. *Marine Ecology Progress Series* 299: 123-135.
- Hansen LS, Blackburn TH. 1991 Aerobic and anaerobic mineralization of organic material in marine sediment microcosms. *Marine Ecology Progress Series* 75: 283-291.
- Hansen K, King GM, Kristensen E. 1996. Impact of the soft-shell clam *Mya arenaria* on sulfate reduction in an intertidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 181-194.

- Hansen K, Kristensen E. 1997. Impact of Macrofaunal Recolonization on benthic metabolism and nutrient fluxes in a shallow marine sediment previously overgrown with macroalgal mats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 45: 613-628.
- Hansen K, Kristensen E. 1998 The impact of the polychaete *Nereis diversicolor* and enrichment with macroalgal (*Chaetomorpha linum*) detritus on benthic metabolism and nutrient dynamics in organic-poor and organic-rich sediment. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology* 231: 201-223.
- Harvey JW, Odum WE. 1990. The Influence of Tidal Marshes on Upland Groundwater Discharge to Estuaries. *Biogeochemistry* 10: 217-236.
- Hauxwell J, Valiela I. 2004 Effects of nutrient loading on shallow seagrass-dominated coastal systems: patterns and processes. En: Nielsen S, Banta G, Pedersen M [Eds.], *Estuarine nutrient cycling: the influence of primary producers*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht , Netherlands. pp. 59-92.
- Henrichs SM. 1992. Early diagenesis of organic matter in marine sediments: progress and perplexity. *Marine Chemistry* 39: 119-149.
- Herbert RA. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 563-590.
- Herman PMJ, Middelburg JJ, Van de Koppel J, Heip CHR. 1999. Nutrients in estuaries. En: Nedwell DB, Raffaelli DG [Eds.], *Advances in ecological research: Estuaries*. Academic Press, Cornwall, UK. pp. 195-240.
- Hines ME, Knollmeyer SI, Tugel JB. 1989. Sulfate reduction and other sedimentary biogeochemistry in a northern New England salt marsh. *Limnology & Oceanography* 34: 578-590.

- Holmer M, Gribsholt B, Kristensen E. 2002. Effects of sea level rise on growth of *Spartina anglica* and oxygen dynamics in rhizosphere and salt marsh sediment. Marine Ecology Progress Series 225: 197-204.
- Howarth RW, Jørgensen BB. 1984. Formation of ^{35}S -labeled elemental sulphur and pyrite in coastal marine sediments (Limfjorden and Kysing Fjord, Denmark) during short-term $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ reduction measurements. Geochimica et Cosmochimica Acta 62: 1807-1818.
- Howarth RW, Marino R, Lane J, Cole JJ. 1988. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine and marine ecosystems. I. Rates and importance. Limnology & Oceanography 33: 619-687.
- Howarth RW, Michaels AF. 2000. The measurement of primary production in aquatic ecosystems. *En*: Sala O, Jackson RB, Mooney HA, Howarth RW [Eds.], Methods in ecosystem science. Springer, New York, USA. pp. 72-85.
- Howes BL, Dacey JWH, Goehring DD. 1986. Factors controlling the growth form of *Spartina alterniflora*: Feedbacks between above-ground production, sediment oxidation, nitrogen and salinity. Journal of Ecology 74: 881-98.
- Howes BL, Teal JM. 1994. Oxygen loss from *Spartina alterniflora* and its relationship to salt marsh oxygen balance. Oecologia 97: 431-438.
- Iribarne O, Bortolus A, Botto F. 1997. Between-habitats differences in burrow characteristics and trophic modes in the south western Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata*. Marine Ecology Progress Series 155: 132-145.
- Iribarne O, Botto F, Martinetto P, Gutiérrez J. 2000. The role of the SW Atlantic burrowing crab in sequestering debris. Marine Pollution Bulletin 40: 1057-1062.
- Iribarne O, Martinetto P, Schwindt E, Botto F, Bortolus A, Garcia Borboroglu P. 2003.

- Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296: 167-182.
- Iribarne O, Bruschetti M, Escapa M, Bava J, Botto F, Gutierrez J, Palomo G, Delhey K, Petracci P, Gagliardini A. 2005. Small- and large-scale effect of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on habitat use by migratory shorebirds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 315: 87-101.
- Isacch JP, Costa CSB, Rodríguez-Gallego L, Conde D, Escapa M, Gagliardini DA, Iribarne OO. 2006. Distribution of saltmarsh plant communities associated with environmental factors along a latitudinal gradient on the south-west Atlantic coast. *Journal of Biogeography* 33: 888-900.
- Jahnke RA, Alexander CR, Kostka JE. 2003. Advective pore water input of nutrients to the Satilla River Estuary, Georgia, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 641-653.
- Jensen HJ, Lomstein E, Sorensen J. 1990. Benthic NH₄⁺ and NO₃⁻ flux following sedimentation of a spring phytoplankton bloom in Aarhus Bight, Denmark. *Marine Ecology Progress Series* 61: 87-96.
- Jickells TD, Rae JE. 1997. Biogeochemistry of intertidal sediments. *En*: Jickells TD, Rae JE [Eds.], *Biogeochemistry of intertidal sediments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 1-15.
- Johannes RE. 1980. The ecological significance of the submarine discharge of groundwater. *Marine Ecology Progress Series* 3: 365-373.
- Jones SE, Jago CF. 1993. In situ assessment of modification of sediment properties by burrowing invertebrates. *Marine Biology* 115: 133-142.

- Jørgensen BB, Revsbech NP. 1989. Oxygen uptake, bacterial distribution and carbon-nitrogen-sulfur cycling in sediments from the Baltic Sea-North Sea transition. *Ophelia* 31: 51-72.
- Jørgensen BB, Sørensen J. 1985. Seasonal cycles of O₂, NO₃⁻, and SO₄⁻² reduction in estuarine sediments: the significance of an NO₃⁻ reduction maximum in spring. *Marine Ecology Progress Series* 24: 65-74.
- Keil R, Martlucan D, Prahl F, Hedges J. 1994. Sorptive preservation of labile organic matter in marine sediments. *Nature* 370: 549-552.
- Koike I, Sørensen J. 1988. Nitrate reduction and denitrification in marine sediments. *En: Blackburn TH, Sørensen J [Eds.], Nitrogen cycling in coastal marine sediments. John Wiley & Sons, Chichester, UK. pp. 251-274.*
- Komada T, Reimers CE, Luther III GW, Burdige DJ. 2004. Factors affecting dissolved organic matter dynamics in mixed-redox to anoxic coastal sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 4099-4111.
- Korestky CM, Meile C, Van Cappellen P. 2002. Quantifying bioirrigation using ecological parameters: a stochastic approach. *Geochemical Transactions* 3: 17-30.
- Korestky CM, Van Cappellen P, DiChristina TJ, Kostka JE, Lowe KL, Moore CM, Roychoudhury AN, Viollier E. 2005. Salt marsh pore water geochemistry does not correlate with microbial community structure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62: 233-251.
- Kostka JE, Gribsholt B, Petrie E, Dalton D, Skelton H, Kristensen E. 2002. The rates and pathways of carbon oxidation in bioturbated saltmarsh sediments. *Limnology & Oceanography* 47: 230-240.
- Kostka JE, Luther GW III. 1994. Partitioning and speciation of solid phase iron in

- saltmarsh sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 1701-1710.
- Kostka JE, Thamdrup B, Glud RN Canfield DE. 1999. Rates and pathways of carbon oxidation in permanently cold Arctic sediments. *Marine Ecology Progress Series* 180: 7-21.
- Kristensen E. 1984. Effect of natural concentrations on nutrient exchange between a polychaete burrow in estuarine sediment and the overlying water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 75: 171-190.
- Kristensen E. 1985. Oxygen and inorganic nitrogen exchange in a *Nereis virens* (Polychaeta) bioturbated sediment-water system. *Journal of Coastal Research* 1: 109-116.
- Kristensen E. 1988. Benthic Fauna and Biogeochemical Processes in Marine Sediments: Microbial Activities and Fluxes. *En: Blackburn NTH, Sørensen L [Eds.], Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK. pp. 275-299.*
- Kristensen E. 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia* 426: 1-24.
- Kristensen E. 2001. Impact of polychaetes (*Nereis* spp. and *Arenicola marina*) on carbon biogeochemistry in coastal marine sediment: a review. *Geochemical Transactions* 2: 92-104.
- Kristensen E, Andersen TK, Blackburn TH. 1992. Effects of benthic macrofauna and temperature on degradation of macroalgal detritus: The fate of organic carbon. *Limnology & Oceanography* 37: 1404-1419.
- Kristensen E, Blackburn TH. 1987. The fate of organic carbon and nitrogen in

- experimental marine sediment systems: Influence of bioturbation and anoxia. *Journal of Marine Research* 45: 231-257.
- Kristensen E, Holmer M. 2001. Decomposition of plant materials in marine sediment exposed to different electron acceptors (O_2 , NO_3^- and SO_4^{2-}), with emphasis on substrate origin, degradation kinetics, and the role of bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65:419-433.
- Kristensen E, Jensen MH, Aller RC. 1991. Direct measurement of dissolved inorganic nitrogen exchange and denitrification in individuals polychaete (*Nereis virens*) burrows. *Journal of Marine Research* 49: 355-377.
- Kristensen E, Jensen MH, Andersen TK. 1985. The impact of polychaete (*Nereis virens* Sars) burrows on nitrification and nitrate reduction in estuarine sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 85: 75-91.
- Kristensen E, Kostka JE. 2005. Macrofaunal burrows and irrigation in marine sediment: microbiological and biogeochemical interactions. *En: Kristensen E, Haese RR, Kostka JE [Eds.], Interactions between macro- and micro- organisms in marine sediments. Coastal and Estuarine Studies 60. American Geophysical Union, Washington, USA. pp. 125-157.*
- La Roche J. 1983. Ammonium regeneration: its contribution to phytoplankton nitrogen requirements in a eutrophic environment. *Marine Biology* 75: 231-240.
- Lambert M.J, Burnett WC. 2003. Submarine groundwater discharge estimates at a Florida coastal site based on continuous radon measurements. *Biogeochemistry* 66: 55-73.
- Letzsch WS, Frey RW. 1980. Erosion of salt marsh tidal banks, Sapelo Island, Georgia. *Senckenbergiana Maritima* 12: 201-212.
- Luppi TA, Spivak ED, Bas CC, Anger K. 2004. Molt and growth of an estuarine crab,

- Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae), in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 333-344.
- Mackin JE, Aller RC. 1984. Ammonium adsorption in marine sediments. *Limnology & Oceanography* 29: 250-257.
- Mackin JE, Swider KT. 1989. Organic-matter decomposition pathways and oxygen-consumption in coastal marine sediments. *Journal of Marine Research* 47: 681-716.
- Manly BF. 1998. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman and Hall, New York, USA.
- Marinelli RL. 1994. Effects of burrow ventilation on activities of a terebellid polychaete and silicate removal from sediment porewaters. *Limnology & Oceanography* 39: 303-317.
- Marinelli RL, Waldbusser GG. 2005. Plant-animal-microbe interactions in coastal sediments: Closing the ecological loop. *En: Kristensen E, Haese RR, Kotska JE [Eds.], Interactions between macro- and micro- organisms in marine sediments. Coastal and Estuarine Studies 60. American Geophysical Union, Washington, USA. pp. 233-250.*
- Marinelli RL, Williams TJ. 2003. Evidence for density-dependent effects of infauna on sediment biogeochemistry and benthic –pelagic coupling in nearshore systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 179-192.
- Martinetto P, Iribarne O, Palomo G. 2005. Effect of fish predation on intertidal benthic fauna is modified by crab bioturbation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318: 71-84
- Martinetto P, Valiñas M, Palomo G, Iribarne O. 2007. Negative interactions between two SW Atlantic intertidal crabs in soft-bottom habitats. *Marine Biology* 151: 1479-

- Mayer LM, Schick LL, Setchell FW. 1986. Measurement of protein in nearshore marine sediments. *Marine Ecology Progress Series* 30:159-165
- Mayer MS, Schaffner L, Kemp WM. 1995. Nitrification potentials of benthic macrofaunal tubes and burrow walls: effects of sediment NH_4^+ and animal irrigation behavior. *Marine Ecology Progress Series* 121: 157-169.
- McGlathery KJ, Sundbäck K, Anderson IC. 2004. The importance of primary producers for benthic nitrogen and phosphorous cycling. *En: Nielsen S, Banta G, Pedersen M [Eds.], Estuarine nutrient cycling: the influence of primary producers. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 231-261.*
- Meadows PS, Meadows A. 1991. The geotechnical and geochemical implications of bioturbation in marine sedimentary ecosystems. *En: Meadows PS, Meadows A [Eds.], The Environmental Impact of Burrowing Animals and Animal Burrows. Symposium of the Zoological Society of London, London, UK. pp. 157-181.*
- Menone M, Miglioranza KSB, Iribarne O, Aizpún de Moreno JEA, Moreno VJ. 2004. The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping organochlorine pesticides. *Marine Pollution Bulletin* 48: 240-247.
- Meysman FJR, Galaktionov OS, Madani S, Middelburg JJ. 2005. Modelling biological interactions in aquatic sediments as coupled reactive transport. *En: Kristensen E, Haese RR, Kostka JE [Eds.], Interactions between macro- and microorganisms in marine sediments. American Geophysical Union, Washington, USA. pp. 359-388.*
- Meysman FJR, Middelburg JJ, Heip CHR. 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *TRENDS in Ecology and Evolution* 21:688-695.

- Michaud E, Desrosiers G, Mermillod-Blodin F, Sundby B, Stora, G. 2005. The functional group approach to bioturbation: The effects of biodiffusers and gallery-diffusers of the *Macoma baltica* community on sediment oxygen uptake. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326: 77-88.
- Montague CL. 1982. The influence of fiddler crab burrows and burrowing on metabolic process in salt marsh sediments. *En: Kennedy VS [Ed.] Estuarine Comparisons*. Academic Press, New York, USA. pp. 283-301.
- Moore WS. 1996. Large groundwater inputs to coastal waters revealed by Ra-226 enrichments. *Nature* 380: 612-614.
- Moore WS. 1999. The subterranean estuary: a reaction zone of ground water and sea water. *Marine Chemistry* 65: 111-125.
- Moriarty DLW, Iverson RL, Pollard PC. 1986. Exudation of organic carbon by the seagrass *Halodule wrightii* Aschers and its effect on bacterial growth in the sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 96: 115-126.
- Nedwell BD, Jickells TD, Trimmer M, Sanders R. 1999. Nutrients in estuaries. *En: Nedwell DB, Raffaelli DG [Eds.], Advances in ecological research: Estuaries*. Academic Press, Cornwall, UK. pp. 43-92.
- Nielsen OI, Gribsholt B, Kristensen E, Revsbech NP. 2004. Microscale distribution of oxygen and nitrate in sediment inhabited by *Nereis diversicolor*: spatial patterns and estimated reaction rates. *Aquatic Microbial Ecology* 34: 23-32.
- Nielsen OI, Kristensen E, Macintosh DJ. 2003. Impact of fiddler crabs (*Uca* spp.) on rates and pathways of benthic mineralization in deposited mangrove shrimp pond waste. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289: 59- 81.

- Nixon SW. 1980. Between coastal marshes and coastal waters - a review of twenty years of speculation and research on the role of salt marshes and coastal waters in estuarine productivity and water chemistry. *En: Hamilton P, McDonald KB [Eds.], Estuarine and wetland processes with emphasis on modeling. Plenum Press, New York, USA. pp. 437-526.*
- Nixon SW. 1986. Nutrient dynamics and the productivity of marine coastal waters. *En: Halwagy R, Clayton D, Behbehani M [Eds.], Marine environment and pollution. The Alden Press, Oxford, UK. pp. 97-115.*
- Nixon SW. 1992. Quantifying the relationship between nitrogen input and the productivity of marine ecosystems, *En: Takahashi M, Nakata K, Parsons TR [Eds.], Proceedings of Advanced Marine Technology Conference (AMTEC), Vol. 5, Tokyo, Japan. pp. 57-83.*
- Oremland RS, Capone DG. 1988. Use of 'specific' inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology 10: 285-383.*
- Paarlberg AJ, Knaapen MAF, de Vries MB, Hulscher SJMH, Wang ZB. 2005. Biological influences on morphology and bed composition of an intertidal flat. *Estuarine, Coastal and Shelf Science 64: 577-590.*
- Papaspyrou S, Gregersen T, Cox RP, Thessalou-Legaki M, Kristensen E. 2005. Sediment properties and bacterial community in burrows of the ghost shrimp *Pestarella tyrrhena* (Decapoda: Thalassinidea). *Aquatic Microbial Ecology 38: 181-190.*
- Passioura JB, Ball MC, Knight JH. 1992. Mangroves may salinize the soil and in doing so limit their transpiration rate. *Functional Ecology 6: 476-481.*
- Pedersen MF, Nielsen SL, Banta GT. 2004. Interaction between vegetation and nutrient dynamics in coastal marine ecosystems: an introduction. *En: Nielsen S, Banta G,*

- Pedersen M [Eds.], Estuarine Nutrient Cycling: The influence of Primary Producers. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-15.
- Pelegri SP, Blackburn TH. 1995. Effect of bioturbation by *Nereis* sp., *Mya arenaria*, and *Cerastoderma* sp. on nitrification and denitrification in estuarine sediments. *Ophelia* 42: 289-299.
- Pelegri S, Nielsen LP, Blackburn TH. 1994. Denitrification in estuarine sediment stimulated by the irrigation activity of the amphipod *Corophium volutator*. *Marine Ecology Progress Series* 105: 285-290.
- Perillo GME, Minkoff D, Piccolo MC. 2005. Novel mechanism of stream formation in coastal wetlands by crab–fish–groundwater interaction. *Geo-Marine Letters* 25: 217-220.
- Posey MH. 1986. Changes in a benthic community associated with dense beds of a burrowing deposit-feeder, *Callinassa californiensis*. *Marine Ecology Progress Series* 31:15-22.
- Posey MH, Dumbauld BR, Armstrong DA. 1991. Effects of a burrowing mud shrimp, *Upogebia pugettensis* (Dana), on abundances of macro-infauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 148: 283-294.
- Pusceddu A, Sarà G, Mazzola A, Fabiano M. 1997. Relationships between suspended and sediment organic matter in a semi-enclosed marine system: the Stagnone di Marsala sound (Western Sicily). *Water, Air, and Soil Pollution* 99: 343-352.
- Pusceddu A, Sarà, Armeni M, Fabiano M, Mazzola A. 1999. Seasonal and spatial changes in the sediment organic matter of a semi-enclosed marine system (W-Mediterranean Sea). *Hydrobiologia* 397: 59-70.
- Pusceddu A, Dell'Anno A, Danovaro R, Manini E, Sara G, Fabiano M. 2003.

- Enzymatically hydrolyzable protein and carbohydrate sedimentary pools as indicators of the trophic state of detritus sink systems: A case study in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuaries* 26: 641-650.
- Qiu S, McComb AJ. 1996. Drying-induced stimulation of ammonium release and nitrification in reflooded lake sediment. *Marine and Freshwater Research* 47: 531-536.
- Revsbech NP, Sørensen J, Blackburn TH. 1980. Distribution of oxygen in marine sediments measured with microelectrodes. *Limnology & Oceanography* 25: 403-411.
- Revsbech NP, Jørgensen BB. 1981. Primary production of microalgae in sediments measured by microprofile, $H^{14}CO_3$, and oxygen exchange methods. *Limnology & Oceanography* 26:717-730.
- Revsbech NP, Jørgensen BB, Blackburn TH, Cohen Y. 1983. Microelectrode studies of the photosynthetic algae on leaf photosynthesis could be O_2 , H_2S , and pH profiles of a microbial mat demonstrated by measuring O_2 release from mat. *Limnology & Oceanography* 28: 1062-1074.
- Ridd PV. 1996. Flow through animal burrows in mangrove swamps. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 43: 617-625.
- Risgaard-Petersen N. 2004. Denitrification. *En: Nielsen S., Banta G, Pedersen M. [Eds.], Estuarine Nutrient Cycling: The influence of Primary Producers. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 263-280.*
- Robertson GP, Wedin D, Groffman PM, Blair JM, Holland EA, Nadelhoffer KJ, Harris D. 1999. Soil carbon and nitrogen availability: nitrogen mineralization, nitrification and carbon turnover. *En: Robertson GP, Bledsoe CS, Coleman DC, Sollins P [Eds.],*

- Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, New York, USA. pp. 258–271.
- Rontani J-F, Volkman JK. 2005. Lipid characterization of coastal hypersaline cyanobacterial mats from the Camargue (France). *Organic Geochemistry* 36: 251-272.
- Rozema J, Leendertse P, Bakker J, van Wijnen H. 2000. Nitrogen and vegetation dynamics in European salt marshes. *En: Weintein MP, Kreeger DA [Eds.], Concepts and controversies in tidal marsh ecology.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 469-491.
- Rysgaard S, Risgaard-Petersen N, Sloth NP, Jensen K, Nielsen LP. 1994. Oxygen regulation of nitrification and denitrification in sediments. *Limnology & Oceanography* 39: 1643-1652.
- Sakai K, Türkay M, Yang S.-L. 2006. Revision of the *Helice/Chasmagnathus* complex (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Abhandlungen Der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 565: 1-76.
- Schlesinger WH. 1991. *Biogeochemistry: An analysis of global change.* Academic Press, California, USA
- Slomp CP, Van Cappellen P. 2004. Nutrient inputs to the coastal ocean through submarine groundwater discharge: controls and potential impact. *Journal of Hydrology* 295: 64-86.
- Solan M, Wigham BD. 2005. Biogenic particle reworking and Bacterial-invertebrate interactions in marine sediments. *En: Kristensen E, Haese RR, Kotska JE [Eds.], Interactions between macro- and micro- organisms in marine sediments.* Coastal and Estuarine Studies 60. American Geophysical Union, Washington, USA. pp.105-124.

- Solórzano L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology & Oceanography* 14: 799-801.
- Spivak E, Anger K, Bas C, Luppi T, Ismael D. 1996. Size structure, sex ratio, and breeding season in two intertidal grapsid crab species from Mar Chiquita lagoon, Argentina. *Nerítica* 10: 7-26.
- Spivak E, Anger K, Luppi T, Bas C, Ismael D. 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgolander Meeresunters* 48: 59-78.
- Stewart WDP, Fitzgerald GP, Burris RH. 1967. In situ studies on nitrogen fixation with acetylene reduction technique. *Science* 158: 1426-1432.
- Stieglitz T, Ridd P, Müller P. 2000. Passive irrigation and functional morphology of crustacean burrows in a tropical mangrove swamp. *Hydrobiologia* 421: 69-76.
- Stumm W, Morgan JJ. 1996. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters* 3rd edn. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Sundbäck K, McGlathery K. 2005. Interactions between benthic macroalgal and microalgal mats. *En: Kristensen E, Haese RR, Kotska JE [Eds.], Interactions between macro- and micro- organisms in marine sediments. Coastal and Estuarine Studies* 60. American Geophysical Union, Washington, USA. pp.7-29.
- Sundby B, Vale C, Caetano M, Luther GW III. 2003. Redox chemistry in the root zone of a salt marsh sediment in the Tagus Estuary, Portugal. *Aquatic Geochemistry* 9: 257-271.
- Tamura H, Goto K, Yotsuyanagi T, Nagayama M. 1974. Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron(III). *Talanta* 21: 314-318.

- Taylor DI, Allanson BR. 1993. Impact of dense crab populations on carbon exchanges across the surface of a saltmarsh. *Marine Ecology Progress Series* 101: 119-129.
- Thamdrup B, Candfield DE. 2000. Benthic respiration in aquatic sediments. *En: Sala OE, Jackson RB, Mooney HA, Howarth RW [Eds.], Methods in ecosystem science.* Springer, New York, USA. pp. 86-116.
- Tobias CR, Anderson IC, Canuel EA, Macko SA. 2001. Nitrogen cycling through a fringing marsh-aquifer ecotone. *Marine Ecology Progress Series* 210: 25-39.
- Underwood AJ. 1997. *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ. 1995. The Measurement of Microbial Carbohydrate Exopolymers from Intertidal Sediments. *Limnology & Oceanography* 40: 1243-1253
- Valiela I, Costa J, Foreman K, Teal JM, Howes B, Aubrey D. 1990. Transport of groundwater-borne nutrients from watersheds and their effects on coastal waters. *Biogeochemistry* 10: 177-197.
- Valiela I, Cole ML, McClelland J, Hauxwell J, Cebrian J, Joye SB. 2000. Role of salt marshes as part of coastal landscapes. *En: Weinstein MP, Kreeger DA [Eds.], Concepts and controversies of tidal marsh ecology.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp 23-38.
- Valiela I, Teal JM, Volkman S, Shafer D, Carpenter EJ. 1978. Nutrient and particulate fluxes in a salt marsh ecosystem: tidal exchanges and input by precipitation and groundwater. *Limnology & Oceanography* 23: 798-812.

- Webb AP, Eyre BD. 2004. The effect of natural populations of the burrowing and grazing soldier crab (*Mictyris longicarpus*) on sediment irrigation, benthic metabolism and nitrogen fluxes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309: 1-19.
- Welsh DT. 2000. Nitrogen fixation in seagrass meadows: regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity. *Ecology Letters* 3: 58-71
- Welsh DT, Bartoli M, Nizzoli D, Castaldelli G, Riou SA, Viaroli P. 2000. Denitrification, nitrogen fixation, community primary productivity and inorganic-N and oxygen fluxes in an intertidal *Zostera noltii* meadow. *Marine Ecology Progress Series* 208: 65-77.
- Wheatcroft RA. 1992. Experimental test for particle size-dependent bioturbation in the deep ocean. *Limnology & Oceanography* 37: 90-104.
- Woulds C, Cowie GL, Levin LA, Andersson JH, Middelburg JJ, Vandewiele S, Lamont PA, Larkin KE, Gooday AJ, Schumacher S, Whitcraft C, Jeffreys RM, Schwartz M. 2007. Oxygen as a control on seafloor biological communities and their roles in sedimentary carbon cycling. *Limnology & Oceanography* 52: 1698-1709.
- Yingst JY. 1976. The utilisation of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit feeding Holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 23: 55-69.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. 3rd edn. Prentice-Hall, Englewood Cliff, USA.
- Ziebis W, Forster S, Huettel M, Jørgensen BB. 1996. Complex burrows of the mud shrimp *Callinassa truncata* and their geochemical impact in the sea bed. *Nature* 382: 619-622.