



**WetLands
4CLIMATE**



ENTREGABLE D2.2

INFORME DE SÍNTESIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES DEL SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE AGUA Y SUELO, PRODUCTORES PRIMARIOS Y PARÁMETROS ABIÓTICOS DEL AGUA Y SEDIMENTOS

Septiembre 2024

www.wetlands4climate.eu · info@wetlands4climate.eu



FUNDACIÓN
GLOBAL NATURE



VERDE
efeverde.com

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



ICBiBE
Institut Universitari Cavanilles
de Biodiversitat i Biologia Evolutiva



València
Clima i Energia

CON LA CONTRIBUCIÓN DEL INSTRUMENTO FINANCIERO LIFE DE LA UNIÓN EUROPEA



Contenido

1. Introducción	5
2. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión del agua	7
3. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión de la vegetación	11
4. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión del suelo.....	13
5. Conclusiones	16



Summary

The role of wetlands as carbon sinks and therefore in climate change mitigation has been widely described. The Life Wetlands4Climate project emerges as a pioneering initiative that approaches the management of Mediterranean wetlands with a climate perspective. In this context, the purpose of this synthesis report is to summarize the molecular characterization of the microbial communities of water and soil, as well as of the abiotic parameters of the water and associated sediments in the different wetlands under study set out in deliverable 2.1 which includes the characterization of the structure of the microbial community in the diverse wetlands for the different experimental actions carried out. On the other hand, a wide variety of abiotic variables that characterize the different wetlands studied have been studied, most of these parameters being described in deliverable D2.3. Some of these abiotic parameters are of particular interest in understanding the time-course, diversity, and functional role of microbial taxa in both water and sediments.

Metabarcoding molecular studies allow to characterize the taxonomic composition in samples with complex microbial communities, such as water and wetland sediment. Using massive sequencing (NGS - Next Generation Sequencing) techniques, it is possible to profile and investigate these microbial communities by sequencing the marker gene of choice, being one of the most widely used that encodes for the 16S r-RNA. This analysis includes sampling, DNA extraction, massive sequencing of the V4 region of the 16S rRNA, and the subsequent bioinformatic processing that leads to the taxonomic assignment at various taxonomical levels, this workflow allowing to establish changes in the structure of microbial communities. High-performance sequencing targeting regions evolutionarily preserved in microbial genomes is currently considered the most reliable and cost-effective method of species composition analysis from environmental samples. This summary document is based on deliverable 2.1, where the overall structure of the microbial community has been described in detail for waters and sediments, as well as, more specifically, the relative diversity and abundance of the main families of methanogens and methanotrophs along with their markers, **mcrA** gene that encodes for the "*methyl-coenzyme M reductase alpha subunit*", for methanogenesis and **pmoA** gene that encodes for the "*methane/ammonia monooxygenase subunit A*" for Methanotrophy. Given the complexity of microorganisms involved in aerobic respiration to estimate it, the **CoxL** gene that encodes for the "*aerobic carbon-monoxide dehydrogenase large subunit*" protein has been used being a good proxy for estimating changes in aerobe respiration rates, as well as the **CydA** gene encoding for the protein "*cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I*" as a nice proxy to follow adaptation processes to low oxygen conditions. To estimate the influence of anaerobic processes, we used the **ldhA** genes that encodes for the protein "*D-lactate dehydrogenase*" proxy of the fermentation mixed acid that has as its final product lactate, and the **pflD** gene that encodes for the "*formate C-acetyltransferase*" protein, a good proxy for the mixed acid fermentation that has as its final product formate. Also, the relevance of anaerobic respiration based on the genes **dsrB**, that encodes for the protein "*dissimilatory sulfite reductase beta subunit*" as a good proxy of anaerobic respiration of sulfate, and the **narG** gene encoding for



the proteins "*nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit*", as a good proxy of anaerobic respiration of nitrate, have been estimated.

It has also been described in the synthesis document of the deliverable 1.3 that the overall carbon balance and greenhouse gas emissions depend on the type of wetland, being lower in saline wetlands and higher in freshwater wetlands, especially in coastal areas, where the natural accumulation of organic matter is higher due to its higher productivity. In the deliverable 1.2, the analysis of carbon capture and greenhouse gas (GHG) emissions, mainly CO₂ and CH₄ for the different experimental plots of the different management measures, is compiled and the global warming potential, or GWP, are calculated as resulting from the management actions. In the context set out in deliverable 1.2, the deliverable 2.1 has established the molecular bases of the metabolic processes involved in the emission of greenhouse gases, naming, and quantifying the responsible microorganisms and the genes involved. This greater understanding of the internal processes of wetlands in the emission of greenhouse gases is essential for both understanding the results achieved in the experimental actions and for adapting management actions to the more realistic projections that these knowledge entails.



1. Introducción

El papel de los humedales como sumideros de carbono, y por lo tanto en la mitigación del cambio climático, ha sido ampliamente descrito. El proyecto Life Wetlands4Climate emerge como una iniciativa pionera que aborda la gestión de humedales mediterráneos con una perspectiva climática. En este contexto este informe de síntesis tiene como objetivo resumir la caracterización molecular de las comunidades microbianas de agua y suelo, así como de los parámetros abióticos del agua y sedimentos asociados en los diferentes humedales objeto de estudio establecidas en el entregable 2.1 que incluye la caracterización de la estructura de la comunidad microbiana en los diferentes humedales para las diferentes acciones experimentales llevadas a cabo. Por otro lado, se han estudiado una amplia variedad de variables abióticas que caracterizan los diferentes humedales estudiados, si bien la mayor parte de estos parámetros se describen en el informe D2.3. Algunos de estos parámetros abióticos son de especial relevancia para comprender la evolución y diversidad de las comunidades microbianas tanto en agua como en sedimentos.

Los estudios de moleculares de metabarcoding permiten caracterizar la composición de taxonómica en muestras con comunidades microbianas complejas, como por ejemplo el agua y el sedimento de humedales. Utilizando técnicas de secuenciación masiva (NGS - Next Generation Sequencing) es posible perfilar e investigar estas comunidades microbianas secuenciando el gen marcador de elección, siendo uno de los más usados el que codifica para el ARNr 16S. Este análisis incluye, la toma de muestras, la extracción de DNA, la secuenciación masiva de la región V4 del 16S rRNA y el procesado bioinformático posterior que lleva a la asignación taxonómica en varios niveles taxonómicos, este flujo de trabajo permite establecer los cambios en la estructura de las comunidades microbianas. La secuenciación de alto rendimiento dirigida a regiones conservadas en genomas microbianos se considera en la actualidad como el método más fiable y rentable de análisis de composición de especies de muestras ambientales. Este documento de síntesis se basa en el entregable 2.1, donde se ha caracterizado con detalle, en agua y sedimento, la estructura global de la comunidad microbiana, así como más específicamente la diversidad y abundancia relativa de las principales familias de metanógenos y metanótrofos junto con sus genes marcadores, **mcrA** que codifica para la proteína "*methyl-coenzyme M reductase alpha subunit*" clave para la metanogénesis y **pmoA** que codifica para la proteína "*methane/ammonia monoxygenase subunit A*" clave para la metanotrofia. Dada la complejidad de microorganismos que intervienen en la respiración aerobia para estimarla se ha usado el gen **CoxL** que codifica para la proteína "*aerobic carbon-monoxide dehydrogenase large subunit*" y es un buen proxy para estimar cambios en las tasas de respiración aerobia, así como el gen **CydA** que codifica para la proteína "*cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I*" y es un buen proxy seguir procesos de adaptación a condiciones de bajo contenido en oxígeno. Para estimar la influencia de procesos anaerobios se han usado los genes **ldhA** que codifica para la proteína "D-lactate dehydrogenase" proxy de la fermentación ácido mixta que tiene como producto final lactato y el gen **pflD** que codifica para la proteína "*formate C-acetyltransferase*", buen proxy de la fermentación ácido mixta que tiene como producto final el formiato. También se han estimado la relevancia de respiraciones



anaerobias en base a los genes, ***dsrB*** que codifica para la proteína "*dissimilatory sulfite reductase beta subunit*" que es un buen proxy de respiración anaerobia de sulfato y el gen ***narG*** codifica para la proteína "*nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit* ", buen proxy de respiración anaerobia de nitrato.

Ya se ha descrito, en el entregable de síntesis 1.3, que el balance global de carbono y las emisiones de gases de efecto invernadero dependen del tipo de humedal, siendo por lo general más bajas en humedales salinos, y más elevadas en humedales de agua dulce, sobre todo en zonas costeras, donde la acumulación natural de materia orgánica es mayor debido a su mayor productividad. En el entregable 1.2, se recopilan los análisis relativos a la captura de carbono y a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente CO₂ y CH₄ para las diferentes parcelas experimentales de las distintas medidas de gestión y se calculan los balances del poder de calentamiento, o GWP, sobre el que se estima la variación de la capacidad de mitigación en las lagunas piloto a partir de las medidas de gestión. En el contexto establecido en el entregable 1.2, el entregable 2.1 ha establecido las bases moleculares de los procesos metabólicos implicados en la emisión de gases de efecto invernadero, nombrando y cuantificando a los microorganismos responsables y los genes implicados. Esta mayor comprensión de los procesos internos de los humedales en la emisión de gases de efecto invernadero es esencial para tanto comprender los resultados obtenidos en las acciones experimentales, como para adecuar las medidas de gestión a las proyecciones más realistas que estos conocimientos implican, maximizando el rendimiento de los esfuerzos de las medidas de manejo realizadas a gran escala en el proyecto LIFE para obtener la máxima mitigación de GWP.



2. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión del agua

El nivel de inundación observado en los humedales estudiados determinó los cambios espacio-temporales observados en el intercambio de gases de efecto invernadero (GEI). Se ha monitorizado el efecto del nivel de inundación en la composición de las comunidades microbianas y su diversidad. Los detalles metodológicos del estudio del nivel de inundación se describen con detalle en el entregable A3.2: brevemente, se caracteriza el agua y sedimento de 4 puntos de cada humedal, 1) punto cercano al de máxima inundación y con lámina de agua 2) punto donde la lámina sea muy fina (uno o pocos centímetros), 3) suelo húmedo sin lámina de agua y 4) sedimento seco. Estos cuatro puntos se pueden asociar a las diferentes fases del hidropereodo en humedales temporales, al proceso de desecación de un humedal con problemas hídricos (por factores climáticos o acción antrópica directa de desecación) o el caso contrario la inundación artificial y continua de humedales temporales que, en condiciones naturales, tendrían que experimentar una desecación estival.

Lagunas no salinas de interior.

Lagunas de Boada y la Nava.

Como se puede comprobar en el entregable 1.2, estas lagunas mostraron una producción de metano entre baja y moderada, con un papel principal del CO₂ con respecto al balance de capacidad de calentamiento o GWP. En general, y comparado con otras tipologías de lagunas estudiadas, los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en función del gradiente de inundación no fueron muy intensos. En la laguna de Boada las familias más relevantes y abundantes en el gradiente de inundación fueron Sphingomonadaceae, Nocardiodaceae, Desulfocapsaceae, Rhodobacteraceae, Anaerolineaceae, Micrococcaceae, Syntrophobacteraceae y Bacillaceae mientras que en la laguna de La Nava fueron Bacillaceae, Anaeromyxobacteraceae, Anaerolineaceae, Pedosphaeraceae y Comamonadaceae las especies de estas familias forman la comunidad base del sedimento de estos humedales.

En cuanto a grupos menos abundantes, pero con gran relevancia en el metabolismo del carbono, no se observaron cambios importantes en la abundancia relativa de metanógenos y metanótrofos (ni en la inferencia de sus genes asociados) en los diferentes puntos monitorizados en el gradiente de inundación. Las familias de metanógenos con mayor abundancia relativa fueron Methanobacteriaceae, Methanocellaceae y Methanosarcinaceae. y de metanótrofos Beijerinckiaceae y Methyloligellaceae. La tendencia fue a un aumento de metanógenos en profundidades medias y máximas, coincidiendo con el aumento de genes



inferidos asociados a la fermentación y a respiraciones anaerobias como la del nitrato, así como el descenso de genes asociados a la respiración aerobia como el **coxL**. Esto explica que las emisiones de GEI que generan GWP tiendan a incrementarse con el descenso del nivel de agua y el secado de la cubeta principalmente por el incremento de la respiración aerobia frente a metabolismos anaerobios como la metanogénesis, sin la que la competencia con la sulfato-reducción fuera evidente en estas lagunas. Estos patrones estuvieron sujetos además a una dinámica estacional en algunos casos muy marcada, en la que, sobre todo en el flujo de emisión de metano, se vio un aumento de este flujo en los periodos más cálidos, principalmente debido al aumento de la tasa de metanogénesis frente a la metanotrofia, y no al aumento de la abundancia relativa de metanógenos.

Lagunas salinas de interior.

Lagunas de Alcahozo, Tírez, Manjavacas y la Grande de Villafranca.

Una de las principales conclusiones obtenidas respecto a la emisión de gases de efecto invernadero de estas lagunas es que, en comparación con el resto de los tipos monitorizados, presentaron unos flujos de emisión de gases mucho más bajos, tanto los de CO₂, como particularmente los de CH₄, uno y dos órdenes de magnitud por debajo de los esperados en sistemas similares, pero de agua dulce. Esto limita su poder de generación de calentamiento, pero, sin embargo, mostraron patrones de emisión similares a los de otros tipos de humedales, con flujos de CO₂ mayores en zonas no inundadas, o emisiones de metano maximizadas en la interfase húmedo-encharcado y de aguas medias.

Los datos moleculares mostraron que lagunas mejor conservadas, como Alcahozo y Tírez, las familias con mayor abundancia relativa fueron *Babeliaceae*, *Balneolaceae*, *Nodosilineaceae* y *Rhodobacteraceae* siendo la comunidad base que caracteriza este tipo de laguna. La abundancia relativa de metanógenos fue muy baja, en el límite de detección por metabarcoding, observándose solo la familia *Methanospirillaceae* en Tírez y *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanomassiliicoccaceae* y *Methanobacteriaceae* en Alcahozo, cuyo patrón de abundancia relativa coincide con lo esperado en función de los flujos de emisión de metano. Además, el incremento de la sulfato-reducción (gen **dsrB**) con el nivel de inundación en la laguna de Alcahozo estuvo asociado al descenso de flujos de emisión de metano con mayor inundación. Los cambios en la comunidad de metanótrofos (familias *Beijerinckiaceae*, *Methylococcaceae* y *Methyloligellaceae*) en el gradiente de inundación fueron poco relevantes.

La laguna de Manjavacas presentaba alteración trófico-hidrológica y la laguna Grande de Villafranca presentaba alteración hidrológica. Ambas lagunas se comportaron de un modo diferente a las mejor conservadas de Tírez y Alcahozo. Respecto a la comunidad microbiana, las familias más abundantes en todos los puntos del gradiente de inundación fueron, en Manjavacas, *Balneolaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Bacillaceae*, y *Geminicoccaceae* y en la laguna Grande de Villafranca, *Bacillaceae*, *Anaerolineaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Woeseaceae* y *Desulfosarcinaceae*. Ambas lagunas presentaron además agrupaciones de familias específicas de cada punto de gradiente lo que implica un mayor impacto de este gradiente en la estructura de la comunidad microbiana, comparado con las mejor conservadas como Alcahozo y Tírez.



Las lagunas de Manjavacas y Grande de Villafranca mostraron, además, un incremento significativo de la abundancia relativa de metanógenos dentro del gradiente de inundación para las profundidades medias y máximas. En Manjavacas se observaron principalmente dos familias, *Methanobacteriaceae*, y *Methanosarcinaceae*, mientras que en la laguna Grande de Villafranca la diversidad fue mayor, ya que se encontraron un total de 7 familias diferentes, *Methanobacteriaceae*, *Methanofastidiosaceae*, *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanosarcinaceae* y *Methanospirillaceae*. Este incremento en la abundancia relativa de metanógenos se vio asociado, en el caso de la Grande de Villafranca, a un descenso de metanótrofos, principalmente de las familias *Methyloligellaceae*, *Methylacidiphilaceae*, *Methylomirabilaceae*, *Methylococcaceae* y *Methylomonadaceae*. Dicho descenso está asociado a máximos de emisión de metano encontrados en el punto de media profundidad visto en el entregable 1.3., mientras que el antedicho incremento de metanógenos suponía un incremento en la abundancia relativa del gen *mcrA* (proxy de la metanogénesis) en la laguna Grande de Villafranca. En el caso de la Laguna de Manjavacas estaba asociado a un incremento en la tasa metabólica, al tener más carbono disponible debido a la alteración trófica de esta laguna. En general se observaron pocas diferencias en el gradiente de inundación de genes asociados a las respiración aerobia (*coxL* y *cydA*) mientras que dominaron metabolismos fermentativos y respiraciones anaerobias con tendencia a incrementarse en profundidades medias y altas.

Lagunas costeras

Los humedales costeros se caracterizan por una hidrología variable y, a menudo, regulada, respecto a la emisión de gases de efecto invernadero y su poder de calentamiento. En el entregable 1.3 se confirmó que los niveles bajos de inundación podrían incrementar de forma significativa tanto la emisión de CO₂ y CH₄ como, en consecuencia, generar más poder de calentamiento. También se indicaba que de manera natural estos humedales generan GEI que son liberados a la atmósfera, si bien la intensidad de esta liberación podría ser controlada o minimizada mediante medidas de gestión adecuadas, en este caso las referidas al control del nivel de inundación.

En general, se ha observado que la comunidad microbiana fue muy diversa en función del humedal costero, con cambios importantes tanto entre humedales como en el gradiente de inundación. En el marjal de Prat de Cabanes-Torreblanca, las familias con una mayor abundancia relativa en todo el gradiente de inundación fueron *Saprospiraceae*, *Thermoanaerobaculaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Desulfosarcinaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Anaerolineaceae*. En la mallada de la Mata del Fang, las familias más abundantes en todo el gradiente fueron *Anaerolineaceae*, *Spirochaetaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Pedosphaeraceae*, *Pirellulaceae* y *Bacteroidetes*. En el Marjal dels Moros las familias más abundantes en el gradiente de inundación fueron *Desulfosarcinaceae*, *Anaerolineaceae*, *Bacillaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Desulfatiglandaceae*, *Geminicoccaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sandaracinaceae* y *Desulfobulbaceae*. En el marjal de Pego-Oliva las familias más abundantes en el gradiente de inundación fueron *Hydrogenophilaceae*, *Anaerolineaceae*, *Desulfosarcinaceae*, *Geminicoccaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Bacteroidetes* y *Desulfobulbaceae*. Se



observó además un patrón común con agrupaciones específicas claras de familias específicas en los extremos seco-Húmedo y profundidad máxima

En lo referente al potencial para la generación de emisiones de metano, en general, la abundancia relativa y la diversidad de metanógenos fue más alta que en el resto de las tipologías estudiadas. Se observó un patrón general común, con un incremento importante y significativo tanto de la abundancia relativa de metanógenos como del gen marcador de la metanogénesis (*mcrA*) a medida que se incrementa la lámina de agua. Este fue un patrón inverso al observado en las emisiones de CH₄, en este tipo de humedales, lo que se entiende en la medida en que los flujos son el resultado de una interacción compleja entre la abundancia de metanógenos, su actividad, y las tasas de consumo por parte de los metanótrofos que consumen el metano antes de su salida a la atmósfera. En este sentido las emisiones de gases de efecto invernadero en humedales costeros son muy dinámicas y complejas, por lo que la buena gestión de estos humedales viene dada por lo bien que conozcamos todos los factores que intervienen en su dinámica. En paralelo al incremento de la abundancia relativa de metanógenos (familias *Methanomicrobiaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanofastidiosaceae* y *Methanospirillaceae*), en profundidades medias y máximas del gradiente también aumentó la relevancia relativa de las respiraciones anaerobias como la sulfato-reducción, que en estos ambientes compiten directamente con la metanogénesis y por lo tanto puede limitarla: Además se incrementó la abundancia relativa de metanótrofos en agua y sedimento (familias *Methyloligellaceae*, *Methylomonadaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Methylomirabilaceae* y *Methylacidiphilaceae*), con un efecto más importante cuanto mayor fue la profundidad de la columna de agua. Todo esto implica que pese al incremento de metanógenos en la cubeta los flujos permanecieran bajos, al disminuir mucho la columna de agua o se cuándo se retira completamente, la oxidación del sedimento superficial reduce la competencia entre metanogénesis y sulfato-reductores, y además la pérdida de lámina de agua elimina la principal causa de metanotrofia (los metanótrofos de la columna de agua), por lo que se produce un fuerte incremento de las tasas de emisión como se ha reflejado en el entregable 1.3. Respecto al patrón de emisiones de CO₂ que es muy similar al de metano, parecía estar asociado directamente a un ambiente más reductor y anaerobio a medida que se incrementó la lámina de agua, como lo indica el descenso, muy importante y significativo, del proxy de respiración aerobia (*coxL*) asociado al nivel de inundación para todos los humedales costeros, potenciándose respiraciones anaerobias, como la del sulfato y las fermentaciones. Es importante tener en cuenta todos estos factores en la gestión de estos humedales con un enfoque a minimizar las emisiones de gases de efecto invernadero.



3. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión de la vegetación

El entregable 1.2 muestra que la siega estacional, posterior recrecimiento y gestión secundaria de la biomasa de distintas especies de helófitos en los diferentes humedales ensayados es una de las acciones de gestión más eficientes a la hora de maximizar la retención de carbono por parte de un humedal. Se han caracterizado el comportamiento asociado a la siega para varias especies de helófitos emergentes de porte medio y alto como la castañuela (*Bolboschoenus maritimus*), el carrizo (*Phragmites australis*) y la enea (*Typha* sp.). Estos helófitos muestran altas tasas de crecimiento, pudiendo recuperar completamente la biomasa tras la siega. En general estas acciones experimentales no afectaron en gran medida a las variables abióticas del agua ni del sedimento. Los únicos cambios relevantes, con un marcado efecto estacional se observaron en el Eh' (potencial de oxidación-reducción) del sedimento, con una ligera tendencia, no siempre significativa, a valores más oxidativos en las parcelas experimentales. Dado que la acción experimental de siega no produce importantes cambios en los parámetros abióticos de agua y sedimento, los cambios en las comunidades microbianas y sus metabolismos vendrán dados, principalmente, por la actividad en la rizosfera en las diferentes fases de crecimiento tras la siega, que puede afectar a la microbiota propia de las raíces y, por extensión a la del sedimento.

1. Efecto de la siega en las comunidades microbianas

Se realizaron experimentos de siega en distintos humedales piloto evaluando los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en función del potencial de reducción del poder de calentamiento en distintos tipos de vegetación. En el entregable 1.2 se demostró que la siega estacional de helófitos produce reducciones significativas del poder de calentamiento, asociado a unas mayores tasas de fijación de carbono y disminuyendo emisiones de GEI. Tanto las zonas experimentales segadas como las zonas control actuarían como sumideros, no obstante, la siega mejora dicha situación, incrementando la capacidad de mitigación por secuestro de carbono para las especies vegetales analizadas (*Bolboschoenus maritimus*, *Carex divisa*, *Phragmites australis*, *Scirpus lacustris*, y *Typha* sp.).

Aunque se observaron cambios en la estructura de la comunidad microbiana entre los tratamientos control y experimental (siega), las diferencias no implicaron grandes cambios en dicha estructura ni en los principales metabolismos asociados a las emisiones de gases de efecto invernadero. En las diferentes lagunas las comunidades microbianas fueron similares a



las encontradas en el gradiente de agua, principalmente al punto Húmedo-Encharcado del gradiente de inundación.

Se observó en general una tendencia a un mayor protagonismo de la metanotrofia (incremento tanto en número y diversidad de metanógenos como de la abundancia relativa del gen *pmoA*) y un descenso de la metanogénesis (descenso de la a abundancia relativa de metanógenos y del gen *mcrA*) en las parcelas experimentales segadas respecto a los controles sin acción de siega, lo que implicó una disminución en las tasas de emisión de metano. Estos efectos se maximizaron a largo plazo, siendo más evidentes entre los 6 meses y un año. Los cambios en las tasas de respiración aerobia, fermentaciones o respiraciones anaerobias fueron poco relevantes. Las variaciones en las comunidades microbianas y metabolismos asociados a la emisión de gases invernadero mostraron tendencias más evidentes en los humedales costeros que en las lagunas salinas y no salinas de interior.

2. Efecto del pastoreo en las comunidades microbianas

El estudio del efecto de la acción experimental de pastoreo en las comunidades microbianas se realizó en las lagunas de La Nava, la Marjal de Prat de Cabanes-Torreblanca y la Marjal de Pego-Oliva. El pastoreo afectó de manera muy significativa a la estructura de la comunidad microbiana tanto del agua como del sedimento en la Marjal de Pego-Oliva. En general las parcelas pastoreadas presentaron valores de Eh' más reductores, con fuertes incrementos del porcentaje de materia orgánica, debido a los aportes de excrementos. En este contexto se intensificó los metabolismos anaerobios incrementándose principalmente, la metanogénesis, fermentaciones y respiraciones anaerobias. En general el pastoreo bovino tuvo un efecto muy marcado en la estructura y función de la comunidad microbiana implicando un aumento de emisiones de gases de efecto invernadero, sobre todo si este pastoreo es muy intenso y está limitado a áreas pequeñas como en el caso de la Marjal de Pego-Oliva. El resto de los humedales no tienen asociadas muestras de agua al estar secos, y el efecto del pastoreo, menos intenso, sobre el sedimento, fue poco significativo. Por ejemplo, en la laguna de La Nava las familias con mayor abundancia relativa *Xanthobacteraceae*, *Nitrososphaeraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Entotheonellaceae*, *Pedosphaeraceae*, *Microscillaceae*, *Bacillaceae* y *Chitinophagaceae*, no mostraron diferencias significativas en su abundancia entre parcelas control y experimental. Sin embargo, algunas familias menos abundantes se incrementaron en las parcelas experimentales como *Defluviicoccaceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Anaerolineaceae*, o *Rubrobacteriaceae*, mientras que otras familias vieron descender su abundancia relativa como *Micromonosporaceae*, *Gemmatimonadaceae* o *Comamonadaceae*.



4. Respuesta de los parámetros abióticos y las comunidades microbianas a la gestión del suelo

En el proyecto se han evaluado dos medidas de gestión (respecto al suelo/sedimento) enfocadas a la mitigación climática por parte de los humedales mediterráneos, el decapado y el fangueo. Los resultados del proyecto mostraron que estas acciones son favorables para la mitigación de emisiones de GEI, aunque muy asociados al contexto o características de cada humedal. Como se puede comprobar en el entregable 1.2, tanto el decapado como el fangueo del sedimento fueron beneficiosos para reducir las emisiones de GEI y su GWP. La reducción de emisiones de gases de efecto invernadero asociadas al decapado, que implica la eliminación de la materia orgánica acumulada, fue de 2 a 3 veces mayores que en el fangueo, que implica la aireación del sedimento, pero no su retirada. En general ambas medidas produjeron cambios muy relevantes tanto en la estructura como en diversidad de las comunidades microbianas, afectando a medio y largo plazo a la abundancia relativa inferida de genes clave en las principales rutas metabólicas asociadas a al metabolismo del carbono y por lo tanto afectando potencialmente a las emisiones de gases de efecto invernadero.

1. *Efecto del decapado en las comunidades microbianas*

El estudio del efecto de la acción experimental de decapado en las comunidades microbianas se realizó en 5 de las 9 lagunas estudiadas, las lagunas de Boada, Manjavacas, Grande de Villafranca, la Marjal de Prat de Cabanes-Torreblanca y la Marjal de Pego-Oliva. La acción de decapado implica la eliminación completa de la capa de sedimento superficial más orgánica, lo que lleva implícito la eliminación total de las comunidades microbianas asociadas a ese sedimento superficial, incluidas las poblaciones de microorganismos asociados a metabolismos del ciclo del carbono. En general la premisa inicial se corroboró, aunque las poblaciones por debajo del punto de decapado fueron en general muy similares y los principales cambios poblacionales se observaron en familias baja abundancia relativa en ocasiones con una gran relevancia en su función metabólica en el sedimento. Los resultados mostraron como estas poblaciones del sedimento profundo expuestas a la superficie evolucionaron y se reajustaron en cada humedal a las nuevas condiciones ambientales, por ejemplo, la disminución de la materia orgánica (y un potencial redox menos negativo) se asoció a una disminución de metanógenos y a metabolismos más oxidativos principalmente a corto plazo (entre 1 y 3 meses), mientras que a largo plazo (aproximadamente 1 año) estos efectos se vieron perturbados por la nueva entrada de sedimentos superficiales desde los bordes de las parcelas.



En la laguna de Boada las familias con mayor abundancia relativa como *Anaerolineaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sphingomonadaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Nocardiodaceae* y *Flavobacteriaceae* no presentaron cambios muy relevantes ni en los diferentes tiempos ni entre las parcelas control y experimental, sin embargo, varias familias desaparecen tras el decapado como *Microscillaceae*, *Comamonadaceae*, *Bacteroidetes*, *Steroidobacteraceae* y *Saprospiraceae* entre otras. En las lagunas salinas de interior, Manjavacas y La Grande de Villafranca los cambios tras el decapado son menos evidentes en las familias mayoritarias, aunque si se observaron diferencias en familias como *Halomonadaceae*, *Idiomarinaceae*, *Saprospiraceae*, *Haloferaceae* y *Exiguobacteraceae* en la laguna de Manjavacas, y de las familias *Thermoanaerobaculaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Anaerolineaceae* o *Chromatiaceae* en la laguna Grande de Villafranca. En las lagunas costeras los cambios tras el decapado también son menos marcados en las familias mayoritarias, aunque si se observaron diferencias en familias minoritarias como *Thermoanaerobaculaceae*, *Defluviicoccaceae*, *Bacteroidetes*, *Calditrichaceae* o *Sandaracinaceae*, y además las diferencias entre las parcelas control y experimental fueron menos relevantes.

El proceso de decapado produjo un descenso significativo de diversidad y abundancia relativa de metanógenos, principalmente las familias *Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae* y *Methanoregulaceae*, en las parcelas experimentales de la Laguna de Manjavacas y de la Laguna Grande de Villafranca y las familias *Methanomicrobiaceae*, *Methanoregulaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanobacteriaceae* y *Methanospirillaceae* en los humedales costeros. Sin embargo, en ningún caso se observaron diferencias muy significativas entre control y decapado en la abundancia relativa de metanótrofos, cuyas principales familias fueron *Beijerinckiaceae*, *Methyloligellaceae* y *Methylacidiphilaceae*. En las lagunas no salinas de interior, sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la abundancia relativa de metanógenos. Al exponer los sedimentos a la superficie tras el decapado se observó un ligero incremento de la respiración aerobia (gen **coxL**), salvo cuando partimos de sedimentos muy reductores y orgánicos como los de la Laguna de Manjavacas. La respiración aerobia aumentó en los humedales costeros y la laguna de Boada, principalmente en torno a los 6 meses de la acción experimental, lo que implicó que se produjera un aumento de la actividad aerobia en los suelos decapados. Salvo casos puntuales, no se observaron importantes diferencias entre controles y decapados para los metabolismos fermentativos y respiraciones anaerobias (ligero aumento en los humedales costeros).

2. Efecto del fangueo en las comunidades microbianas

El monitoreo del efecto de la acción experimental de fangueo en la composición y diversidad de las comunidades microbianas se realizó en las lagunas de la Nava y Boada, Laguna de Manjavacas, Laguna Grande de Villafranca, la Marjal de Prat de Cabanes-Torreblanca y la Marjal de Pego-Oliva. El proceso de fangueo supone la homogeneización de las comunidades microbianas en toda la profundidad de fangueo. Este proceso produjo un cambio importante en algunos parámetros abióticos, ya que se airea y oxigena el sedimento, influyendo en el pH y el potencial Redox (Eh), y en función del gradiente vertical también se observaron cambios en el contenido medio de materia orgánica. Este efecto está muy asociado al momento en que se produce el fangueo, ya que con el transcurso del tiempo las condiciones del sedimento tienden



a condiciones previas y por lo tanto también lo hacen las comunidades microbianas y sus metabolismos asociados. Esto se pudo observar en los resultados obtenidos de la estructura, función y diversidad de la comunidad microbiana. Al igual que se observó en la acción de decapado, las familias con una mayor abundancia relativa (estas familias son, principalmente, las mismas descritas en la sección de decapado), y que forman la base de la comunidad microbiana, no sufren importantes cambios tras el proceso de fangueo, siendo los cambios más relevantes cambios estacionales que ocurren tanto en las parcelas control como en las parcelas experimentales. Las principales diferencias se observaron en familias con abundancias relativas menores pero asociadas a metabolismos concretos que pueden ser de gran interés en términos de emisiones de GEI. Estas diferencias se observaron principalmente en los tiempos inmediatamente posteriores al fangueo, así como a medio plazo entre 3-6 meses. En concreto estos cambios se vieron en las familias *Rubrobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Geminococcaceae* o *Nitrospheraceae* en la laguna de Boada, las familias *Caulobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Instransporangiaceae* o *Beijerinckiaceae* en la laguna de la Nava, las familias *Haloferaceae*, *Calanaerobacter*, *Ectothiorodospiraceae* o *Bacteroidetes*, en la laguna de Manjavacas, las familias *Spirochaetaceae*, *Bacteroidetes*, *Lentimicrobiaceae*, *Desulfatiglandaceae*, *Desulfocapsaceae* o *Prolixibacteraceae* en la laguna Grande de Villafranca o las familias *Sandaracinaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *K189Aclade*, *Kiloniellaceae*, o *Rhizobiaceae* en la marjal de Prat de Cabanes-Torreblanca.

Se vio un patrón general en las acciones de fangueo realizadas en las diferentes lagunas y humedales estudiados. El mayor efecto se observó a medio plazo, en torno a los 6 meses de la acción experimental, asociado a cambios la abundancia relativa de genes implicados en procesos clave de respiración aerobia, de metanogénesis, de metanotrofia, de fermentaciones y de respiraciones anaerobias como la del sulfato y nitrato. El proceso de fangueo incrementó la abundancia relativa del gen proxy de la respiración aerobia **coxL** que se mantuvo a los 3 y 6 meses del fangueo. Este incremento vino asociado a un descenso de los genes clave asociados a fermentaciones y respiraciones anaerobias. Este patrón general, más o menos marcado en función de cada laguna en particular, ocurrió en todas las tipologías estudiadas, lagunas no salinas de interior, lagunas salinas de interior y humedales costeros. Sin embargo, solo en los humedales costeros se observaron descensos de la abundancia relativa de metanógenos asociadas a descensos de la abundancia relativa del gen **mcrA**.



5. Conclusiones

Todas las acciones experimentales ensayadas tuvieron, en mayor o menor medida, efecto sobre la comunidad microbiana global. En general, con impactos puntuales, las familias con mayor abundancia relativa en cada laguna son estables respecto a las acciones experimentales, por el contrario, los mayores efectos se observaron en familias y agrupaciones de familias específicas asociadas a metabolismos concretos. La intensidad del efecto de cada acción experimental en la abundancia relativa de los microorganismos asociados a los metabolismos que están directamente involucrados en las emisiones de gases de efecto invernadero, asociados al ciclo del carbono CO_2 y CH_4 , no fue igual en todas las acciones experimentales realizadas. En concreto, se realizaron tres diferentes acciones experimentales, acciones de gestión de agua (diferentes niveles de inundación), acciones de acciones de vegetación (siega y pastoreo) y acciones de suelo (decapados y fangueos).

Respecto a los estudios de la influencia del nivel de inundación en la capacidad de secuestro de carbono se observaron marcadas diferencias en los parámetros abióticos estudiados asociados principalmente al grado de hidratación del sedimento y a la existencia permanente o estacional de lámina de agua, influyendo sobre todo en variables como el potencial redox de los sedimentos o su contenido en materia orgánica. Esto provocó diferencias en la composición de las comunidades microbianas, especialmente en aquellas asociadas a metabolismos de carbono. Aunque se observaron importantes diferencias en función del tipo de humedal, el patrón general conduce a un incremento de la metanogénesis cuando hay aguas más profundas, pero, según el tipo de humedal, esto se vio modulado por las condiciones del sedimento, como el potencial redox y porcentaje de materia orgánica, y por la interacción de otros metabolismos como la metanotrofia de la columna de agua o la competición con metabolismos anaerobios como la sulfato reducción. Todo ello implica el flujo final de metano sea un balance complejo y multifactorial del que hemos conseguido elucidar sus principales componentes permitiendo mejores aproximaciones y modelización para los tipos de humedales estudiados.

Las acciones experimentales asociadas a la vegetación no tuvieron como consecuencia grandes cambios en la estructura de la comunidad microbiana global, ni en los principales metabolismos asociados a las emisiones de gases de efecto invernadero. Las variaciones en las comunidades microbianas y metabolismos asociados a la emisión de gases invernadero mostraron tendencias más evidentes en los humedales costeros que en las lagunas salinas y no salinas de interior, observándose una tendencia al incremento de la metanotrofia y un descenso de la metanogénesis en las parcelas experimentales, efectos más evidentes a largo plazo. Los cambios en los genes inferiores asociados a la respiración aerobia, fermentaciones o respiraciones anaerobias fueron poco relevantes.

Respecto a las acciones experimentales asociadas al suelo, el decapado implicaba la eliminación de la capa superficial de sedimento. Esta acción produjo cambios relevantes en algunas variables abióticas, como el potencial Redox y el contenido en materia orgánica. Los resultados mostraron un patrón general común, en el que la la comunidad microbiana por debajo del punto de decapado fue similar a la decapada y los principales cambios poblacionales se observaron en familias baja abundancia relativa, pero, en general, con una gran relevancia en su función metabólica en el sedimento. Los resultados mostraron como estas poblaciones del sedimento profundo



expuestas a la superficie evolucionaron y se reajustaron en cada humedal a las nuevas condiciones ambientales. Por ejemplo, la disminución de la materia orgánica se asoció a una disminución de metanógenos y a metabolismos más oxidativos como el incremento de la respiración aerobia, principalmente a corto plazo, mientras que a largo plazo estos efectos se vieron perturbados por la nueva entrada de sedimentos superficiales desde los bordes de las parcelas. En general, no se observaron importantes diferencias entre controles y decapados para los genes inferidos asociados a los metabolismos fermentativos y respiraciones anaerobias.

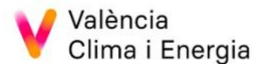
Por otro lado, el proceso de fangueo produce una mezcla de poblaciones estratificadas en la profundidad de fangueo, así como cambios en variables abióticas que definen qué comunidades, y por lo tanto qué metabolismos, se desarrollan a partir del momento de fangueo. El fangueo airea y oxigena el sedimento influyendo en el pH y el potencial Redox, y este efecto es muy inmediato y puntual al momento en que se produce el fangueo. Se observó un patrón general en las acciones de fangueo, donde el principal efecto observado en la estructura de la comunidad microbiana se vio a medio plazo, asociado a cambios la abundancia relativa de los principales microorganismos y genes implicados en procesos clave de la respiración aerobia, de la metanogénesis, de la metanotrofia, de fermentaciones y de respiraciones anaerobias. El proceso de fangueo incrementó el potencial para la respiración aerobia, que se mantuvo a medio plazo, como evidencia la abundancia relativa de genes inferidos respectivos. Este incremento vino asociado a un descenso de fermentaciones y respiraciones anaerobias. Los cambios en las poblaciones de metanógenos y metanótrofos fueron menos evidentes, y solo se observaron descensos de la abundancia relativa de metanógenos en fangueos de humedales costeros.



WetLands 4CLIMATE

www.wetlands4climate.eu | info@wetlands4climate.eu

Socios:



Cofinanciadors:



CON LA CONTRIBUCIÓN DEL INSTRUMENTO FINANCIERO LIFE DE LA UNIÓN EUROPEA



Las opiniones y documentación aportadas en esta publicación son de exclusiva responsabilidad del autor o autores de los mismos, y no reflejan necesariamente los puntos de vista de la Comisión Europea.