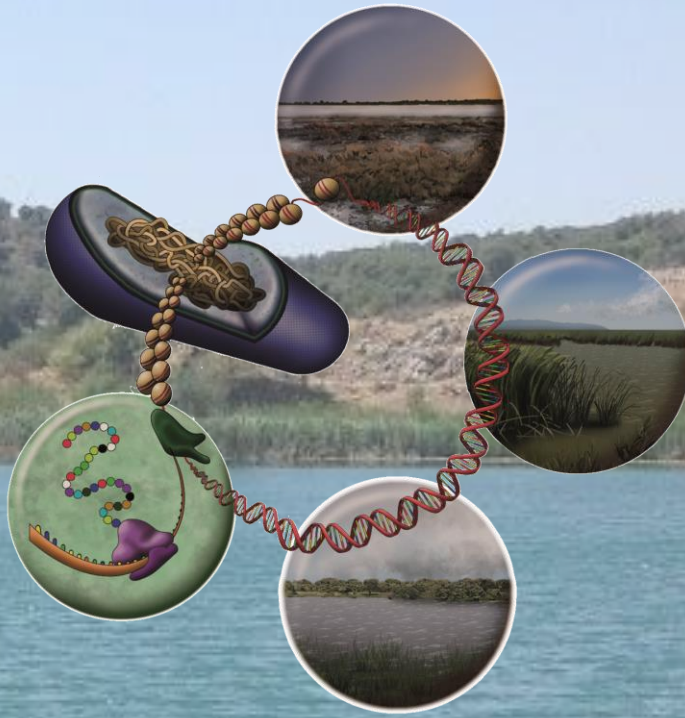


Tesis doctoral

Patrones estructurales y funcionales de las comunidades de procariotas en humedales mediterráneos y su relación con el ciclo del carbono



Javier Miralles Lorenzo

Directores

Dr. Antonio Camacho González

Dr. Antonio Picazo Mozo



ICBiBE
Institut Universitari Cavanilles
de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

Programa de doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

València, febrero 2023

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

VNIVERSITAT  VALÈNCIA **ICBiBE**
Institut Universitari Cavanilles
de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

*PATRONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS
COMUNIDADES DE PROCARIOTAS EN HUMEDALES
MEDITERRÁNEOS Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DEL CARBONO*

Tesis Doctoral

Javier Miralles Lorenzo

Directores: Dr. Antonio Camacho González
Dr. Antonio Picazo Mozo



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

València, febrero de 2023

Tesis Doctoral con Título: " **PATRONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS COMUNIDADES DE PROCARIOTAS EN HUMEDALES MEDITERRÁNEOS Y SU RELACIÓN CON EL CICLO DEL CARBONO**", realizada por **Javier Miralles Lorenzo** para obtener el título de Doctor en Biodiversidad y Biología Evolutiva, supervisada por el **Prof. Dr. Antonio Camacho González**, Profesor Catedrático de Ecología, Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universitat de València), y por el **Dr. Antonio Picazo Mozo**, investigador de l'Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de la Universitat de València.

En Valencia a 15 de febrero de 2023.

Firmas



Antonio Camacho González



Antonio Picazo Mozo



Javier Miralles Lorenzo

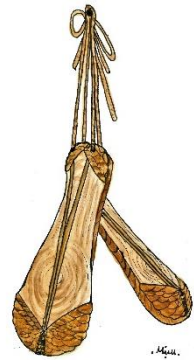
Financiación

Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas obtenidas por el candidato Javier Miralles Lorenzo: una **ayuda FPU**: *Ayudas para la Formación de Profesorado Universitario*, ref. FPU15/03930; *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2015*), con un contrato en la Universitat de València (16/10/2016-15/03/2021), y una **ayuda para la movilidad** (*Ayudas a la movilidad para estancias breves y traslados temporales*, ref. EST18/00391. *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, 2018*) para una estancia de tres meses en el Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA) (01/03/2019-31/05/2019).

Este trabajo fue financiado por el MINECO y la Agencia Estatal de Investigación del Gobierno de España mediante los proyectos CLIMAWET (CGL2015-69557-R), cofinanciado a través de los fondos europeos FEDER, y CLIMAWET-CONS (PID2019-104742RB-I00), ambos concedidos al Prof. Dr. Antonio Camacho González.

Foto de la portada: Dr. Carlos Rochera. **Dibujo de la portada:** Dr. Ángel Gálvez.
Composición de la portada: Dr. Eric Puche.

Al iaio Pepe



En esta vida s'ha de patir un poquet

Iaio Pepe

Agraïments

Bé, per fi pareix que ja hem arribat a l'última parada del doctorat i sense que descarrile el tren. Este procés d'aprenentatge, tan a nivell personal com professional, ha sigut gràcies a l'ajuda inestimable i al suport de moltes persones que m'he trobat al llarg del camí, i a les quals done les gràcies per haver-me acompanyat durant estos anys. Primerament, voldria agrair al meu codirector, Toni Camacho, per haver-me rebut al laboratori de Limnologia de l'ICBiBE i per haver confiat en mi el suficient com per a acceptar-me com a doctorand. D'altra banda, voldria donar-li les gràcies al meu altre codirector, Antonio Picazo, per haver fet pràcticament de segon pare durant tots estos anys. Vaig entrar al doctorat més verd que una ceba, i et done mil gràcies per haver-me ensenyat tantes coses, tan a nivell professional com personal, per aguantar els meus mal rotllos, per haver-me ajudat a madurar com a investigador i per haver-me provocat tants atacs de riure. Això sí, amb el SigmaPlot no hi ha manera xe, no puc amb ell per molt que ho hages intentat jeje. També vull donar les gràcies als meus companys de laboratori, de mostrejors, de viatges amb cotxe i de moltes rialles. Gràcies Carlos per haver estat sempre darrere i donant-me suport. M'has ensenyat limnologia, però sobretot m'has ensenyat molta música amb frases lapidàries com que el *heavy metal* és la burgesia del rock i que *enlerta* que em pilles escoltant-ne, o que la prova que Deu no existix és que no m'havia caigut un raig quan vaig dir que els Ramones cantaven mal (sí, ara soc conscient de la barbaritat que vaig dir). L'altre company d'alegries i penes ha sigut el ja Dr. Daniel Morant. Què puc dir-te Dani? Sempre has estat ahi, donant-me suport en esta muntanya russa que és el doctorat. Moltes gràcies per estar sempre present per a tot. També voldria donar les gràcies a tots els companys i amics que he fet al Cavanilles, sou una de les millors coses que m'enduc del doctorat. D'altra banda, tot el que he après no hauria estat possible sense les estades doctorals que he fet.

Gràcies Emilio per haver-me rebut al teu grup d'investigació i haver-me introduït en el món de l'R i dels ZOTUs des de zero. Vull agrair especialment el suport rebut durant la meua estada a Girona a Carles i a Àlex, que em van tractar com una persona més del seu grup. També vull agrair a la meua parella de xicones grecollatines preferida, per haver-me acollit en Girona com si fora un amic de tota la vida i haver-me ajudat a sentir-me bé i feliç durant eixos 4 mesos pegant voltes per eixa ciutat tan bonica. En especial, voldria agrair a Eliza per haver-me fet sentir com si estiguera en casa i per haver-me convidat a tot el que feia, des de festes amb ous bullits (Χριστός Ανέστη) a escapades de camp (i d'ací poc a un casament). Ευχαριστώ. Ara venen els amics, què seria de mi sense vosaltres. A Jose, per haver-me donat suport i consells informàtics. A Eric, per haver-me acompanyat des dels 16 anys en batxillerat, carrera, màster i doctorat. Has sigut un pilar per a mi, i espere que ho sigues durant molt de temps més. T'estime. A les biòlogues de la carrera, mira que ens hem rist. Pareix ser que el riure m'acompanya en la vida allà on vaig, i done gràcies per això, sobretot si és degut a moments bons amb persones com vosaltres. En especial, vull donar-li les gràcies a Marta. No sé què dir-te, signifiqués tant per a mi, sols espere que sigues conscient de la meua estima. Finalment, voldria agrair a la meua família per els anys tan bons que m'han donat. Vull donar les gràcies a la meua germana i sobretot als meus pares. Sempre heu estat on havíeu d'estar, moltes voltes amb molt d'esforç, i ara que ja soc major comence a entendre-ho i a valorar-ho. Moltes gràcies per tot el que heu fet i per tot el que vindrà i que compartirem, vos estime moltíssim. I per últim, vull donar les gràcies al iaio Pepe, el qui feia les millors paelles i allipebres del món i el que m'ensenyà tantes coses sense jo saber-ho. No saps el que tens fins que ho perds, i això em passà a mi. Des d'ací et dic que t'estime moltíssim i que t'enyore molt però que molt. Per a tu va esta tesi iaio, del teu biòleg.

Índice

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | 13 |
| Objetivos de la tesis | 19 |
| Organización de la tesis | 21 |
| INTRODUCCIÓN | |
| Capítulo 1. Introducción | 25 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | |
| Capítulo 2. Material y Métodos | 37 |
| RESULTADOS | |
| Capítulo 3. Lagunas salinas de interior | 59 |
| Capítulo 4. Lagunas costeras deltaicas | 85 |
| Capítulo 5. Lagunas no salinas de interior | 111 |
| Capítulo 6. Efecto de la temperatura en la expresión génica de las arqueas metanógenas | 133 |
| DISCUSIÓN | |
| Capítulo 7. Discusión General | 153 |
| CONCLUSIONES | |
| Capítulo 8. Conclusiones | 197 |
| REFERENCIAS..... | 205 |
| ANEXO | 217 |

RESUMEN

Las zonas húmedas mediterráneas juegan un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos, ya que la presencia de agua, de forma constante o transitoria, favorece unas altas tasas metabólicas. Respecto al ciclo del carbono, los humedales mediterráneos se ven activamente involucrados en la captación o en la emisión de gases de efecto invernadero carbonados (C-GEI) hacia la atmósfera, concretamente el dióxido de carbono y el metano. Esta relevancia de los humedales en el ciclo del carbono se debe, en parte, a la actividad de las comunidades de procariotas que habitan en el agua y en el sedimento de las zonas húmedas, puesto que la abundancia y versatilidad metabólica de los procariotas les otorgan el papel de actores principales en los flujos de carbono de estos ecosistemas. No obstante, los humedales mediterráneos no son homogéneos, sino que corresponden a diferentes tipos que muestran una serie de características ecológicas específicas. El objetivo principal de esta tesis ha consistido en determinar el papel que tienen las características ambientales que determinan cada tipo de humedal, junto a su estado de conservación, en la estructuración y los metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas que habitan en las aguas y en los sedimentos de lagunas representativas de las grandes categorías de humedales mediterráneos. Los resultados de esta tesis demuestran que las características ecológicas de los diferentes tipos de humedales influyen profundamente en la estructura de las comunidades de procariotas que los habitan, de forma que cada tipo de humedal y estado de conservación mostró una serie de taxones característicos de procariotas. La salinidad fue la variable ambiental que más influyó la estructura de dichas comunidades, aunque otras variables como la alcalinidad para las comunidades de procariotas del agua y el pH y el carbonato para las del sedimento también fueron relevantes. Por otra parte, y además del tipo de humedal, la sinergia entre su estado de conservación y la

estacionalidad fue determinante en la estructuración de las comunidades de procariotas del agua, pero ejerció un efecto mucho más modesto en las comunidades del sedimento, al ser este un ambiente más estable. La relación entre las tasas de los principales metabolismos relacionados con el carbono y la inferencia molecular de su potencial metabólico fue compleja, ya que dependió del balance entre diferentes metabolismos microbianos y la abundancia relativa de los grupos de procariotas involucrados en dichos metabolismos. Además, en esta tesis se determinó experimentalmente la influencia de la temperatura en el incremento de la actividad de las arqueas metanógenas y consecuentemente en las emisiones de metano de los humedales estudiados. Los resultados de esta tesis demuestran la importancia de combinar medidas de la actividad metabólica *in situ* con estudios moleculares de las comunidades de procariotas para entender mejor los flujos de carbono y de gases de efecto invernadero en los humedales mediterráneos, y con ello su papel potencial en la mitigación del cambio climático.

RESUM

Les zones humides mediterrànies desenvolupen un paper molt important als cicles biogeoquímics, ja que la presència d'aigua, de forma constant o transitòria, afavorix unes altes taxes metabòliques. Pel que respecta al cicle del carboni, les zones humides mediterrànies es veuen activament involucrades en la captació o en l'emissió de gasos d'efecte hivernacle carbonats (C-GEI) cap a l'atmosfera, concretament el diòxid de carboni i el metà. Aquesta rellevància de les zones humides en el cicle del carboni es deu, en part, a l'activitat de les comunitats de procariotes que habiten a l'aigua i al sediment de les zones humides, puix que l'abundància i la versatilitat metabòlica dels procariotes els atorguen el paper d'actors principals en els fluxos de carboni d'aquests ecosistemes. No obstant, les zones humides mediterrànies no són homogènies, sinó que corresponen a diferents tipus que mostren una sèrie de característiques ecològiques específiques. L'objectiu principal d'aquesta tesi ha consistit en esbrinar el paper que tenen les característiques ambientals que determinen cada tipus de zona humida, junt al seu estat de conservació, en l'estructuració i els metabolismes del carboni de les comunitats de procariotes que habiten a les aigües i als sediments de llacunes representatives de les grans categories d'aiguamolls mediterranis. Els resultats d'aquesta tesi demostren que les característiques ecològiques dels diferents tipus de zones humides influïxen profundament en l'estructura de les comunitats de procariotes que les habiten, de forma que cada tipus de zona humida i d'estat de conservació mostrà una sèrie de taxons característics de procariotes. La salinitat fou la variable ambiental que més influencià l'estructura de dites comunitats, encara que altres variables com l'alcalinitat per a les comunitats de procariotes de l'aigua i el pH i el carbonat per a les del sediment també foren rellevants. D'altra banda, i a més del tipus de zona humida, la sinèrgia entre el seu estat de conservació i l'estacionalitat fou

determinant en l'estructuració de les comunitats de procariotes de l'aigua, però exercí un efecte molt més modest en les comunitats del sediment, al ser aquest un ambient més estable. La relació entre les taxes dels principals metabolismes relacionats amb el carboni i la inferència molecular del seu potencial metabòlic fou complexa, ja que depengué del balanç entre el diferents metabolismes microbians i l'abundància relativa dels grups de procariotes involucrats en aquestos metabolismes. A més, en aquesta tesi es determinà experimentalment la influència de la temperatura en l'increment de l'activitat dels arqueus metanògens i conseqüentment en les emissions de metà dels aiguamolls estudiats. Els resultats d'aquesta tesi demostren la importància de combinar mesures de l'activitat metabòlica *in situ* amb estudis moleculars de les comunitats de procariotes per entendre millor els fluxos de carboni i de gasos d'efecte hivernacle en les zones humides mediterrànies, i amb això el seu paper potencial en la mitigació del canvi climàtic.

ABSTRACT

Mediterranean wetlands play a very important role in biogeochemical cycles, as the presence of water, either constantly or transiently, favours high metabolic rates. Regarding the carbon cycle, Mediterranean wetlands are actively involved in the uptake or emission of carbon-greenhouse gases (C-GHGs) from/into the atmosphere, namely carbon dioxide and methane. This relevance of wetlands in the carbon cycle is due, in part, to the activity of the prokaryotic communities that inhabit the water and sediment of wetlands, since the abundance and metabolic versatility of prokaryotes make them key players in the carbon fluxes of these ecosystems. However, Mediterranean wetlands are not all equal, but instead correspond to different ecological types displaying a number of type-specific ecological characteristics. The main objective of this thesis has been determining the role of the typical ecological characteristics of each type of wetland, together with its conservation status, in the structuration and carbon metabolisms of the prokaryote communities inhabiting the waters and sediments of representative wetlands among the different types of Mediterranean wetlands. The results of this thesis demonstrate that the ecological characteristics of the different wetland types deeply influence the structure of their prokaryotic communities, in such a way that each wetland type and conservation status showed a series of characteristic prokaryotic taxa. Salinity was the environmental variable that most influenced the prokaryotic community structure, although other variables such as alkalinity for water and pH and carbonate for sediments were also relevant. On the other hand, in addition to the wetland type, the synergy between wetland conservation status and seasonality was a determining factor in structuring the water prokaryotic assemblages but had a much more modest effect on sediment communities, as this is a more stable environment. The relationship between the rates of the main carbon-related metabolisms and the

molecular inference of their metabolic potential was complex, as it depended on the balance between different microbial metabolisms and the relative abundance of the groups of prokaryotes involved in these metabolisms. Furthermore, in this thesis, the influence of temperature on the increase of the activity of methanogenic archaea and consequently on methane emissions from the studied wetlands was experimentally determined. The results of this thesis demonstrate the importance of combining *in situ* measurements of metabolic activity with molecular studies of prokaryotic communities to better understand the carbon and greenhouse gases fluxes in Mediterranean wetlands, and thus their potential role in climate change mitigation.

Objetivos de la tesis

Objetivo principal

El principal objetivo de esta tesis es desvelar la participación de las comunidades de procariotas en los procesos biogeoquímicos que ocurren en los humedales mediterráneos, especialmente en el ciclo del carbono. Esto se ha realizado mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva del gen que codifica para la región V4 del 16S rRNA y el análisis de las secuencias de ADN obtenidas mediante diferentes flujos de datos informáticos, que permiten estudiar:

- (1) La estructura de la comunidad de procariotas del agua y del sedimento de los humedales.
- (2) Los metabolismos potenciales relacionados con el carbono que estas pueden llevar a cabo.

Para profundizar en la relación entre la estructura y la función de la comunidad, dichos cambios estructurales y predicciones metabólicas se han relacionado con las tasas metabólicas reales medidas *in situ* para la producción primaria bruta (GPP), la respiración aerobia y las emisiones de metano.

Objetivos específicos

1. Determinar la estructura de la comunidad y los taxones de procariotas característicos de diferentes categorías de zonas húmedas mediterráneas y de los diferentes estados de conservación que presentan (**Capítulos 3 a 5**).
2. Inferir el potencial metabólico relacionado con el ciclo del carbono en las diferentes categorías de zonas húmedas y su relación con el estado de conservación de los humedales y con las tasas metabólicas medidas *in situ* (**Capítulos 3 a 5**).

3. Determinar las interacciones entre los miembros que forman las comunidades de procariotas de las diferentes categorías de zonas húmedas, los factores que explican los patrones de interacción y los miembros de las comunidades más relevantes para la organización de dichas interacciones (**Capítulos 3 a 5**).

4. Resolver los factores que influyen en la estructura y en el metabolismo de la comunidad de procariotas del agua y del sedimento de humedales representativos de diferentes categorías de zonas húmedas mediterráneas (**Capítulos 3 a 5**).

5. Analizar experimentalmente el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en las emisiones de metano de diferentes humedales representativos de las categorías de zonas húmedas mediterráneas y su relación con la expresión génica de los organismos que participan en la producción de metano (**Capítulo 6**).

Organización de la tesis

Esta tesis se ha organizado en una serie de capítulos formados por una introducción, una descripción de la metodología de la tesis, unos resultados, una discusión y unas conclusiones. Seguidamente, se encuentran las referencias utilizadas y un anexo.

El **capítulo 1** incluye la **introducción**.

En el **capítulo 2** se describen los **lugares de estudio** y la **metodología** utilizada para llevar a cabo esta tesis doctoral.

A partir del **tercer** capítulo se presentan los **resultados** de este trabajo. En los tres primeros capítulos, se describen los resultados de las tres categorías de humedales mediterráneos estudiadas en esta tesis: lagunas **salinas** de interior (**capítulo 3**), lagunas **deltaicas** (**capítulo 4**) y lagunas no salinas de interior (**capítulo 5**). El **capítulo 6** está dedicado al análisis de la **expresión génica** de las **arqueas metanógenas**.

En el **capítulo 7** se desarrolla la **discusión general** de esta tesis, y en el **capítulo 8** se encuentran las conclusiones. Finalmente, se listan las **referencias** utilizadas en este trabajo y se adjunta un **Anexo** donde se encuentran los datos en bruto de las **variables ambientales** del agua y del sedimento de los humedales que se engloban en las tres categorías de humedales estudiadas en esta tesis.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Introducción

1.1. Las zonas húmedas mediterráneas

Las zonas húmedas o humedales son áreas terrestres donde el agua cubre el suelo, por encima de su superficie o de forma subsuperficial, o bien zonas terrestres cuyo suelo se encuentra saturado de agua el tiempo suficiente para que se puedan llevar a cabo los diferentes procesos biológicos típicos de los ambientes acuáticos. El “Convenio Ramsar” define las zonas húmedas como “Extensiones de marismas, pantanos, turberas o aguas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluyendo las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros”.

Existe una complejísima interacción de procesos biológicos, geológicos y químicos por los que se intercambian y se reutilizan materiales y energía en la superficie de la Tierra. Estos procesos interrelacionados son lo que conocemos como ciclos biogeoquímicos, y operan a diferentes escalas temporales y espaciales (Hedges 1992). En concreto, las zonas húmedas ejercen un papel muy importante en algunos de los ciclos biogeoquímicos más relevantes en los estudios sobre cambio climático, especialmente en el ciclo del carbono (Ciais *et al.* 2014), pero también en el ciclo del nitrógeno, el ciclo del fósforo y el ciclo del azufre. Las zonas húmedas están activamente involucradas en la dinámica de los gases de efecto invernadero carbonados (C-GEI), como el dióxido de carbono (CO₂) o el metano (CH₄), puesto que presentan metabolismos muy activos tanto asociados a la fijación del CO₂ atmosférico, y por lo tanto relacionados con la capacidad de estas zonas húmedas como sumideros de carbono, como metabolismos asociados a la emisión de C-GEI, como la respiración y la emisión de metano (Sica *et al.* 2016; Camacho *et al.* 2017; Morant *et al.* 2020a). La información sobre la dinámica de estos

metabolismos en zonas húmedas mediterráneas es muy limitada y más teniendo en cuenta que la región mediterránea alberga una gran variedad de zonas húmedas, desde lagos interiores y pequeñas charcas de aguas no salinas a lagunas salinas de interior o a lagunas costeras (Britton y Crivelli 1993). Esta variedad de lagunas se puede clasificar en diferentes tipos en base a su génesis, morfología, hidrología y características ecológicas.

El comportamiento de los diferentes humedales mediterráneos como sumideros o emisores netos de carbono depende del balance entre los metabolismos autótrofos, que fijan carbono, o de los heterótrofos, que lo generan. Las tasas de estos metabolismos están fuertemente influenciadas por diferentes factores, como la salinidad, la variación estacional, la temperatura o el estado de conservación de las zonas húmedas (Camacho *et al.* 2017; Morant *et al.* 2020a,b). Por otra parte, los cambios en el patrón de precipitaciones y el aumento generalizado de temperaturas que se asocian al cambio climático (IPCC 2014; MedECC 2020) pueden afectar de forma importante a la biogeoquímica y a los balances de carbono de los humedales mediterráneos. Por ejemplo, periodos prolongados de sequía tienen un gran efecto en los procesos biológicos relacionados con la degradación de la materia orgánica (Gionchetta *et al.* 2019). Además, un aumento de la temperatura o una alteración del hidropериodo en diferentes zonas húmedas mediterráneas se han asociado a incrementos en las emisiones de metano, que alteran de forma importante el balance de carbono de los humedales y potencian su actividad como emisores de C-GEI (Camacho *et al.* 2017; Morant 2022).

1.2. Procariotas y metabolismos del carbono en las zonas húmedas

Las comunidades de procariotas de las zonas húmedas son una pieza clave en el funcionamiento de estos ecosistemas, ya que están involucradas en los principales procesos que conforman los ciclos biogeoquímicos (Andreote *et al.* 2012). Por lo tanto, los factores que afectan a las comunidades de dichos ecosistemas, especialmente a los grupos de procariotas que participan en las diferentes etapas del ciclo del carbono, influyen notablemente en el balance de carbono de las zonas húmedas y en su comportamiento como sumideros o emisores netos de carbono.

Los procesos de fijación y de emisión de carbono a la atmósfera que ocurren en los humedales dependen en gran parte de la interacción entre los grupos de procariotas que participan en los principales metabolismos relacionados con los C-GEI. Por una parte, las emisiones de CO₂ de los humedales son un balance entre su producción y su fijación. Así, el CO₂ se produce principalmente por la respiración de los microorganismos heterótrofos. En presencia de oxígeno, la respiración aerobia domina sobre los otros tipos de respiraciones, y es la responsable de la remineralización de la mayor parte de la materia orgánica, por lo que el papel de este metabolismo en el ciclo del carbono es muy importante (Berg *et al.* 2022). Respecto a la fijación del CO₂, es llevada a cabo principalmente por metabolismos dependientes de la luz, que sólo pueden realizar determinados grupos de procariotas, entre los cuales destacan por su abundancia y actividad las cianobacterias, capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, aunque en menor medida también se puede producir la fijación del CO₂ por otros metabolismos microbianos más minoritarios (Megonigal *et al.* 2004; Berg *et al.* 2010; Llíros *et al.* 2015).

Por otra parte, las emisiones de metano dependen del balance entre la producción de este gas por parte de las arqueas metanógenas y de su consumo

por parte de grupos de procariotas aerobios, en concreto las bacterias metanótrofas, o anaerobios, como las arqueas ANME (Bridgham *et al.* 2013; Timmers *et al.* 2017). Los metanógenos o arqueas metanógenas, que son anaerobias estrictas, actúan como descomponedores terminales en ambientes carentes de oxígeno (Watanabe *et al.* 2009), y acoplan la producción de metano o metanogénesis a la obtención de energía. Existen tres rutas metanogénicas principales (Evans *et al.* 2019): (1) la metanogénesis metilotrófica, que puede depender o no del hidrógeno, y que utiliza sustratos metilados como las metilaminas; (2) la metanogénesis hidrogenotrófica, basada en la reducción del CO₂ mediante hidrógeno; y (3) la metanogénesis acetoclástica, que utiliza acetato. Las tres rutas tienen en común una enzima, denominada *mcr* (*methyl-coenzyme M reductase* en inglés). Esta enzima cataliza el último paso de la metanogénesis, liberando metano, y está formada por varias subunidades, siendo el gen que codifica para la subunidad alfa (*mcrA*) ampliamente utilizado para estudiar tanto la diversidad como la actividad transcripcional de los metanógenos (Watanabe *et al.* 2009; Wilkins *et al.* 2015; Evans *et al.* 2019). No obstante, las tres rutas metanogénicas no tienen la misma importancia relativa en todos los ecosistemas. La mayoría de las rutas no se pueden llevar a cabo en altas salinidades (Oren 2011), ya que se ven afectadas por la competición por sustratos metabólicos o por dadores de electrones entre las arqueas metanógenas y las bacterias sulfatoreductoras (SRB), que son mejores competidoras que las arqueas metanógenas en ambientes con alta salinidad ya que en ellos la concentración de sulfato, el cual necesitan las SRB, es elevada. Así, en ecosistemas salinos, donde hay una gran actividad de las SRB, la metanogénesis metilotrófica prevalece frente a las otras rutas metanogénicas, ya que es la única que no presenta una competición por sustratos con las SRB (Sorokin y McGenety 2019). Por otro lado, las bacterias metanótrofas pueden utilizar el metano generado por los

metanógenos como fuente de carbono y de energía (Zheng *et al.* 2008). Se han descrito altas tasas de consumo de metano por parte de estos microorganismos (Kolb *et al.* 2005), por lo que su papel en el control de las emisiones de metano de las zonas húmedas puede llegar a ser muy relevante.

1.3. Herramientas moleculares y su uso en ecología microbiana

Debido a la importancia de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, el estudio de los factores que afectan a la estructura y a los metabolismos de las comunidades de procariotas es de especial importancia para entender los procesos biológicos que gobiernan el ciclo del carbono en las zonas húmedas. La gran diversidad de procariotas existentes y la imposibilidad de obtener cultivos axénicos de todos ellos hace que una de las herramientas más poderosas y a la vez de uso más amplio que tiene la ecología microbiana para estudiar las comunidades de procariotas en el ambiente sea el metabarcoding del ADN. El metabarcoding se basa en la determinación de la secuencia, mediante tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, de fragmentos concretos de ADN (marcadores) que provienen directamente de las muestras ambientales, sin necesidad de aislar organismos concretos (Porter y Hajibabaei 2018). En el caso de los procariotas, el marcador que se utiliza es el gen que codifica para el 16S rRNA (de ahora en adelante 16S), y en concreto, alguna de las regiones hipervariables que lo componen, como la región V4, que son taxonómicamente informativas.

Después de la secuenciación, las secuencias de ADN se asignan a *operational taxonomic units* (OTUs), que son secuencias con un 97% de similitud (Edgar 2017). No obstante, para evitar agrupar secuencias diferentes en un mismo OTU, con el tiempo se desarrollaron flujos de trabajo (*pipelines*) bioinformáticos como USEARCH, que generan ZOTUs (zero-radius OTUs), también conocidos como ESV (*exact sequence variants*) o ASV (*amplicon*

sequence variants) (Porter y Hajibabaei 2018), que son secuencias con un 100% de identidad. A partir de estos ZOTUs, diferentes procedimientos estadísticos y aplicaciones bioinformáticas permiten por un lado caracterizar la estructura de la comunidad procariota y, por otro lado, desentrañar los efectos de las variables ambientales en la estructura y función de las comunidades de procariotas (Ju y Zhang 2015). Por ejemplo, se pueden determinar los taxones de procariotas característicos de los diferentes niveles de variables categóricas de interés ecológico mediante análisis como LEfSe (Segata *et al.* 2011) o los índices IndVal (Dufrière y Legendre 1997), que además de detectar estos taxones les asignan un valor (*LDA score* para el LEfSe e índice *R* para IndVal) dependiendo de la capacidad discriminante de dicho taxón.

Otra de estas aplicaciones es el PICRUSt2 (Douglas *et al.* 2020), que permite profundizar en la relación entre estructura y función de las comunidades, ya que infiere su potencial metabólico a partir de la abundancia relativa y la clasificación taxonómica de los diferentes miembros que las componen (Sang *et al.* 2018; Douglas *et al.* 2020). Este flujo de trabajo (*pipeline*) extrae el perfil taxonómico de las comunidades bajo estudio a partir de las secuencias de 16S y lo compara con una base de datos construida a partir de la base IMG/M, que recoge genomas microbianos. De este modo, conociendo la abundancia relativa de los diferentes taxones de procariotas de la comunidad y el número de copias de los genes que tienen sus representantes más cercanos filogenéticamente en la base de genomas, el PICRUSt2 puede inferir la cantidad de copias de todos los genes o *gene counts* que contiene cada unidad taxonómica de la comunidad de procariotas.

Por otra parte, las interacciones entre los miembros de las comunidades son relevantes para entender el papel que los diferentes grupos de procariotas

ejercen en la comunidad. Un método para inferir estas interacciones es la construcción de redes de coocurrencia, que detectan relaciones significativas de presencia mutua o de exclusión entre los diferentes miembros de la comunidad (Faust y Raes 2016), y ayudan a discernir patrones simples a partir de conjuntos de datos complejos (Goberna y Verdú 2022). Las redes se pueden representar gráficamente, de forma que cada miembro de la red se simboliza mediante un nodo y las relaciones entre los diferentes miembros (nodos) se pueden representar mediante líneas que los conectan llamadas bordes (*edges* en inglés). Existen diversos softwares para inferir las redes. Uno de ellos es CoNet, que permite construir las redes mediante métodos basados en correlaciones y que incorpora rutinas que mitigan el establecimiento de correlaciones espurias entre los nodos (Faust *et al.* 2012; Faust y Raes 2016). El análisis de la estructura de la red puede arrojar información relevante desde un punto de vista ecológico. Uno de los parámetros estructurales es el de modularidad, que informa sobre el grado en que una red está dividida en diferentes subredes o módulos, los cuales están formados por miembros que tienen más relaciones entre ellos que con los miembros de los otros módulos (Khan *et al.* 2019). Por otra parte, el análisis de las propiedades topológicas de los nodos, como el número de conexiones que un nodo tiene con otros nodos (*degree*), puede servir para detectar los llamados *keystone taxa*, que se supone que tienen un papel muy importante en la estructura y función de la comunidad independientemente de su abundancia (Goberna y Verdú 2022). Además, según sus características topológicas, los nodos de la red se pueden clasificar en 4 tipos (Olesen *et al.* 2007): nodos periféricos, que mantienen pocas conexiones con el resto de los nodos; nodos conectores, los cuales conectan módulos de la red y tienen una gran importancia para mantener la red; nodos llamados *module hubs*, muy importantes para mantener la organización del módulo del cual forman parte; y los nodos denominados

como *network hubs*, que son importantes para mantener la coherencia tanto del módulo donde se encuentran como de la red general. La pertenencia de un nodo a uno de estos grupos determinados se establece calculando su conectividad intramódulo (Z_i) y su conectividad entre módulos (P_i) (Olesen *et al.* 2007), y se puede visualizar mediante un gráfico Z_i - P_i , donde los nodos se sitúan en 4 regiones, correspondientes a cada uno de los 4 posibles roles, en base a sus valores de P_i y Z_i .

Aparte de las metodologías anteriores, basadas en el análisis del ADN, el estudio de la expresión génica de los procariotas en el ambiente puede arrojar resultados interesantes a nivel ecológico, ya que los cambios en dicha expresión están fuertemente influenciados por los factores ambientales (Gionchetta *et al.* 2020), por lo que los cambios en las condiciones ambientales, como un aumento de la temperatura, pueden verse reflejados en los patrones de expresión génica de los microorganismos ambientales. La expresión génica de las comunidades de procariotas se puede estudiar mediante RT-qPCR. Para esto, se extrae el ARN total de toda la comunidad y se retrotranscribe (RT) a ADN copia o cDNA, que es la secuencia de ADN complementaria a dicho ARN (Porter y Hajibabaei 2018). A partir de este cDNA, se pueden realizar PCR cuantitativas (qPCR) de genes marcadores de determinados metabolismos o grupos microbianos, de forma que se puede cuantificar el grado de participación de los diferentes taxones microbianos en metabolismos concretos (He *et al.* 2018) o el efecto de los cambios ambientales en la expresión de dichos genes marcadores (Vigneron *et al.* 2019).

En esta tesis, se han determinado los factores ambientales que afectan a la estructura y los metabolismos relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas que habitan en el agua y en el sedimento de humedales

representativos de las grandes categorías de zonas húmedas mediterráneas de España. Para ello, se han combinado técnicas moleculares con medidas *in situ* de las tasas metabólicas de los principales metabolismos del carbono, permitiendo profundizar en la relación entre la estructura y la función de las comunidades de procariotas y entender mejor los flujos de carbono y de C-GEI en estos humedales.

Material y Métodos

Capítulo 2. Material y Métodos

En este capítulo se describen los procedimientos metodológicos generales aplicables a todos los capítulos de resultados de la tesis, así como la metodología particular de cada capítulo, tanto de los lugares de estudio en los que se ha llevado a cabo esta tesis que por su complejidad requiere de un desarrollo extenso, como los procedimientos seguidos para la toma de muestras y la caracterización limnológica de los humedales de trabajo. También se explica con detalle la metodología seguida para extraer el ADN a partir de las muestras ambientales y para su secuenciación y el posterior procesamiento de las secuencias, y también se describen los análisis estadísticos utilizados.

2.1. Lugares de estudio

En esta tesis se ha trabajado con un total de 43 humedales mediterráneos que fueron clasificados en diferentes categorías de zonas húmedas, ya que cada humedal presentó una serie de características limnológicas específicas que permitió asignarlo a una determinada categoría de zona húmeda (Anexo 1). Además, estos humedales presentaron diferentes estados de conservación. En los **capítulos 3 a 5** de esta tesis se ha trabajado con un total de 38 humedales, clasificados en lagunas salinas de interior (**Capítulo 3**), lagunas deltaicas, que se engloban dentro de la categoría de lagunas costeras (**Capítulo 4**), y lagunas no salinas de interior (**Capítulo 5**). En el **Capítulo 6**, se trabajó además con 3 humedales representativos de la categoría de lagunas volcánicas y con otros 2 humedales costeros que no se incluyeron en el **Capítulo 4**. A continuación, se describirán las características generales de estas categorías de zonas húmedas y de los humedales representativos de cada una de ellas con los cuales se ha trabajado en esta tesis.

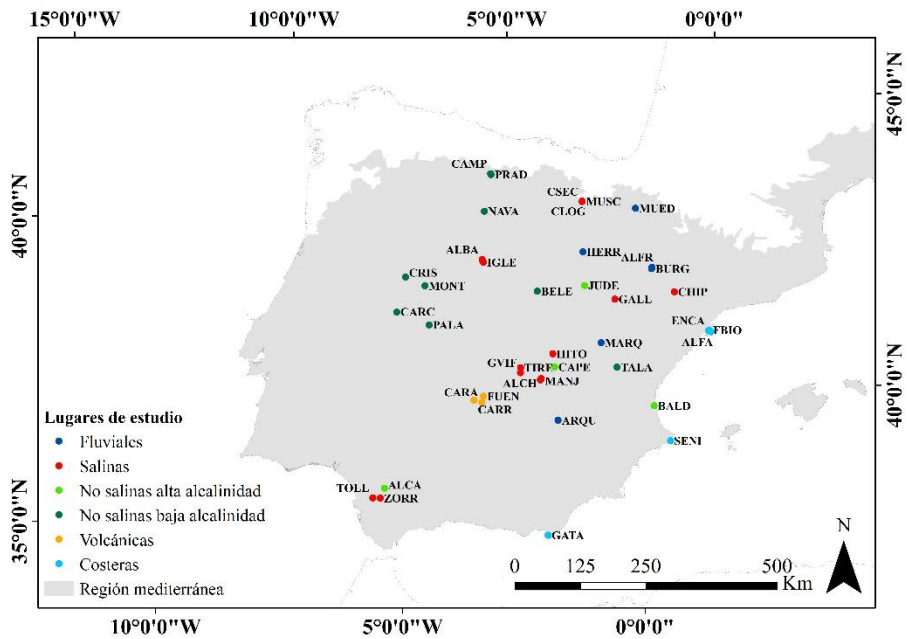


Figura 2.1. Localización geográfica de los diferentes humedales en los que se ha trabajado en esta tesis. El color de los puntos que representan a los humedales indica la categoría de humedal o bien el tipo de humedal al cual pertenecen.

2.1.1 Lagunas salinas de interior

Para el tercer capítulo de esta tesis seleccionaron 15 lagunas salinas de interior situadas en la región biogeográfica mediterránea de España (Tabla 2.1). Estas lagunas se agruparon en 5 categorías de acuerdo con su salinidad: lagunas bicarbonatado-sódicas, hiposalinas, mesosalinas e hipersalinas, todas ellas de carácter temporal. La quinta categoría está representada por la única laguna hipersalina permanente de interior de España, Salada de Chiprana, que debido a alteraciones históricas relacionadas con el desarrollo de la agricultura mantiene una inundación constante desde hace varios siglos, considerándose de carácter permanente de forma natural (Valero-Garcés *et al.* 2000).

Tabla 2.1. Principales características de las lagunas salinas de interior estudiadas. H: alteración hidrológica. T-H: alteración trófica e hidrológica.

| Laguna | Código | Categoría de salinidad | Estado de conservación | Hidroperiodo |
|------------------------------|--------|------------------------|------------------------|----------------|
| Laguna de Caballo Alba | ALBA | Bicarbonatado-sódica | Conservada | Temporal |
| Laguna de la Iglesia | IGLE | Bicarbonatado-sódica | T-H | Semipermanente |
| Laguna Grande de Villafranca | GVIP | Hiposalina | H | Permanente |
| Laguna de El Hito | HITO | Hiposalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Musco | MUSC | Hiposalina | Restaurada | Temporal |
| Laguna de Carralagroño | CLOG | Mesosalina | H | Semipermanente |
| Laguna de Carravalseca | CSEC | Mesosalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Manjavacas | MANJ | Mesosalina | T-H | Semipermanente |
| Laguna de los Tollos | TOLL | Mesosalina | Restaurada | Semipermanente |
| Laguna Salada de Zorrilla | ZORR | Mesosalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Alcahozo | ALCH | Hipersalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Gallocanta | GALL | Hipersalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Salicor | SALI | Hipersalina | Conservada | Temporal |
| Laguna de Tírez | TIRE | Hipersalina | Conservada | Temporal |
| Laguna Salada de Chiprana | CHIP | Hipersalina permanente | Conservada | Permanente |

La clasificación utilizada considera la conductividad como una medida de la salinidad, siguiendo el trabajo de Hammer (1986). En este estudio, se clasificaron como lagunas hiposalinas las que presentaban conductividades medias menores de $15 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, como lagunas mesosalinas las que mostraron conductividades medias entre $15\text{-}45 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ y como lagunas hipersalinas las que presentaban conductividades medias mayores de $45 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$. Las lagunas de Caballo Alba y de la Iglesia, debido a sus altos niveles de carbonato sódico y su pH elevado de forma permanente, se clasificaron como lagunas bicarbonatado-sódicas. Por otra parte, considerando la naturaleza y los efectos de los aportes de agua de origen humano sobre las características ecológicas de las lagunas, éstas se clasificaron en lagunas conservadas, en lagunas alteradas hidrológicamente (Carralagroño y Grande de Villafranca) y en

lagunas en las que la alteración hidrológica desembocó a su vez en alteración trófica (lagunas de Manjavacas e Iglesia). Entre las lagunas conservadas, dos de ellas, Musco y Tollos, habían sido restauradas habiendo recuperado sus características naturales.

2.1.2. Humedales costeros (deltaicos)

Los humedales costeros tienen una gran diversidad en cuanto a estructura, génesis y dinámica. En algunos la influencia del mar es muy elevada, sobre todo en los humedales que están conectados a él, mientras que los que no mantienen una conexión física con el mar no se ven tan influidos por este. Para el cuarto capítulo de esta tesis se seleccionaron 3 humedales representativos de los principales tipos de zonas húmedas que se encuentran en el delta del río Ebro (Catalunya, España), y que a su vez son representativos de los principales tipos de humedales costeros mediterráneos. La localización y las principales características de dichos humedales se describieron en Morant *et al.* (2020a). Brevemente, y siguiendo un gradiente decreciente de salinidad, las marismas de Alfacs (ALFA) son marismas micromareales parcialmente separadas del mar Mediterráneo por una franja estrecha de arena y están formadas por una mezcla de zonas inundadas de forma permanente o temporal y cubiertas por matas de plantas halófitas del género *Salicornia*. Encanyissada (ENCA) es una laguna costera salobre cuyo nivel de agua está controlado por una red de canales de riego artificiales que conectan con el mar. Las entradas de agua a esta laguna son muy variables, por lo que presenta grandes fluctuaciones en la conductividad de su agua, presentando normalmente aguas salobres. Por otra parte, Filtre Biològic (FBIO) es un humedal costero de agua no salina (marjal) situado en una zona de 43 hectáreas anteriormente ocupadas por arrozales. Actualmente, este humedal actúa como filtro biológico que reduce mediante procesos naturales la concentración de nutrientes del agua proveniente de la

agricultura. Las entradas y salidas de agua de este humedal también están reguladas, manteniendo un nivel de inundación constante. Además, Encanyissada y Filtre Biològic tienen un estado trófico más alto que Alfacs.

Por otra parte, en el capítulo 6 de esta tesis se trabajó también con otros 2 humedales costeros, el Senillar de Moraira (SENI) y las Salinas del Cabo de Gata (GATA). El Senillar de Moraira es un pequeño humedal costero salobre, separado del mar por una franja de arena y una playa, y está alimentado por agua subterránea (este tipo de humedales alimentados por surgencias de agua se conocen en valenciano como *ullals*). Las Salinas del Cabo de Gata son un sistema costero actualmente no explotado, que fue modificado por la acción humana para extraer sal a partir del agua del mar, y que se comporta como una laguna costera salina.

2.1.3. Lagunas no salinas de interior

Para el quinto capítulo de esta tesis se seleccionaron 20 lagunas someras representativas de los humedales no salinos de interior mediterráneos. Dichas lagunas se agruparon en tres tipos: no salinas de aguas alcalinas, fluviales y no salinas de baja alcalinidad. A su vez, estas lagunas presentaron diferentes hidroperiodos y estados ecológicos en base al componente trófico (Tabla 2.2).

Las lagunas no salinas de aguas alcalinas son originadas por diversos procesos genéticos, principalmente por karstificación, además de por procesos tectónicos de pequeña incidencia. Estas lagunas, se asientan sobre suelos carbonatados (calizas y dolomías), nunca sobre evaporitas. La mineralización de sus aguas es la característica de sistemas oligosalinos ($<1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) a subsalinos ($1\text{-}3 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Tabla 2.2. Principales características de las lagunas no salinas de interior estudiadas en esta tesis. Al necesitarse parámetros del agua, no se pudo determinar el componente trófico del estado ecológico de JUDE, BURG y NAVAS al estar secas durante el periodo de estudio (n.d. - no determinado).

| Laguna | Código | Tipo | Componente trófico del estado ecológico | Hidroperiodo |
|--------------------------------------|--------|------------------|---|----------------|
| Laguna de la Alcaparrosa | ALCA | Aguas alcalinas | Muy bueno | Temporal |
| Ullal de Baldoví | BALD | Aguas alcalinas | Malo | Permanente |
| Laguna de los Capellanes | CAPE | Aguas alcalinas | Muy bueno | Semipermanente |
| Laguna de Judes | JUDE | Aguas alcalinas | n.d. | Efímera |
| Galacho de la Alfranca de Pastriz | ALFR | Fluvial | Muy bueno | Permanente |
| Laguna del Arquillo | ARQU | Fluvial | Muy bueno | Permanente |
| Galacho de El Burgo de Ebro | BURG | Fluvial | n.d. | Efímera |
| Llanos de la Herrada | HERR | Fluvial | Muy bueno | Semipermanente |
| Marquesado | MARQ | Fluvial | Muy bueno | Permanente |
| Balsa de La Mueda | MUED | Fluvial | Muy bueno | Temporal |
| Laguna Grande de la Puebla de Beleña | BELE | Baja alcalinidad | Muy bueno | Temporal |
| Laguna de El Campillo | CAMP | Baja alcalinidad | Muy bueno | Temporal |
| Laguna Grande Carcaboso | CARC | Baja alcalinidad | Muy Malo | Semipermanente |
| Laguna del Cristo | CRIS | Baja alcalinidad | Muy bueno | Semipermanente |
| Charca del Monte | MONT | Baja alcalinidad | Muy Malo | Temporal |
| Laguna de Fuentes de Nava (Norte) | NAVAN | Baja alcalinidad | Muy bueno | Temporal |
| Lagunas de Fuentes de Nava (Sur) | NAVAS | Baja alcalinidad | n.d. | Efímera |
| Laguna Palancoso | PALA | Baja alcalinidad | Moderado | Temporal |
| Laguna de Pradales | PRAD | Baja alcalinidad | Muy bueno | Temporal |
| Laguna de Talayuelas | TALA | Baja alcalinidad | Muy bueno | Temporal |

Dentro del grupo de lagunas fluviales se incluyen los humedales, pequeños estanques o lagunas situadas en una llanura de inundación o en el curso de un río. Su régimen hídrico depende esencialmente del caudal del río debido a una

conexión superficial y/o a una conexión a través del acuífero en la llanura aluvial.

Las lagunas no salinas de aguas de baja alcalinidad se caracterizan por asentarse en zonas deprimidas sobre materiales rocosos ácidos (silicatos, rocas paleozoicas, materiales duros y poco solubles en general), generando cuencas poco profundas. La mineralización suele ser baja, estando la conductividad eléctrica en periodos de máxima inundación en el rango entre 0,05 y 0,30 (con máximos puntuales de 0,50) $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, debido a la baja solubilidad de los materiales de la cuenca.

Por otra parte, el componente trófico del estado ecológico de las lagunas se determinó a partir de la concentración de clorofila-*a* en el agua. Los datos de clorofila para la determinación de dicho estado, siguiendo los protocolos establecidos en la normativa española para seguir las directrices de la Directiva Europea Marco del Agua (DMA) (BOE 2015), fueron los promedios de dos muestreos durante el hidropereodo, el primero al menos un mes después del inicio del llenado, retrasado hasta finales de invierno siempre que sea posible, y el segundo hacia mediados de primavera, antes del inicio del periodo de desecación estival. Los umbrales para la clasificación del estado (muy bueno, bueno, moderado, malo, y muy malo) se aplicaron según la evaluación española establecida para la DMA.

2.1.4. Lagunas volcánicas

Las lagunas volcánicas están caracterizadas por estar emplazadas en antiguas zonas volcánicas y su origen está asociado generalmente a procesos hidrovulcánicos. Normalmente son lagunas someras, y en la Península Ibérica se encuentran localizadas en la comarca de Campo de Calatrava, en la provincia de Ciudad Real. El aporte mayoritario de agua en estas lagunas proviene de la lluvia y de la escorrentía superficial, y ninguna de estas lagunas

presenta un carácter permanente. Para el capítulo 6 de esta tesis se seleccionaron 3 lagunas de esta categoría: la Laguna de Fuentillejo (FUEN), la Laguna de La Carrizosa (CARR) y la Laguna de Caracuel (CARA).

2.2. Muestreo y análisis físicos y químicos

En las campañas de muestreo se obtuvieron muestras de agua y de sedimento en el mismo punto de cada laguna. Dichas campañas fueron realizadas durante el periodo de llenado (otoño-invierno), el óptimo ecológico (primavera) y la fase de secado (verano) del ciclo hidrológico 2016-17. Las muestras de agua se recogieron en recipientes estériles que se mantuvieron en frío hasta la llegada al laboratorio. El agua destinada a la obtención del ADN total se filtró por filtros de policarbonato de 0,22 μm de tamaño de poro (Nucleopore, Whatman), los cuales se conservaron a una temperatura de -20°C hasta la extracción del ADN. Para el análisis de nutrientes disueltos, las muestras de agua se filtraron por filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F), y el agua filtrada se conservó en frío hasta su posterior análisis. Las muestras de sedimento se recogieron por triplicado en recipientes estériles y se mantuvieron en frío hasta su procesamiento en el laboratorio, donde los sedimentos fueron homogeneizados mezclándolos con una varilla metálica. Las muestras destinadas a la extracción del ADN se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml que se mantuvieron a una temperatura de -20°C hasta la extracción. Para dicha extracción, se utilizaron unos 300 mg de sedimento por muestra.

Por lo que respecta al agua, el oxígeno disuelto, la temperatura, la profundidad máxima, la conductividad y el pH se midieron *in situ*. El oxígeno disuelto y la temperatura se midieron mediante una sonda multiparamétrica WTW Multi 3140 con un sensor FDO 925, aplicándose (de ser necesario) una corrección por salinidad a las medidas de oxígeno. La profundidad máxima se obtuvo

mediante un limnómetro situado en el punto más profundo de los lagos. La conductividad se midió mediante un conductímetro WTW Tetracon® 925 IDS, y el pH mediante un medidor de pH Crison pH Basic 20. Por otra parte, el análisis de los nutrientes inorgánicos disueltos y de las otras variables ambientales del agua se realizó mayoritariamente siguiendo los métodos estándar descritos en APHA (2017). Brevemente, la concentración de nitrato se determinó mediante el método de la segunda derivada por espectroscopia UV/visible (APHA 4500 NO₃⁻ C). El amonio se obtuvo mediante el método modificado basado en el método del azul de indofenol (Golterman 2007). El ortofosfato reactivo soluble (SRP) se determinó mediante el método basado en el método del ácido ascórbico y fosfomolibdico (APHA 4500 P E). La concentración de sulfato se obtuvo por precipitación en forma de sulfato de bario (APHA 4500 SO₄²⁻ E). Los sólidos suspendidos totales (TSS) se determinaron mediante desecación a 105°C (APHA 2540 B Solids). La materia orgánica (LOI) se determinó mediante ignición a una temperatura de 460°C durante 6 horas (Heiri *et al.* 2001). El carbono orgánico disuelto (DOC) se midió mediante un analizador TOC-VCHS Shimadzu (Tokio, Japón). La alcalinidad se midió por valoración con ácido clorhídrico utilizando fenolftaleína como indicador de pH, y la clorofila-*a* (Chl-*a*) se cuantificó filtrando las muestras de agua con filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F), los cuales se sumergieron en acetona a una temperatura de -20°C para extraer los pigmentos fotosintéticos. Una vez extraída, la concentración de Chl-*a* se obtuvo mediante el método descrito en Picazo *et al.* (2013).

En cuanto al sedimento, las diferentes medidas se realizaron por triplicado. El pH y la conductividad se midieron mediante una dilución 1/5 con agua destilada (Rayment y Higginson 1992). La conductividad se obtuvo mediante un conductímetro WTW LF-191 y el pH mediante un medidor de pH Crison pH Basic 20. Además, el porcentaje de materia orgánica y de carbonatos se

determinó respectivamente mediante ignición a 460°C durante 6 horas y a una temperatura de 950°C durante 4 horas (Heiri *et al.* 2001).

Por otra parte, se midieron las tasas de producción primaria bruta (GPP) y de respiración aerobia tanto para el plancton como para el bentos de las lagunas estudiadas mediante medidas *in situ* de la variación en la concentración de oxígeno en incubaciones en luz y en oscuridad, que se transformaron en carbono asumiendo que un mol de O₂ generado o consumido implica un mol de CO₂ consumido o generado (Morant 2022). En cuanto a las emisiones de metano, que son un balance entre la producción y consumo microbiano de este gas, se determinaron mediante el procedimiento descrito en Camacho *et al.* (2017), obteniendo para cada laguna y muestreo testigos de sedimento mediante tubos transparentes de metacrilato que se incubaron en cámaras climáticas a una temperatura correspondiente a la del periodo de muestreo durante 1 a 4 días dependiendo del humedal. El metano generado durante ese tiempo se midió mediante cromatografía de gases o mediante un medidor de metano Aeroqual Gas A200 CH₄ calibrado por cromatografía de gases (Camacho *et al.* 2017; Morant 2022). Las medidas de concentración de metano se transformaron en tasas de emisión de carbono por unidad de tiempo mediante la ecuación de la ley de los gases ideales (Morant 2022).

2.3. Extracción de ADN, secuenciación y asignación taxonómica

La extracción de ADN de los filtros de agua y del sedimento se llevó a cabo mediante un kit comercial de extracción de ADN (EZNA soil DNA isolation kit, de Omega Bio-Tek). Posteriormente, del ADN extraído se secuenció la región V4 del gen que codifica para el 16S rRNA con el sistema MiSeq (2x250 pb) de Illumina siguiendo el protocolo descrito en Picazo *et al.* (2019). Brevemente, para cada muestra se obtuvieron librerías de la región V4 mediante el par de primers 515f/806r. Posteriormente, las librerías se

normalizaron, se cuantificaron, se cargaron en una célula de flujo Illumina MiSeq v2 y se secuenciaron en el formato 2x250 pb, obteniendo para cada muestra las secuencias en formato FastQ, las cuales se depositaron en el NCBI Sequence Read Archive en el BioProject ID PRJNA819854.

Las secuencias correspondientes a cada capítulo de la tesis fueron procesadas de forma independiente de las de los otros capítulos, todas con el mismo procedimiento que se detalla a continuación. Para dicho procesamiento se utilizó un flujo de trabajo (*pipeline*) basado en UPARSE (Edgar 2013). Después de la fusión de los pares de lecturas (*reads*) (2x250 pb), las secuencias se filtraron con un error esperado máximo de 0,5 y las quimeras fueron eliminadas mediante el algoritmo UCHIME. Estas secuencias filtradas se agruparon en ZOTUs (zero-radius Operational Taxonomic Units), que son secuencias con una identidad del 100%. La asignación taxonómica se llevó a cabo mediante el alineador SINA v.1.2.11 utilizando la base de datos SILVA 138.1 como referencia. En esta tesis, se han escrito en cursiva la clase y todos los rangos taxonómicos más bajos (Thines *et al.* 2020). Los ZOTUs con un alineamiento menor del 90% o los que se clasificaron como mitocondrias o cloroplastos fueron eliminados. La tabla de ZOTUs filtrados resultante se dividió en una tabla de ZOTUs presentes sólo en el agua y otra de ZOTUs presentes sólo en el sedimento. Dichas tablas se rarefactaron a un umbral de lecturas (*reads*) por muestra específico para cada capítulo de la tesis. Si alguna muestra no alcanzaba dicho umbral, se eliminaba del análisis. Las rarefacciones se repitieron 100 veces para evitar la pérdida de los ZOTUs menos abundantes (Caliz *et al.* 2015), y se unificaron en dos tablas de ZOTUs rarefactadas, una para las muestras de agua y una para las muestras de sedimento. Dado que el porcentaje de arqueas respecto al total de bacterias fue muy bajo (aproximadamente un 1% en promedio), el número de lecturas de arqueas disponibles para el análisis era limitado. Para conseguir aumentar las

lecturas se decidió tener en cuenta los singletons (secuencias con una única lectura) y cambiar la base de datos de referencia de SILVA a RDP ya que actualmente tiene mejor representado al dominio Archaea. Mediante la herramienta RDP classifier 2.13 (Wang *et al.* 2007) se asignó la taxonomía a todas las lecturas de los archivos FastQ R1-forward (de mayor calidad que los R2-reverse en todas las muestras) tomando como referencia la base de datos RDP versión 11.5. Después, se filtraron sólo aquellas lecturas con baja calidad de alineamiento (cutoff 80%), obteniéndose una tabla de secuencias que se rarefactó a un umbral de lecturas por muestra específico para cada capítulo de la tesis. Esta tabla rarefactada fue la que se utilizó específicamente para los análisis del dominio Archaea en sedimento.

2.4. Potencial metabólico de comunidades de procariotas

La herramienta bioinformática PICRUSt2 (*phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states*) (Douglas *et al.* 2020) fue utilizada para determinar los metabolismos potenciales que podían llevar a cabo las comunidades microbianas de procariotas del agua y del sedimento. Para ello, se utilizó la tabla de ZOTUs previa a la filtración y a la rarefacción, ya que el PICRUSt2 tiene su propio sistema de normalización. Posteriormente, se seleccionaron los genes inferidos por esta herramienta que participan en los metabolismos medidos en los muestreos. Así, para todos los capítulos de la tesis los genes inferidos seleccionados fueron el gen *psbA* para la fotosíntesis (Sander *et al.* 2010), el gen *coxA* para la respiración aerobia (Kessler *et al.* 2019), el gen *pmoA* para la metanotrofia aerobia (Chen *et al.* 2020) y el gen *mcrA* para la metanogénesis (Kessler *et al.* 2019; Chen *et al.* 2020). Además, también se determinó la presencia o la ausencia de cada uno de estos genes marcadores en cada uno de los ZOTUs.

En el capítulo 3 también se seleccionaron los genes *mtmB* y *mtbB* (metanogénesis metilotrónica), el gen *ackA* (metanogénesis acetoclástica) y el gen *mch* (metanogénesis a partir de la reducción del CO₂) (Zhou *et al.* 2022). En el capítulo 4 y en el capítulo 6 se seleccionó también el gen *dsrB*, marcador de la sulfatorreducción desasimilatoria (Roy *et al.* 2018).

2.5. Redes de coocurrencia de procariontas

En los capítulos tres a cinco se construyeron dos redes de coocurrencia diferentes con el software CoNet (Faust y Raes 2016), una para las muestras de agua y otra para las de sedimento, en base a las respectivas tablas de ZOTUs rarefactadas y con la asignación taxonómica Silva 138.1.

En las redes de cada capítulo, a cada ZOTU se le asignó un nivel de los factores categoría de humedal y estación (otoño-invierno, primavera y verano) si su abundancia en alguno de estos niveles era mayor del 70%. En cuanto a los ZOTUs que no alcanzaban una abundancia mínima del 70%, se dividieron en dos clases. Por una parte, si dentro del factor categoría de humedal un ZOTU presentaba lecturas en todos los niveles de ese factor, se le consideró cosmopolita (Cosmo). Si ocurría lo mismo en el factor estación, presentando lecturas en todas las estaciones, se le consideró presente durante todo el año (C, de *core* en inglés). Por otra parte, si un ZOTU no presentó ninguna lectura en alguno de los niveles de un factor, se le consideró no cosmopolita/no *core* (NC). Las relaciones de coocurrencia y de coexclusión entre los nodos de la red se dedujeron con distintas métricas en cada capítulo. En el análisis se incluyeron datos ambientales. Se consideraron hasta 1000 bordes (*edges*) superiores e inferiores.

La significatividad de los bordes se evaluó mediante una combinación de permutaciones y *bootstraps* generadas con 100 iteraciones y con una rutina de renormalización para evitar el sesgo de *composicionalidad* y mitigar por tanto

el establecimiento de correlaciones espurias entre los nodos. La significatividad final de los bordes se obtuvo fusionando el valor p de los bordes de cada métrica con el método de Brown y con una corrección de pruebas múltiples mediante el método de Benjamini-Hochberg. La red final se visualizó mediante el software de visualización de redes Cytoscape (Lopes *et al.* 2010). En estas redes generales se determinó el *clustering coefficient*, que da una medida de la complejidad de la red (Guo *et al.* 2022), y la modularidad (con el algoritmo MCL), que informa sobre el grado en que una red está dividida en diferentes subredes o módulos, los cuales están formados por miembros que tienen más relaciones entre ellos que con los miembros de los otros módulos (Khan *et al.* 2019).

En el capítulo tres, los diferentes niveles del factor categoría de humedal fueron las diferentes categorías de salinidad en que se agruparon las lagunas: bicarbonatado-sódicas, hiposalinas, mesosalinas, hipersalinas temporales e hipersalina permanente. En este capítulo también se incluyeron el factor estado de conservación, que se dividió en lagunas conservadas, restauradas, con alteración hidrológica y con alteración trófica e hidrológica, y el factor laguna, dividido en 15 niveles correspondientes a cada una de las lagunas. La abundancia mínima de los ZOTUs que se tuvieron en cuenta para construir las redes fue de 10 lecturas (*reads*) para el agua y de 4 lecturas para el sedimento. La red se construyó con disimilitud de Bray-Curtis.

En el capítulo 4, los diferentes niveles del factor humedal fueron cada uno de los tres humedales que conforman el capítulo. La abundancia mínima de los ZOTUs que se tuvieron en cuenta para construir las redes fue de 20 lecturas para el agua y de 50 lecturas para el sedimento. Las métricas utilizadas para construir la red fueron la correlación de Pearson y la disimilitud de Bray-

Curtis para el agua y la correlación de Pearson, la disimilitud de Bray-Curtis y la *Mutual Information* (similaridad) para el sedimento.

En el capítulo 5, los diferentes niveles del factor categoría de humedal fueron lagunas alcalinas, fluviales o de baja alcalinidad. La abundancia mínima de los ZOTUs que se tuvieron en cuenta para construir las redes fue de 25 lecturas para el agua y de 80 lecturas para el sedimento. Las métricas utilizadas para construir las dos redes fueron la correlación de Pearson, la correlación de Spearman, la disimilitud de Bray-Curtis y la disimilitud de Kullback-Leibler.

Por otra parte, se calcularon los roles topológicos de los nodos individuales que formaron las redes según la clasificación simplificada de Olesen *et al.* (2007), que los divide en 4 tipos: nodos periféricos, que mantienen pocas conexiones con el resto de los nodos; nodos conectores, los cuales conectan módulos de la red y tienen una gran importancia para mantener la red; nodos llamados *module hubs*, muy importantes para mantener la organización de módulo del cual forman parte; y los nodos denominados como *network hubs*, que son importantes para mantener la coherencia tanto del módulo donde se encuentran como de la red general. La pertenencia de un nodo a uno de estos grupos determinados se estableció calculando su conectividad intramódulo (Z_i) y su conectividad entre módulos (P_i) (Olesen *et al.* 2007), y se pudo visualizar el resultado mediante un gráfico Z_i - P_i , donde los nodos se sitúan en 4 regiones, correspondientes a cada uno de los 4 posibles roles, en base a sus valores de P_i y Z_i . Para este análisis, se volvieron a construir las redes del capítulo 4 y 5 pero teniendo en cuenta sólo las relaciones de copresencia y no las de coexclusión. Las redes del capítulo 3 no se volvieron a construir porque la disimilitud de Bray-Curtis sólo tiene en cuenta las copresencias de forma inherente. Las redes del capítulo 4 se construyeron con las mismas distancias y valores mínimos de abundancias de ZOTUs. En el capítulo 5 se construyeron

redes específicas para cada tipo de laguna, considerándose 10000 bordes superiores e inferiores, y sólo se tuvieron en cuenta los ZOTUs con una abundancia total mínima de 10 lecturas para el agua y 20 para el sedimento.

2.6. Diseño experimental y expresión génica de arqueas metanógenas

Para estudiar el efecto a corto plazo de un incremento de temperatura en la expresión génica de las arqueas metanógenas, se seleccionaron 16 lagunas representativas de las principales categorías de humedales mediterráneos: salinas de interior, costeras (incluyendo deltaicas), lagunas no salinas de interior y lagunas volcánicas. Para estos experimentos, dichas lagunas fueron muestreadas de forma única en un periodo concreto del ciclo hidrológico.

En cada una de estas lagunas, se recogieron réplicas de testigos de sedimento en tubos de metacrilato con la misma metodología descrita en el apartado 2.2 de este mismo capítulo. Se realizaron incubaciones de estos testigos a diferentes temperaturas, 4°C, 14°C y 25°C en cámaras climáticas. En cada temperatura se incubaron 6 replicados durante 2-5 días dependiendo de la temperatura de incubación. Una vez terminada la incubación, se eligieron al azar tres testigos. Estos tres testigos se destaparon y de cada uno se extrajo una porción de sedimento, que se homogeneizó con una varilla metálica y se dispuso en un eppendorf, el cual se congeló inmediatamente mediante nitrógeno líquido y se conservó a una temperatura de -80°C hasta el posterior procesado y extracción del material genético.

El proceso de recolección y congelación de las muestras se realizó en menos de un minuto para mantener el perfil de expresión génica de la comunidad de procariotas, ya que la vida media del ARN es muy corta. A su vez, inmediatamente después de destapar el testigo y de recoger la muestra de sedimento se midió la concentración de metano en cada uno de ellos como se ha descrito en el apartado 2.2 de este mismo capítulo.

De los tres replicados de sedimento de cada temperatura congelados, se eligieron dos de cada temperatura al azar, de los cuales se extrajeron los ácidos nucleicos totales mediante el kit de extracción Rneasy PowerSoil Total RNA Kit, al cual se acopló el kit Rneasy PowerSoil DNA Elution Kit. De esta forma, del mismo sedimento (aproximadamente 300 mg) se extrajo a la vez el ADN y el ARN. El ARN se digirió con una DNAsa para eliminar los posibles restos de ADN mediante el kit TURBO DNA-free, y se retrotranscribió a ADN copia o cDNA mediante el kit SuperScript III RT, que utiliza como primers hexámeros con secuencias al azar para así retrotranscribir todo el ARN a cDNA. Posteriormente, del ADN extraído y del cDNA se secuenció la región V4 del gen que codifica para el 16S rRNA y se procesaron las secuencias como se ha descrito en la sección 2.3 de este capítulo.

La tabla de ZOTUs obtenida por el procesamiento de estas secuencias fue la base para inferir el potencial metabólico mediante PICRUSt2, como se ha descrito en la sección 2.4 de este capítulo. No obstante, los resultados de inferencia metabólica inferidos por PICRUSt2 se normalizaron por copias de gen *recA*, obtenidos en el propio análisis de PICRUSt2, ya que los procariotas solo tienen una copia de este gen por genoma (Florindo *et al.* 2012) lo que permite comparar los *gene counts* obtenidos.

Además, a partir de este cDNA se realizaron PCR cuantitativas (qPCR) con primers específicos (Tabla 2.3) para el gen 16S de arqueas metanógenas y para el gen que codifica para la subunidad α de la enzima mcr (*mcrA*), que interviene en el último paso de la metanogénesis. Los dos sets de primers tienen una buena cobertura de los diferentes grupos de metanógenos (Compte-Port *et al.* 2018).

Tabla 2.3. *Primers* y condiciones para las cuantificaciones mediante qPCR.

| Gen diana | Primer | Secuencia (5' – 3') | T ^a annealing |
|----------------------|----------|-------------------------|--------------------------|
| 16S rRNA Metanógenos | Met 630F | GGATTAGATACCCSGGTAGT | 62 °C |
| | Met 803R | GTTGARTCCAATTAACCGCA | |
| Gen <i>mcrA</i> | ME3MF | ATGTCNNGGTGGHGTGGSTTYAC | 57 °C |
| | ME3r' | TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT | |

Los estándares para la recta patrón de la qPCR se realizaron a partir de ADN genómico extraído de un cultivo puro de *Methanobacterium* sp. para el gen 16S de metanógenos y de *Methanosaeta* sp. para el gen *mcrA*. Las copias absolutas por μl del gen 16S de metanógenos y del gen *mcrA* se cuantificaron mediante qPCR a partir del cDNA extraído. En cada muestra las qPCR se hicieron por duplicado. Además, en cada qPCR se realizaron amplificaciones por triplicado de muestras de agua sin material genético para verificar la ausencia de contaminación. Las mezclas reactivas para la qPCR se llevaron a cabo mezclando cada par de *primers* (10 mM) con una *hot start master mix* (LightCycler 480 de Roche) y con agua de biología molecular hasta un volumen final de 30 μl . Para el gen 16S de metanógenos, el ciclo de qPCR consistió en un ciclo de 3 minutos a una temperatura de 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a una temperatura de 95°C y 30 segundos a una temperatura de 62°C. Para el gen *mcrA*, el ciclo de qPCR consistió en un ciclo de 3 minutos a una temperatura de 94°C, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a una temperatura de 94°C y 30 segundos a una temperatura de 57°C. La especificidad de las reacciones se comprobó mediante un análisis de la curva de disociación y mediante la posterior electroforesis de los productos de qPCR, donde se comprobó que la banda que aparecía en el gel de agarosa mostraba el peso molecular adecuado. Después de las cuantificaciones, se calculó el número de transcritos de gen 16S de metanógenos o de gen *mcrA* por gramo de peso seco de sedimento.

2.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas Primer 7 y R. Dos Principal Correspondence Analysis (PCO), uno para el agua y otro para el sedimento, se realizaron con las matrices de distancias euclídeas de las variables ambientales transformadas y normalizadas con el fin de observar la ordenación de los humedales en base a sus variables ambientales. Por otra parte, con las tablas de ZOTUs rarefactadas se efectuaron varios análisis. Así, a partir de ellas se llevó a cabo el análisis LefSe (Segata *et al.* 2011) y se calcularon los índices IndVal (Dufrêne y Legendre 1997). Además, estas tablas rarefactadas fueron estandarizadas y transformadas para después obtener a partir de ellas las matrices de distancia de Bray-Curtis. Estas matrices se utilizaron para comprobar las diferencias estadísticas entre las comunidades de procariotas de las diferentes categorías de humedal y estados de conservación mediante un análisis PERMANOVA (999 permutaciones) (Anderson 2001). Además, dichas matrices fueron la base para llevar a cabo los análisis de ordenación *distance-based redundancy Analysis* (dbRDA) (Legendre y Anderson 1999) y así observar el efecto de las variables ambientales en la ordenación de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento. Previamente, las variables ambientales se transformaron y se normalizaron. Tanto para el agua como para el sedimento, se incluyeron en la matriz de variables ambientales las tasas de producción primaria bruta (GPP), de respiración aerobia y de emisión de metano.

En el capítulo 3, para detectar los taxones característicos de cada categoría de salinidad y de cada estado de conservación se utilizó el análisis LefSe. En el capítulo cuarto, para observar la relación entre los humedales y los ZOTUs más importantes en cada uno de ellos, se realizó un HeatMap considerando los ZOTUs con una abundancia total mayor del 0,5% para el agua y del 0,3%

para el sedimento. En el capítulo 5, con el fin de detectar los taxones característicos para las diferentes categorías de humedal y estados de conservación se utilizaron los índices IndVal. Sólo se consideraron los ZOTUs con un valor IndVal $R \geq 0,7$ y un $p < 0,05$. En el capítulo 7, con el fin de detectar si había diferencias significativas entre las comunidades de procariotas de las grandes categorías de humedales estudiadas, se utilizó un análisis ANOSIM, que es un test no paramétrico cuyo estadístico asociado, llamado R, se puede utilizar como una medida universal de *effect size* (de forma similar a un coeficiente de correlación), es decir, mide la magnitud del cambio global de la comunidad asociada al factor que se estudia (Somerfield *et al.* 2021), en este caso la categoría de humedal. Así, cuanto más elevado es el valor de R, más grande es ese cambio. Por otra parte, para determinar el grado de similitud de las comunidades de procariotas entre los humedales que conforman cada categoría de humedal, se utilizó un análisis SIMPER (Clarke 1993), mediante el que se puede obtener la similitud entre las diferentes muestras de una misma agrupación, en este caso la categoría de humedal.

Resultados

Capítulo 3. Lagunas salinas de interior.

En este capítulo, se describen los factores que determinan la estructura y los metabolismos relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento de 15 lagunas representativas de las lagunas salinas de interior de la región mediterránea española. Estas lagunas se clasificaron en 5 categorías según su salinidad: lagunas bicarbonatado-sódicas, lagunas hiposalinas, lagunas mesosalinas, lagunas hipersalinas temporales y laguna hipersalina permanente. Además, cada laguna presentó un estado de conservación diferente: conservada, restaurada, con alteración hidrológica y con alteración trófica e hidrológica.

3.1. Características ambientales de las lagunas salinas de interior

Los valores de las principales variables ambientales del agua de las lagunas estudiadas están representados en la Tabla 3.1 Los valores de las demás variables del agua y del sedimento se encuentran en el Anexo 1.

Esta categoría de lagunas presenta un marcado gradiente de salinidad, en el extremo con conductividades menores se encuentran las lagunas bicarbonatado-sódicas y las hiposalinas, que presentan valores promedio bajos, como los $5,4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ en la laguna de Caballo Alba, mientras que las conductividades mayores se observaron en las lagunas hipersalinas temporales y permanentes con conductividades superiores a $60 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. La Laguna de Tírez presentó valores bajos de conductividad porque en el momento del muestreo aún se encontraba en el principio de la fase de llenado. Por otra parte, los valores más altos de pH y de alcalinidad se encontraron en las lagunas bicarbonatado-sódicas, con pHs en torno a 9,5 y alcalinidades mayores de $38 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que el resto de las categorías presentaron valores de pH en torno a 8 y alcalinidades menores de $20 \text{ meq}\cdot\text{L}^{-1}$.

Resultados – Lagunas salinas de interior

Tabla 3.1. Valores promedio (\pm Desviación Estándar) de las principales variables ambientales del agua de las lagunas estudiadas. *: Alteración hidrológica. **: Alteración trófica e hidrológica. Cond: Conductividad. Chl-*a*: Clorofila-*a*. LOI: materia orgánica. Alc: Alcalinidad. (n.d. – no determinado)

| Categoría salinidad | Lake | n | Cond (mS·cm ⁻¹) | pH | Chl- <i>a</i> (µg·L ⁻¹) | LOI (mg·L ⁻¹) | Alc (meq·L ⁻¹) |
|---------------------------------|---------------|---|-----------------------------|------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Lagunas Bicarbonatado - sódicas | <i>ALBA</i> | 1 | 5,4± n.d. | 9,5± n.d. | 1,6± n.d. | 14,5± n.d. | 38,1± n.d. |
| | <i>IGLE**</i> | 3 | 8,1 ± 4,4 | 9,6 ± 0,1 | 23,1 ± 17,0 | 31,4 ± 24,7 | 41,5 ± 1,7 |
| Lagunas Hiposalinas | <i>GVIF*</i> | 3 | 9,6 ± 0,5 | 8,5 ± 0,6 | 2,1 ± 0,4 | 4,5 ± 0,2 | 2,7 ± 0,1 |
| | <i>HITO</i> | 1 | 8,6± n.d. | 8,2± n.d. | 15,66± n.d. | 12,0± n.d. | 1,6± n.d. |
| | <i>MUSC</i> | 1 | 6,2± n.d. | 7,4± n.d. | 0,2± n.d. | 4,9± n.d. | 6,2± n.d. |
| Lagunas Mesosalinas | <i>CLOG*</i> | 3 | 28,9 ± 1,6 | 8,3 ± 0,3 | 3,3 ± 3,2 | 16,6 ± 12,3 | 3,8 ± 0,3 |
| | <i>CSEC</i> | 1 | 38,7± n.d. | 8,2± n.d. | 29,1± n.d. | 22,8± n.d. | 7,7± n.d. |
| | <i>MANJ**</i> | 3 | 42,9 ± 18,5 | 8,31 ± 0,4 | 22,5 ± 19,3 | 179,9 ± 162,2 | 9,7 ± 2,8 |
| | <i>TOLL</i> | 3 | 39,2 ± 22,7 | 8,2 ± 0,87 | 0,5 ± 0,1 | 4,1 ± 2,3 | 2,2 ± 0,2 |
| | <i>ZORR</i> | 3 | 61,4 ± 55,44 | 8,3 ± 0,9 | 7,8 ± 4,1 | 50,7 ± 28,7 | 7,8 ± 4,5 |
| Lagunas Hipersalinas Temporales | <i>ALCH</i> | 2 | 198,0 ± 8,0 | 7,6 ± 0,7 | 23,5 ± 15,9 | 302,2 ± 200,3 | 12,8 ± 6,5 |
| | <i>GALL</i> | 2 | 197,2 ± 152,8 | 7,3 ± 0,3 | 26,7 ± 3,2 | 383,0 ± 333,9 | 9,7 ± 4,5 |
| | <i>SALI</i> | 2 | 64,3 ± 27,3 | 8,1 ± 0,3 | 64,0 ± 9,5 | 226,3 ± 152,4 | 9,7 ± 4,8 |
| | <i>TIRE</i> | 1 | 19,6± n.d. | 8,8± n.d. | 4,6± n.d. | 140,7± n.d. | 4,6± n.d. |
| Laguna Hipersalina Permanente | <i>CHIP</i> | 3 | 95,1 ± 47,0 | 8,1 ± 0,2 | 4,7 ± 3,6 | 113,5 ± 122,4 | 19,6 ± 8,6 |

Los valores de materia orgánica del agua aumentaron a lo largo del gradiente de salinidad alcanzando los valores máximos en las lagunas hipersalinas temporales, y presentando a su vez valores elevados en las lagunas con alteración trófica e hidrológica. Además, la concentración de clorofila-*a* alcanzó las concentraciones más altas en las lagunas hipersalinas temporales y en las que presentaban alteración trófica e hidrológica, con valores por encima de 20 µg·L⁻¹.

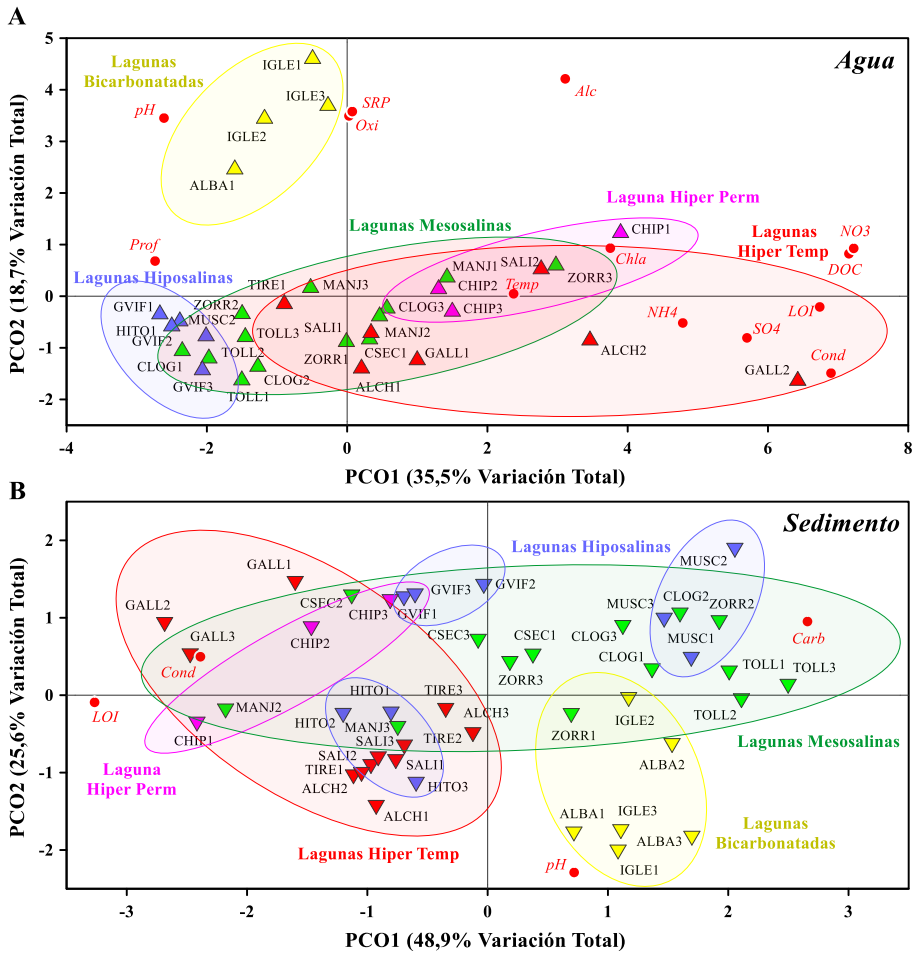


Figura 3.1. PCO de las muestras de agua (A) y de sedimento (B) en base a sus variables ambientales. Los códigos de las lagunas están descritos en la Tabla 2.1. Los números adyacentes a los códigos de las lagunas indican los periodos de muestreo: 1 (llenado), 2 (óptimo) y 3 (secado). Los colores de los símbolos que representan a las lagunas indican la categoría de salinidad a la que pertenecen: lagunas bicarbonatado-sódicas (amarillo), lagunas hiposalinas (azul), lagunas mesosalinas (verde), lagunas hipersalinas temporales (rojo) y laguna hipersalina permanente (rosa). Variables ambientales: Chla (clorofila-*a*), Alc (alcalinidad), LOI (materia orgánica), DOC (carbono orgánico disuelto), NH₄ (amonio), Oxi (Oxígeno), Temp (Temperatura), SRP (ortofosfato reactivo soluble), Cond (conductividad), NO₃ (nitrato), SO₄ (sulfato), Prof (profundidad), pH y Carb (carbonato).

Por lo que respecta a la ordenación de las muestras de agua en base a sus variables ambientales (Figura 3.1-A), la conductividad fue un factor ambiental

clave para separar las diferentes categorías que agrupan las lagunas. Las lagunas bicarbonatado-sódicas fueron las más diferentes, puesto que se encontraron separadas de las demás debido a los altos valores de pH, alcalinidad, SRP y oxígeno que presentaron. El resto de las categorías de salinidad estuvieron parcialmente solapadas en la ordenación, ya que generalmente, y siguiendo el gradiente de salinidad de forma ascendente, las lagunas con los valores más altos de conductividad dentro de una categoría presentaron valores de conductividad similares a los de las lagunas con las conductividades más bajas de la siguiente categoría de salinidad. A pesar de esto, cada categoría de salinidad presentó características específicas. Las lagunas hipersalinas temporales y permanentes mostraron altos valores de materia orgánica, sulfato y nitrato. Las lagunas mesosalinas presentaron unos valores de materia orgánica más moderados, mientras que las lagunas hiposalinas mostraron los valores más bajos de materia orgánica, sulfato, nitrato y amonio.

En cuanto a la ordenación de las muestras de sedimento (Figura 3.1-B), éstas siguieron unos patrones similares a los de las muestras de agua, mostrándose la conductividad como la variable ambiental de más peso para diferenciar las diferentes categorías de salinidad. A su vez, las lagunas bicarbonatado-sódicas fueron las más diferentes mientras que las demás categorías de salinidad se encontraron parcialmente solapadas debido a motivos similares a los de las muestras de agua. No obstante, dichas categorías de salinidad también mostraron características específicas. Así, las lagunas bicarbonatado-sódicas presentaron elevados valores de pH, mientras que las lagunas hipersalinas mostraron altos valores de materia orgánica y las lagunas mesosalinas tenían valores de carbonato más elevados. Por otra parte, las lagunas hiposalinas no formaron un grupo bien definido, pero tenían en común unos valores bajos o moderados de conductividad.

3.2. Patrones generales y taxones marcadores

La clasificación taxonómica a partir de los amplicones del gen que codifica para el 16S rRNA resultó en 55 filos para el agua y 66 para el sedimento. A un nivel general (Figura 3.2), el filo más representado tanto en agua como en sedimento fue Proteobacteria, al cual pertenece la familia *Rhodobacteraceae*, que se encontró distribuida a lo largo de todo el gradiente de salinidad. Con respecto al agua, otro filo dominante fue Cyanobacteria, pero en este caso su abundancia se incrementó en los meses más cálidos, especialmente en las lagunas que presentaban alteración trófica e hidrológica. En el sedimento el filo Firmicutes mostró una gran representación en las lagunas conservadas, especialmente en las lagunas hipersalinas temporales y en la Laguna de El Hito, debido a la gran abundancia relativa de la familia *Streptococcaceae*, la cual se encuentra asociada a contaminación fecal. Por lo que respecta a las diferencias estadísticas entre las comunidades de procariontes de las diferentes categorías de salinidad, tanto en el agua como en el sedimento las comunidades de todas las categorías de salinidad fueron significativamente diferentes entre ellas ($p < 0,01$). Respecto a las comunidades de los diferentes estados de conservación, tanto en agua como en sedimento también hubo diferencias significativas entre ellas ($p < 0,01$).

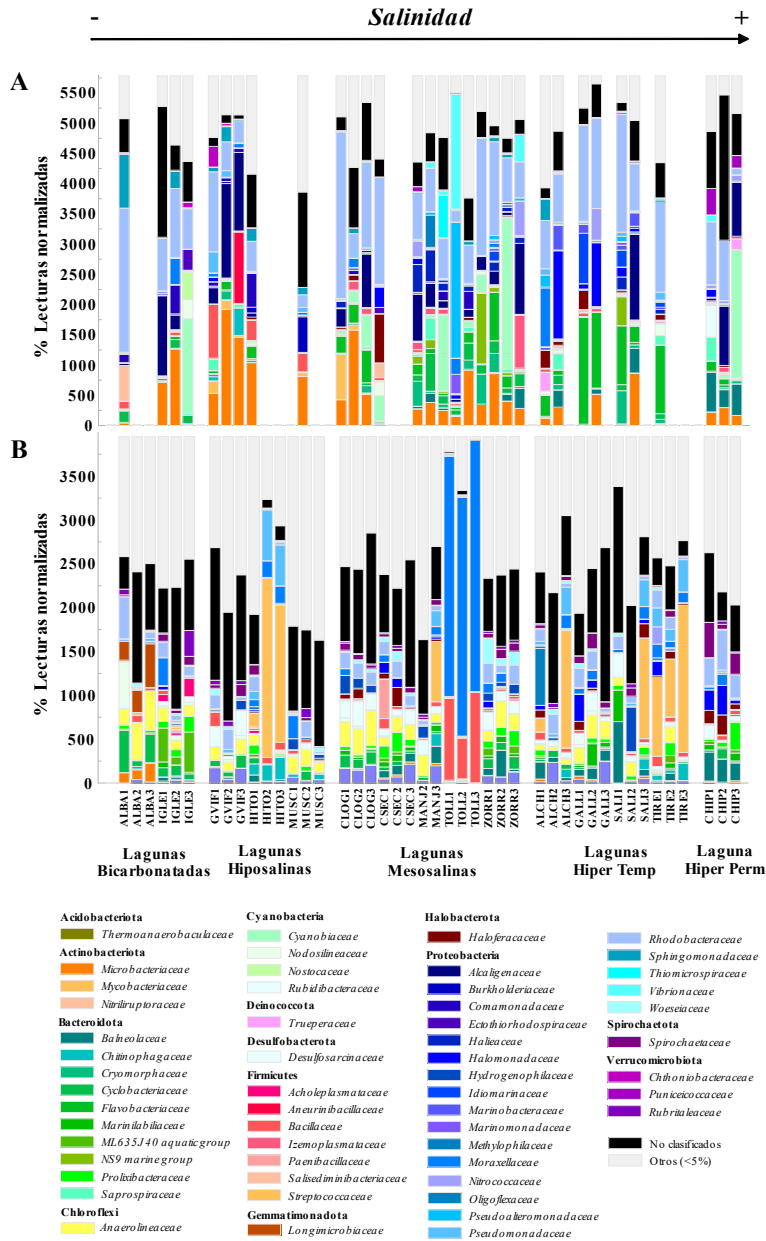


Figura 3.2. Abundancias relativas de las familias de procariontes del agua (A) y del sedimento (B) de las lagunas estudiadas. Las familias están agrupadas por filo. En el agua, las barras vacías indican que en ese periodo de muestreo la laguna estaba seca. En la leyenda, “Otros” se refiere a las familias que presentaron una abundancia relativa menor del 5%.

Por otra parte, los resultados del análisis discriminante LefSe mostraron que tanto en el agua como en el sedimento las diferentes categorías de salinidad y estados de conservación en que se agrupan las lagunas presentaron taxones característicos (Figuras 3.3 y 3.4). Además, esta especificidad de los taxones (respecto al LDA score, cuanto mayor es su valor, más capacidad discriminante tiene el taxón) no estaba directamente relacionada con un peso grande de dichos taxones en el total de la comunidad de procariotas, ya que algunos tuvieron una gran abundancia relativa mientras otros fueron poco abundantes en la comunidad general. En el agua los taxones característicos de Bacteria estuvieron distribuidos por todas las categorías de salinidad, mientras que los característicos de Archaea se encontraron solamente en las de mayor salinidad o mejor estado de conservación. Además, algunos taxones característicos presentes en las lagunas alteradas tienen la capacidad de degradar y utilizar compuestos complejos de carbono.

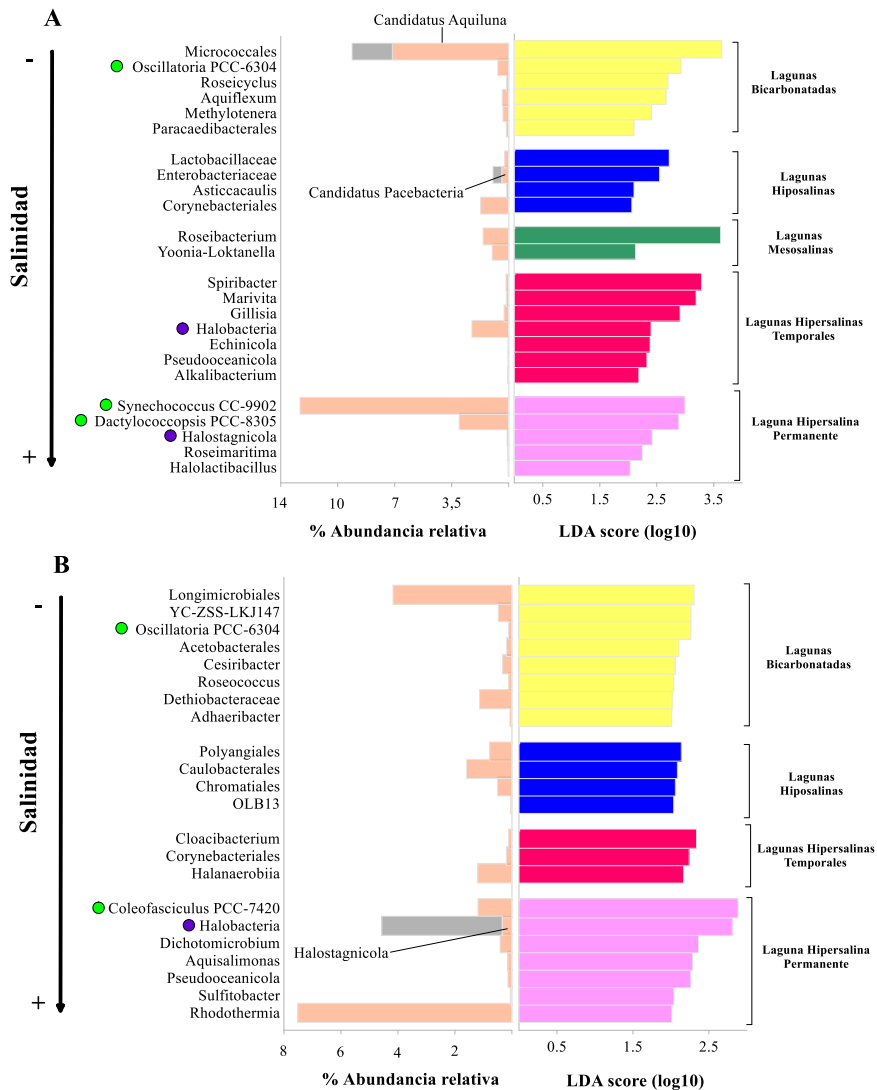


Figura 3.3. Taxones característicos obtenidos con el análisis discriminante LefSe de las diferentes categorías de salinidad en que se agrupan las lagunas para el agua (A) y el sedimento (B). Se muestra el LDA score y la abundancia relativa promedio de cada taxón. En las barras apiladas, la abundancia del taxón de más alto nivel siempre corresponde a la barra más grande mientras que la abundancia del taxón de nivel más bajo, que es responsable de una parte de la abundancia del taxón de nivel superior, se representa con una barra pequeña. Los taxones cianobacterianos se han resaltado con un círculo verde y los de Archaea con un círculo morado.

En el agua (Figura 3.3-A), el taxón más característico de las lagunas bicarbonatado-sódicas correspondió al género *Candidatus Aquiluna*, que además mostró una gran abundancia relativa, mientras que los siguientes taxones con más peso diferencial correspondieron a organismos fotótrofos, concretamente el género cianobacteriano *Oscillatoria* y el género bacteriano fotótrofo *Roseicyclus*, ambos con una abundancia relativa pequeña. En las lagunas hiposalinas, los taxones más característicos fueron la familia *Lactobacillaceae* y el género *Candidatus Pacebacteria* dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que las lagunas mesosalinas fueron las que menos taxones característicos mostraron, los géneros *Roseibacterium* y *Yoonia-Loktanella*. Los taxones que caracterizaron las lagunas hipersalinas temporales fueron generalmente halófilos, como el género *Spiribacter*. Además, en estas lagunas las arqueas mostraron un papel relevante como microorganismos característicos, puesto que la clase *Halobacteria*, formada por microorganismos halófilos, fue el taxón diferencial con una mayor abundancia relativa. En cuanto a la laguna hipersalina permanente, las cianobacterias destacaron como organismos característicos, ya que dos géneros, *Synechococcus* y *Dactylococcopsis*, mostraron una gran abundancia relativa en esta laguna además de un gran peso como taxones característicos, mientras que el tercer organismo con más peso como marcador, la arquea halófila *Halostagnicola*, presentó una abundancia relativa muy baja. Por lo que respecta al sedimento (Figura 3.3-B), el taxón más característico correspondiente a las lagunas bicarbonatado-sódicas fue el orden *Longimicrobiales*, con una gran abundancia relativa.

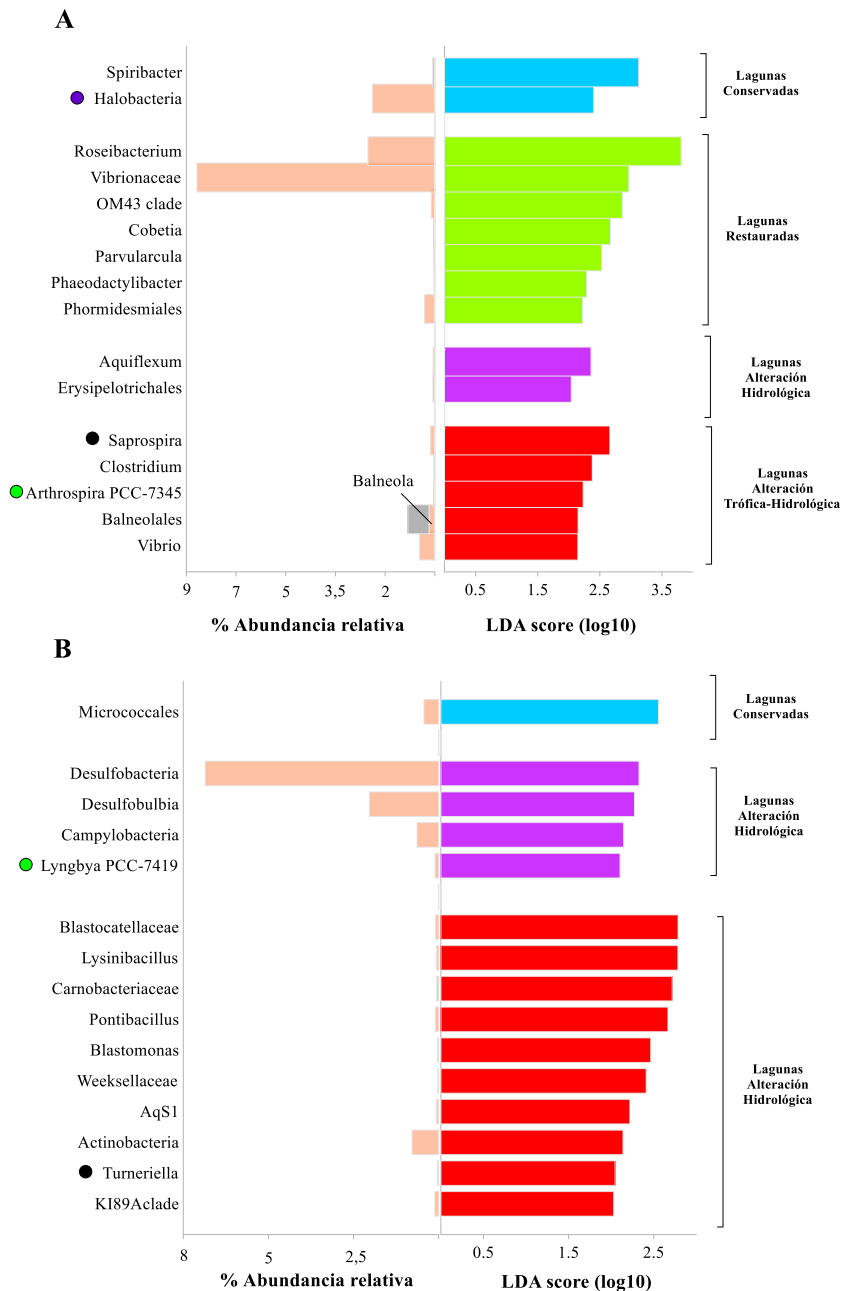


Figura 3.4. Taxones característicos obtenidos con el análisis discriminante LefSe de los diferentes estados de conservación en que se agrupan las lagunas para el agua (A) y el sedimento (B). Se muestra el LDA score y la abundancia relativa promedio de cada taxón. En las barras apiladas, la abundancia del taxón de más alto nivel siempre corresponde a la barra más grande

mientras que la abundancia del taxón de nivel más bajo, que es responsable de una parte de la abundancia del taxón de nivel superior, se representa con una barra pequeña. Los taxones cianobacterianos se han resaltado con un círculo verde, los de Arquea con un círculo morado y los géneros con capacidad de metabolizar compuestos complejos de carbono con un círculo negro.

En las lagunas hiposalinas, los taxones más característicos fueron tres órdenes (*Polyangiales*, *Caulobacterales* y *Chromatiales*), que presentaron una abundancia relativa moderada, mientras que las lagunas mesosalinas no presentaron ningún taxón característico. Por lo que respecta a las lagunas hipersalinas temporales, el taxón con mayor abundancia relativa fue la clase bacteriana *Halanaerobiia*, mientras que en la laguna hipersalina permanente el taxón más característico fue el género cianobacteriano *Coleofasciculus*, aunque la arquea halófila *Halostagnicola* fue el segundo taxón más característico y la clase bacteriana *Rhodothermia*, formada mayoritariamente por microorganismos halófilos, mostró una gran abundancia relativa.

Por otra parte, en el agua (Figura 3.4-A) los taxones característicos de las lagunas con un buen estado de conservación fueron el género bacteriano *Spiribacter* y la clase arqueana *Halobacteria*. En cuanto a las lagunas restauradas, la familia *Vibrionaceae*, que incluye organismos halófilos, presentó una gran abundancia relativa. Las lagunas con alteración hidrológica presentaron sólo dos taxones característicos, el género *Aquiflexum* y el orden *Erysipelotrichales*, mientras que en las lagunas con alteración trófica e hidrológica el orden *Balneolales* presentó la abundancia relativa más elevada, pero otros taxones relevantes fueron las cianobacterias, representadas por el género *Arthrospira*, y el género *Saprospira*, el cual forma parte de la familia *Saprospiraceae* (filo Bacteroidota), cuyos miembros son capaces de degradar y utilizar compuestos complejos de carbono. En el sedimento (Figura 3.4-B), las lagunas conservadas sólo mostraron un taxón característico, el orden *Micrococcales*, con una abundancia relativa baja. Las lagunas restauradas no

mostraron ningún taxón característico. En las lagunas alteradas hidrológicamente, la clase *Desulfobacteria* fue el taxón más característico y a su vez el que mayor abundancia relativa presentaba, aunque el género cianobacteriano *Lyngbya*, a pesar de su baja abundancia relativa, tenía también un importante peso como taxón característico. En las lagunas con alteración trófica e hidrológica la clase *Actinobacteria* fue el taxón con mayor abundancia relativa, aunque otro taxón relevante fue el género *Turneriella* (Filo Spirochaetota, familia *Leptospiraceae*), cuyas especies consumen ácidos grasos de cadena larga como principal fuente de carbono y energía.

3.3. *Metanogénesis y Metanotrofía*

La distribución de las bacterias metanótrofas y de las arqueas metanógenas mostró tendencias diferentes en las categorías de salinidad y en los estados de conservación (Figura 3.5). En cuanto a las bacterias metanótrofas del agua (Figura 3.5-A), su abundancia relativa más elevada se encontró en las lagunas bicarbonatado-sódicas, siendo significativamente mayor en estas lagunas en comparación con las hiposalinas, pero no se observaron diferencias con el resto de lagunas más salinas. Además, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la abundancia relativa de las bacterias metanótrofas del agua entre los diferentes estados de conservación (Figura 3.5-C), aunque las lagunas con alteración hidrológica mostraron una abundancia menor que las otras lagunas. Respecto a las arqueas metanógenas del sedimento, su abundancia relativa tendió a incrementarse a lo largo del gradiente de salinidad (Figura 3.5-B), y la familia mayoritaria en todas las categorías de salinidad y estados de conservación fue la familia *Methanomassiliicoccaceae*.

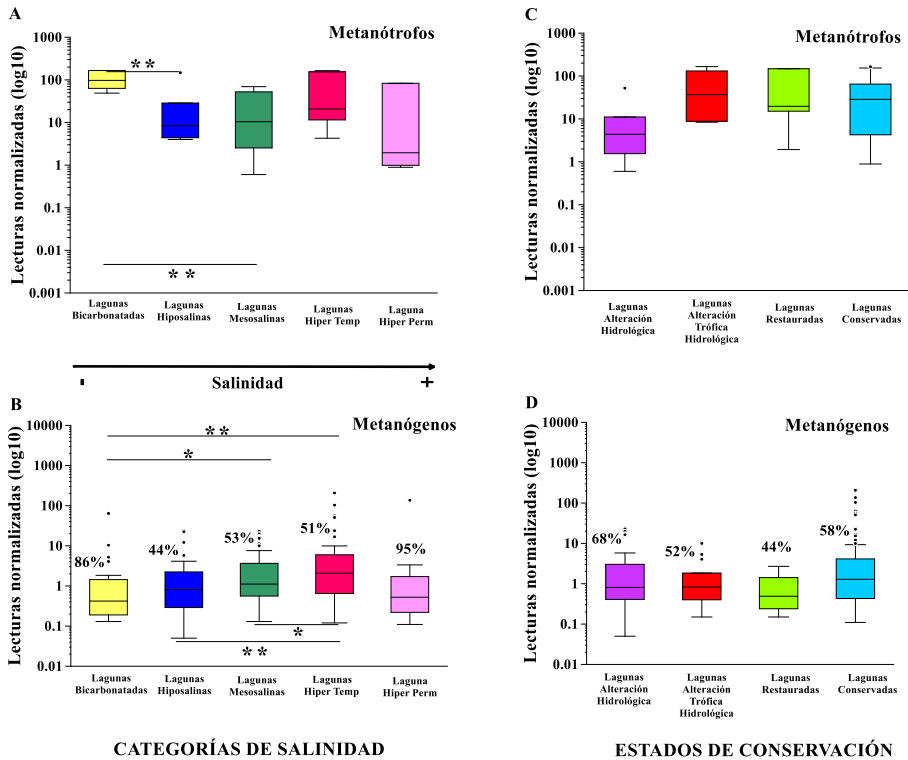


Figura 3.5. Diagramas de caja que muestran la distribución de la abundancia relativa (en escala logarítmica) de las bacterias metanótrofas del agua (A y C) y de las arqueas metanógenas del sedimento (B y D) a lo largo de las diferentes categorías de salinidad y estados de conservación. La línea interna de cada diagrama de caja representa la mediana. El porcentaje de lecturas de la familia *Methanomassiliicoccaceae* respecto al total de lecturas de metanógenos en cada categoría de salinidad y estado de conservación está indicado al lado de los respectivos diagramas de caja. Los valores atípicos (“outliers”) no se tuvieron en cuenta en los análisis estadísticos. *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$.

Las lagunas bicarbonatado-sódicas presentaron una abundancia baja de metanógenos y se diferenciaron significativamente de las lagunas mesosalinas y de las hipersalinas temporales. Por otra parte, la abundancia relativa de los metanógenos del sedimento se mantuvo en niveles similares en todos los diferentes estados de conservación (Figura 3.5-D), sin presentar diferencias significativas entre ellos.

3.4. Metabolismos del carbono medidos in situ e inferencia molecular

Para la producción primaria bruta (GPP) y la respiración aerobia se observó una correlación positiva significativa entre las tasas reales promedio y *gene counts* promedio de los respectivos genes marcadores (Figura 3.6-A y B). No obstante, de esta correlación se excluyeron las lagunas alteradas puesto que no presentaron una relación directa entre las tasas medidas y la inferencia génica. Por otra parte, las emisiones promedio de metano no mostraron una correlación significativa con *gene counts* promedio de los genes marcadores de metanogénesis en el sedimento y de metanotrofia en el agua (Figura 3.6-C y D).

A pesar de esto, la ratio de *gene counts* (*pmoA/mcrA*) fue más alta en las lagunas alteradas de baja salinidad, mientras que en las lagunas hipersalinas esta relación fue muy baja (Figura 3.6-E). Por lo que respecta a las diferentes rutas metanogénicas potenciales, se encontraron pocos *gene counts* de los genes marcadores de la metanogénesis metilotrófica (*mtmB* y *mtbB*), mientras que la inferencia de *gene counts* de los genes marcadores de la metanogénesis acetoclástica (*ackA*) y de la metanogénesis por reducción del CO₂ (*mch*) dio valores elevados tanto en el agua como en el sedimento, y en el caso del sedimento no mostraron ninguna correlación significativa con las emisiones de metano.

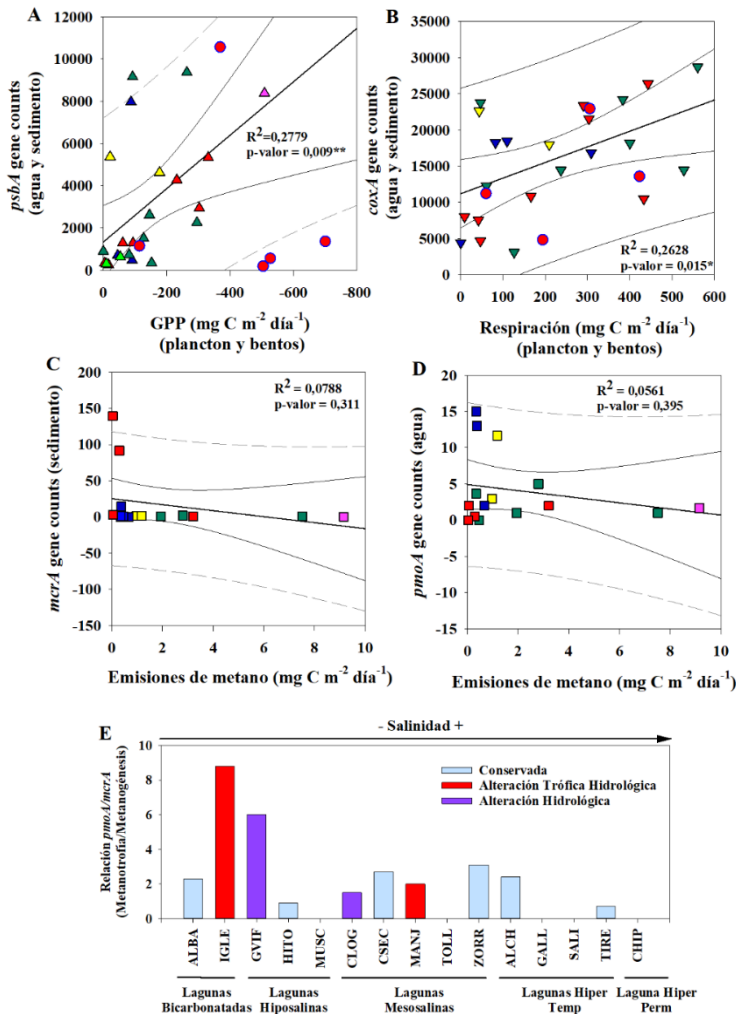


Figura 3.6. Regresiones entre los promedios por laguna de las tasas metabólicas y de *gene counts* de los respectivos genes marcadores obtenidos con PICRUST2. Los colores de los símbolos que representan a las lagunas indican la categoría de salinidad a la que pertenecen: lagunas bicarbonatado-sódicas (amarillo), lagunas hiposalinas (azul), lagunas mesosalinas (verde), lagunas hipersalinas temporales (rojo) y laguna hipersalina permanente (rosa). En A y B, los valores correspondientes a las lagunas alteradas (●) fueron eliminados del análisis. A: regresión entre las tasas de GPP y gene counts del gen *psbA* de agua y sedimento. B: regresión entre las tasas de respiración aerobia y gene counts del gen *coxA* de agua y sedimento. C: regresión entre las emisiones de metano y gene counts del gen *mcrA* del sedimento. D: regresión entre las emisiones de metano y gene counts del gen *pmoA* del agua. E: ratio entre gene counts del gen *pmoA* del agua y *mcrA* del sedimento. En E, la ausencia de barras en determinadas lagunas es debida a que en éstas gene counts del gen *mcrA* fueron 0. *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$.

3.5. *Redes de coocurrencia de las comunidades de procariotas*

Tanto en las redes de agua como de sedimento (Figuras 3.7 y 3.8), las diferentes categorías de salinidad, estados de conservación, periodos de muestreo y lagos individuales mostraron ZOTUs específicos. La red del agua presentó un *clustering coefficient* (que informa de la complejidad de la red) de 0,761 y una modularidad (que informa del grado de compartimentalización de la red) de 0,87, mostrando una mayor complejidad y compartimentalización que la red del sedimento, que mostró un *clustering coefficient* de 0,682 y una modularidad de 0,85.

En cuanto a las diferentes categorías de salinidad, tanto el agua como el sedimento presentaron una serie de ZOTUs que fueron cosmopolitas y que estuvieron presentes en todas las categorías de salinidad (Figura 3.9). Estos ZOTUs pertenecieron a diferentes familias, siendo las familias *Moraxellaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Streptococcaceae* las más abundantes. El *degree* total de las familias más abundantes se definió como la suma de los *degree* (número de conexiones) de los nodos individuales que fueron asignados a dichas familias. La abundancia total de cada familia se calculó sumando la abundancia de los nodos individuales que fueron asignados a cada familia. Así, los ZOTUs cosmopolitas a nivel de familia tuvieron una abundancia total bastante elevada pero un *degree* total muy bajo. Por otra parte, en el agua (Figura 3.9-A) los ZOTUs específicos de las diferentes categorías de salinidad presentaron a nivel de familia o bien una abundancia total baja pero un *degree* total alto o una abundancia total alta pero un *degree* total bajo. Este patrón se ejemplificó en las familias *Cyanobiaceae* y *Haloferacaceae*.

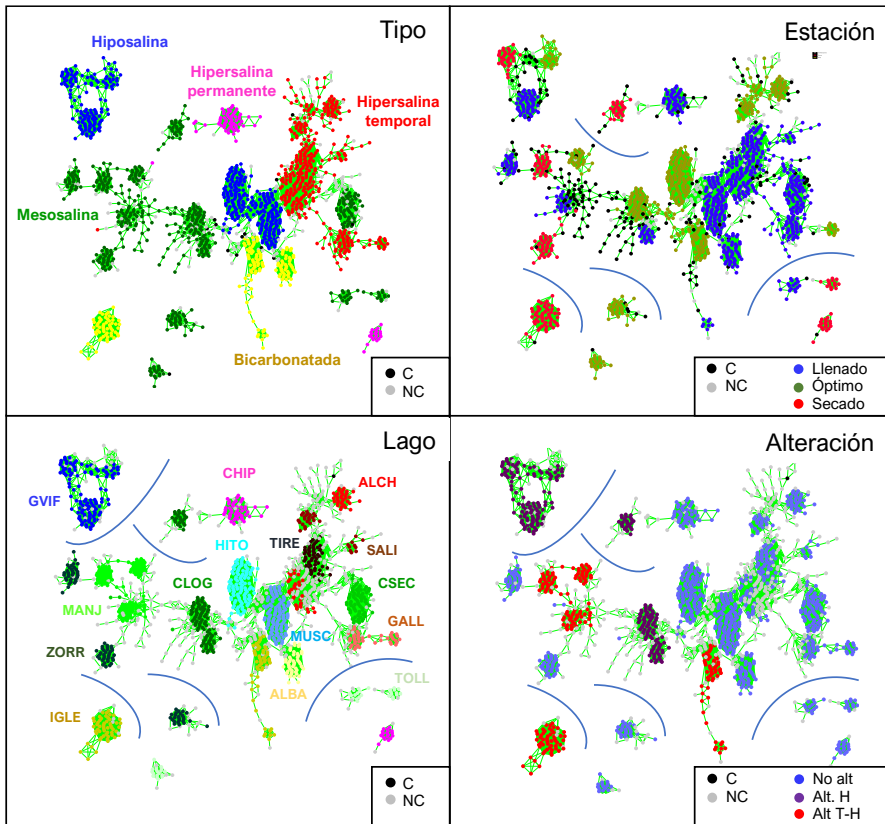


Figura 3.7. Red de coocurrencia de las comunidades de procariontes del agua. Los ZOTUs se han representado como nodos y las interacciones entre ellos en forma de líneas (*edges*). En la misma red se han representado las diferentes lagunas, categorías de salinidad, alteraciones y estaciones. Los códigos de las lagunas están descritos en la Tabla 2.1. En las leyendas, C se aplica a los ZOTUs presentes en todos los niveles del factor representado en la red (categoría de salinidad, estación, laguna o alteración). NC se aplica a los ZOTUs que están presentes sólo en algunos niveles de dichos factores.

La familia *Cyanobiaceae* (filo Cyanobacteria), que estuvo presente en casi todas las categorías de salinidad del agua, mostró una abundancia total muy elevada pero un *degree* total muy bajo, mientras que la familia *Haloferacaceae* (Archaea), que estuvo presente en las lagunas con mayor salinidad, fue la familia menos abundante, pero con el *degree* total más alto. En comparación, en el sedimento (Figura 3.9-B) la abundancia total de los

ZOTUs específicos de las diferentes categorías de salinidad tuvieron a nivel de familia una abundancia total menor que en el agua, pero un *degree* total más elevado. Además, en el sedimento los *degrees* totales más elevados se encontraron en las lagunas con menor salinidad.

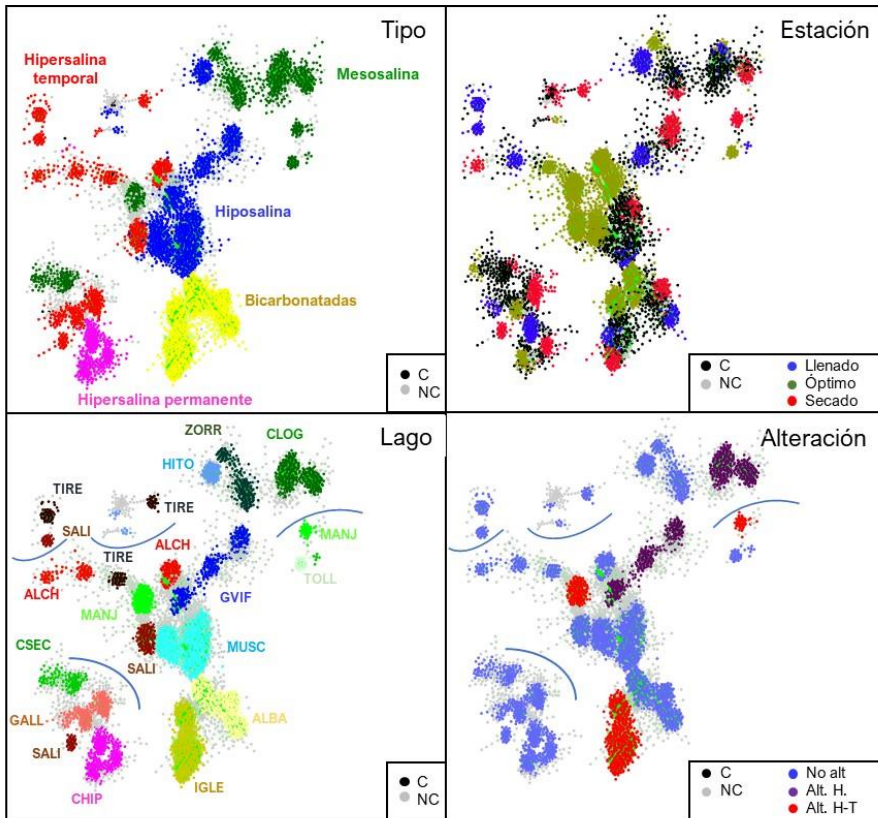


Figura 3.8. Red de coocurrencia de las comunidades de procariontas del sedimento. Los ZOTUs se han representado como nodos y las interacciones entre ellos en forma de líneas (*edges*). En la misma red se han representado las diferentes lagunas, categorías de salinidad, alteraciones y estaciones. Los códigos de las lagunas están descritos en la Tabla 2.1. En las leyendas, C se aplica a los ZOTUs presentes en todos los niveles del factor representado en la red (categoría de salinidad, estación, laguna o alteración). NC se aplica a los ZOTUs que están presentes sólo en algunos niveles de dichos factores.

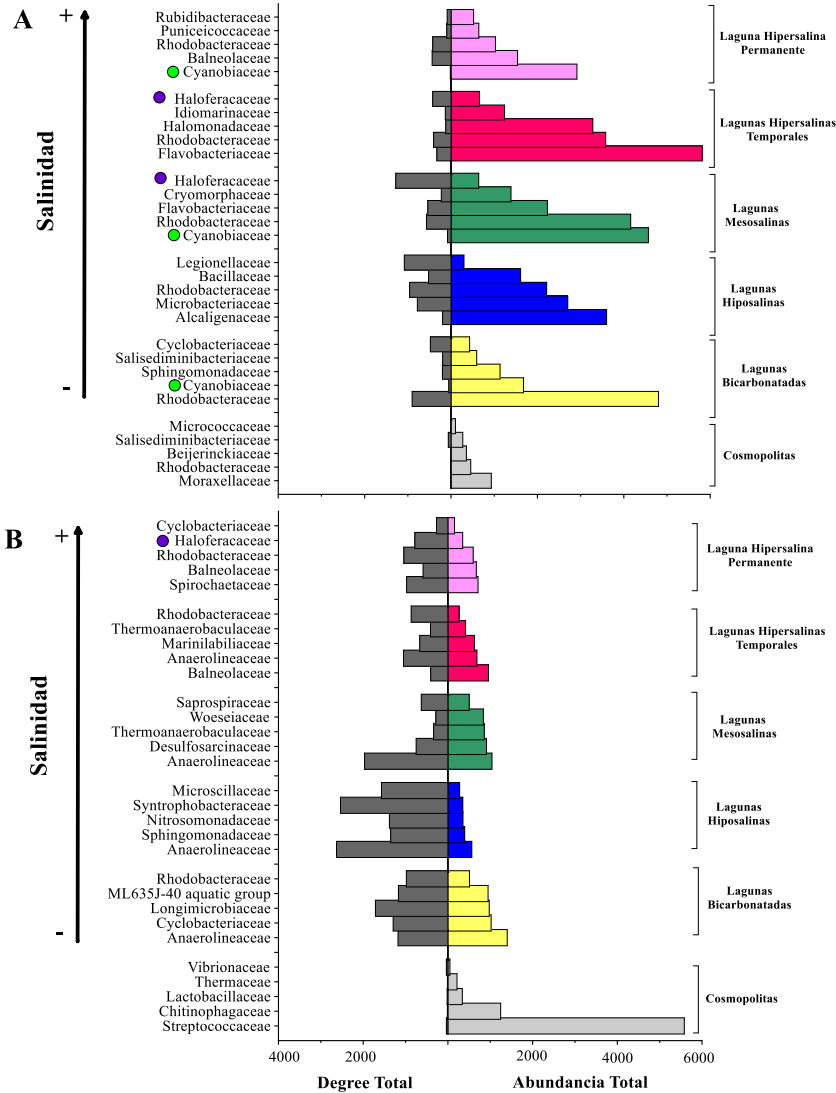


Figura 3.9. Abundancia y *degree* totales de las 5 familias más abundantes de las redes específicas de cada categoría de salinidad para el agua (A) y el sedimento (B). Las familias de cianobacterias se han resaltado con un círculo verde y las de arqueas con un círculo morado. C: familias cuyos ZOTUs estuvieron presentes en todas las categorías de salinidad (cosmopolitas).

Resultados – Lagunas salinas de interior

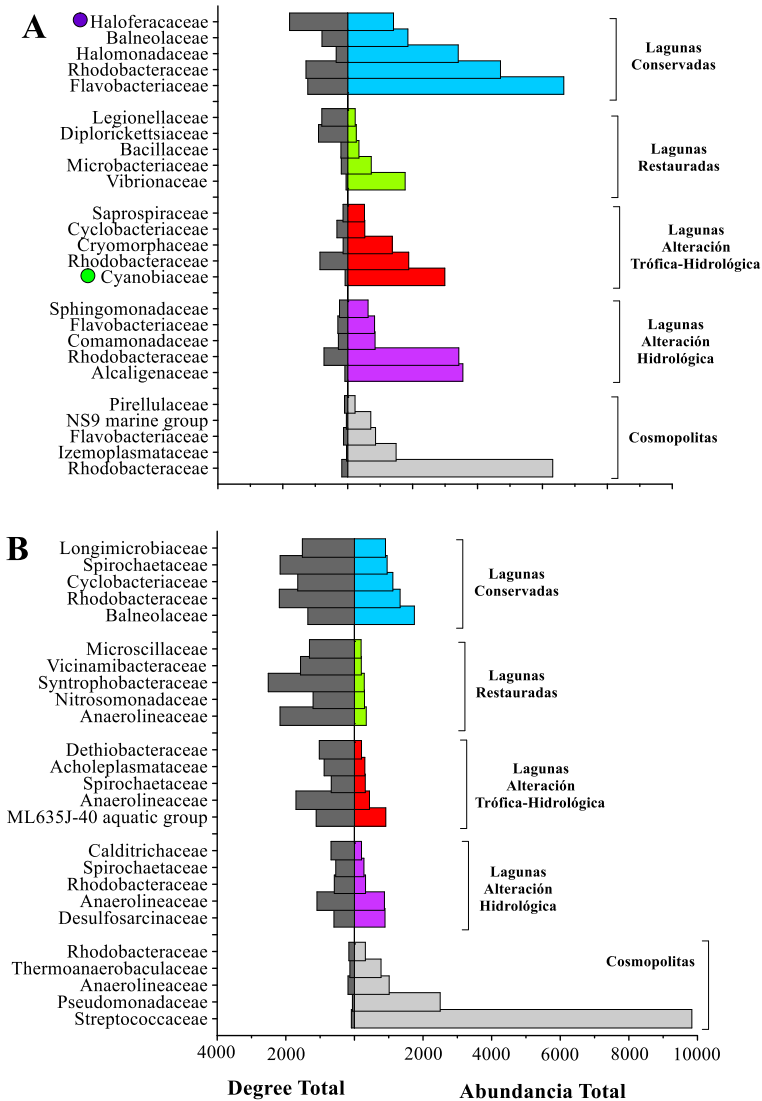


Figura 3.10. Abundancia y *degree* totales de las 5 familias más abundantes de las redes específicas de cada estado de conservación para el agua (A) y el sedimento (B). Las familias de cianobacterias se han resaltado con un círculo verde y las de arqueas con un círculo morado. C: familias cuyos ZOTUs estuvieron presentes en todos los estados de conservación (cosmopolitas).

Por otra parte, en los diferentes estados de conservación se repitieron los patrones descritos para el agua y el sedimento. Las familias a las que

pertenecieron los ZOTUs cosmopolitas, que son los ZOTUs presentes en todos los estados de conservación, tuvieron una abundancia total muy elevada pero un *degree* total muy bajo, sobre todo las familias *Rhodobacteraceae* y *Streptococcaceae*. En el agua (Figura 3.10-A), las familias con una abundancia total elevada presentaron un *degree* total bajo y viceversa, y los patrones descritos anteriormente para las familias *Haloferacaceae* y *Cyanobiaceae* se repitieron, siendo la familia *Haloferacaceae* la menos abundante, pero con el mayor *degree* total en las lagunas conservadas mientras que la familia *Cyanobiaceae* fue la más abundante en las lagunas con alteración trófica e hidrológica, pero a su vez la que mostró el menor *degree* total.

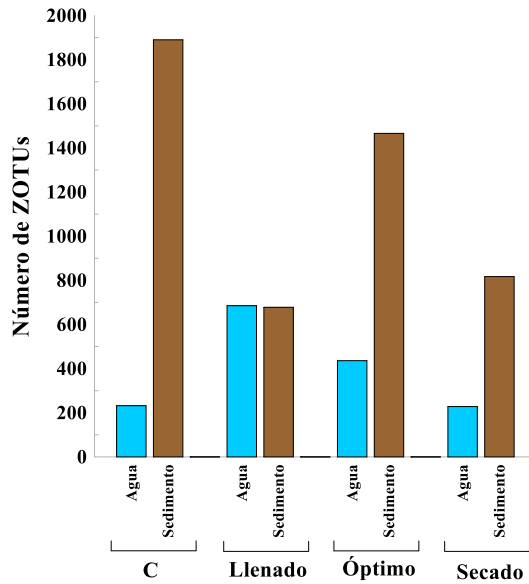


Figura 3.11. Distribución del número de ZOTUs presentes durante todo el año (C) y de los ZOTUs específicos de cada periodo de muestreo en las redes de coocurrencia del agua y del sedimento.

En cuanto al sedimento (Figura 3.10-B), al compararlo con el agua también se observó que las familias pertenecientes a cada estado de conservación

presentaron una menor abundancia total en el sedimento que en el agua, pero a su vez un mayor *degree* total respecto al agua. Además, tanto en el agua como en el sedimento las lagunas conservadas o restauradas fueron las que presentaron los *degrees* totales más elevados.

Respecto a la distribución de los ZOTUs en los diferentes periodos de muestreo (Figura 3.11), en la red del sedimento el número de ZOTUs presentes en todos los periodos de muestreo (C) fue muy elevado en comparación con el agua, y además el número de estos ZOTUs fue mayor que el número de ZOTUs específicos de cualquier periodo concreto, por lo que la gran mayoría de ZOTUs del sedimento no fueron estacionales y estuvieron siempre presentes a lo largo del tiempo, mientras que en el agua la mayoría de ZOTUs fueron estacionales y con pocos ZOTUs presentes en todos los periodos de muestreo (C).

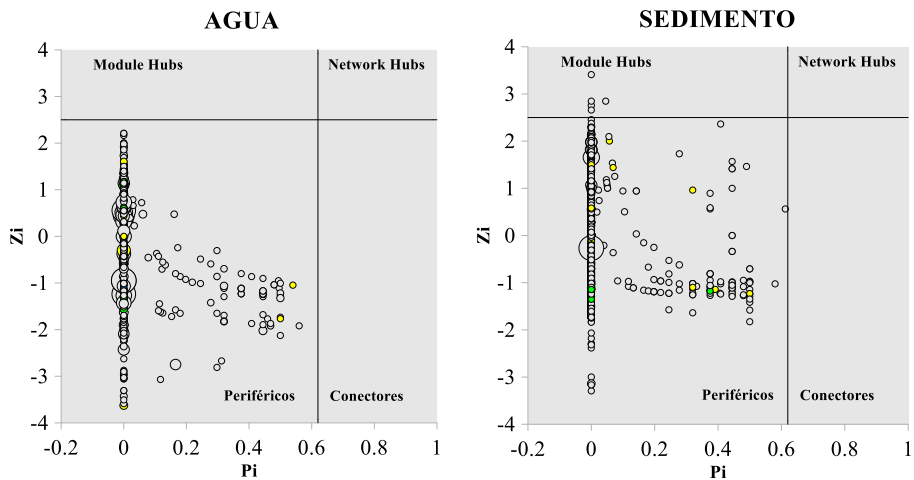


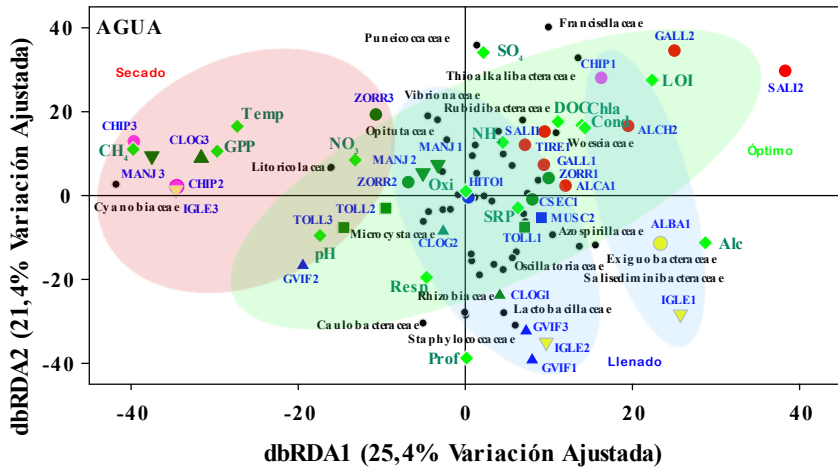
Figura 3.12. Gráfico P_i - Z_i que muestra, para el agua y para el sedimento, la distribución de los nodos que forman las redes de coocurrencia en base a sus roles topológicos. El tamaño del símbolo que representa a los nodos es proporcional a su abundancia en la red, y el color indica cuál de los siguientes genes está presente en el ZOTU al que representa el nodo: amarillo (*dsrB*), verde (*psbA*), azul (*pmoA*), negro (*mcrA*). Z_i : conectividad intramódulo. P_i : conectividad entre módulos.

En cuanto al rol topológico de los nodos que conforman la red (Figura 3.12), tanto en la red del agua como del sedimento la mayoría de los nodos se clasificaron como periféricos. Además, algunos nodos periféricos mostraron abundancias muy grandes, mientras la abundancia de otros nodos periféricos fue baja. Sólo se encontraron nodos clasificados como *module hubs* en la red del sedimento, los cuales se asignaron (último nivel taxonómico con asignación) a las familias *Balneolaceae* y *Spirochaetaceae*, a la clase *Anaerolineae* y a los filos Gemmatimonadota y Planctomycetota. Respecto a los genes relacionados con los metabolismos del carbono, tanto en el agua como en el sedimento sólo se presentaron en los nodos periféricos. En el agua, el gen más representado fue el *dsrB* (presente en 93 nodos) seguido del gen *psbA* (presente en 39 nodos). En el sedimento, el gen más representado fue el *dsrB* (presente en 326 nodos) seguido del gen *psbA* (presente en 69 nodos) y del gen *mcrA* (presente en 19 nodos).

3.6. Estructura y función de las comunidades de procariontas

Las comunidades del agua estuvieron determinadas por una combinación de categoría de salinidad, estado de conservación y estacionalidad (Figura 3.13-A). La clasificación de las lagunas salinas de interior en diferentes categorías de salinidad se vio reflejada en los diferentes factores ambientales que afectaron a las comunidades del agua. Así, las comunidades de las lagunas bicarbonatado-sódicas se vieron influenciadas por bajas conductividades y por altos niveles de alcalinidad, y presentaron una mayor abundancia de las familias *Exiguobacteraceae* y *Salisediminibacteriaceae*. Las comunidades de las lagunas hiposalinas y mesosalinas se vieron determinadas por valores bajos o medios de DOC y presentaron una mayor abundancia de las familias *Opitutaceae*, *Microcystaceae* y *Rhizobiaceae*.

A



B

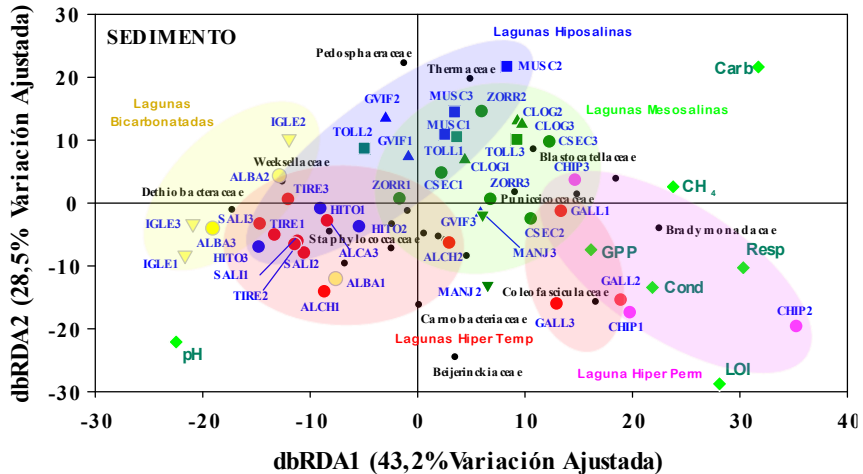


Figura 3.13. dbRDA mostrando la ordenación de las comunidades de procariotas del agua (A) y del sedimento (B) en base a las variables ambientales. Los códigos de las lagunas están descritos en la Tabla 2.1. Los números adyacentes a los códigos de las lagunas indican los periodos de muestreo: 1 (llenado), 2 (óptimo) y 3 (secado). El color de las elipses también indica el periodo de muestreo: azul (llenado), verde (óptimo) y rojo (secado). Los colores de los símbolos que representan a las lagunas indican la categoría de salinidad a la que pertenecen: lagunas bicarbonatado-sódicas (amarillo), lagunas hiposalinas (azul), lagunas mesosalinas (verde), lagunas hipersalinas temporales (rojo) y laguna hipersalina permanente (rosa). La forma de los símbolos que representan las lagunas indica el estado de conservación en el que se encuentran: conservadas (●), restauradas (■), con alteración hidrológica (▲) o con alteración trófica e hidrológica (▼). Variables ambientales: Chla (clorofila-*a*), Alc (alcalinidad), LOI (materia orgánica), DOC (carbono orgánico disuelto), NH₄ (amonio), Oxi (oxígeno), Temp

(temperatura), SRP (ortofosfato reactivo soluble), Cond (conductividad), NO₃ (nitrato), SO₄ (sulfato), Prof (profundidad), pH y Carb (carbonato). Tasas metabólicas: GPP (producción primaria bruta), Resp (respiración aerobia), CH₄ (emisiones de metano).

Las comunidades de las lagunas hipersalinas se vieron afectadas por altas concentraciones de sulfato y materia orgánica, y las familias *Thioalkalibacteraceae* y *Francisellaceae* fueron las más representadas en este grupo de lagunas. Por otra parte, la estacionalidad fue un factor muy relevante para la estructuración de las comunidades acuáticas de las lagunas, ya que las comunidades de los tres periodos de muestreo se encontraron separadas entre sí. Además, la combinación de alteración y estacionalidad se mostró como un factor muy importante para la estructura de las comunidades del agua de las lagunas alteradas, puesto que separó los muestreos más cálidos de estas lagunas, relacionados con altas tasas de producción primaria bruta (GPP) y de emisiones de metano y con una gran abundancia de la familia *Cyanobiaceae*, de sus respectivos muestreos más fríos.

En cuanto a las comunidades del sedimento (Figura 3.13-B), el efecto de la alteración o la estacionalidad en su estructuración fue más leve que en el agua, y las comunidades de procariotas se vieron afectadas principalmente por la categoría de salinidad a la que pertenecían las respectivas lagunas. Así, las comunidades de las lagunas bicarbonatado-sódicas estuvieron influenciadas por bajas conductividades y valores de pH elevados, y las familias más abundantes fueron *Weeksellaceae* y *Dethiobacteraceae*. Las comunidades de las lagunas hiposalinas y mesosalinas se vieron afectadas por altos valores de carbonato, además de presentar tasas medias de GPP y de respiración aerobia y tasas altas de emisiones de metano. Las familias *Puniceicoccaceae*, *Thermaceae* y *Blastocatellaceae* fueron las más abundantes en estas categorías de lagunas. Por otra parte, las comunidades de la laguna hipersalina permanente (Salada de Chiprana) y la laguna de Gallocanta, que es hipersalina

temporal, se vieron influenciadas por altos valores de materia orgánica y mostraron tasas elevadas de GPP y de respiración aerobia. Las familias más abundantes en sus comunidades fueron *Bradymonadaceae* y *Coleofasciculaceae*. Las comunidades del resto de lagunas hipersalinas temporales se mostraron poco afectadas por la conductividad y formaron un grupo junto a las comunidades de la laguna hiposalina de El Hito. Estas lagunas mostraron muy bajas emisiones de metano y una gran abundancia de la familia *Staphylococcaceae* en sus comunidades.

Capítulo 4. Lagunas costeras deltaicas.

En este capítulo, se han estudiado los factores que determinan la estructura y los metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento de 3 humedales representativos de las diferentes zonas húmedas que se encuentran en del Delta del río Ebro. A su vez, estos humedales son representativos de los diferentes tipos de humedales costeros de la región mediterránea española. Los humedales estudiados se encontraron en un gradiente de salinidad, desde Alfacs (ALFA), una marisma micromareal conectada al mar, a Encanyissada (ENCA), una laguna de aguas generalmente salobres, pero con grandes variaciones en su conductividad, y Filtre Biològic, una laguna costera de aguas no salinas (marjal). Además, estos humedales presentaron diferentes estados tróficos, siendo Encayissada y Filtre Biològic los que presentaron un estado trófico más alto.

4.1. Características ambientales de los humedales Deltaicos estudiados

Los valores de las principales variables ambientales del agua y del sedimento están representados en la Tabla 4.1, y el resto de los valores de las demás variables ambientales se encuentran en el Anexo.

Las zonas húmedas estudiadas estaban situadas a lo largo de un marcado gradiente de salinidad. En el agua, los valores promedios de conductividad más elevados se presentaron en Alfacs ($53,4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) seguida de Encanyissada ($32,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), que mostró una gran variación en los valores de conductividad a lo largo de los diferentes muestreos, mientras que Filtre Biològic presentó los valores más bajos ($2,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Tabla 4.1. Valores promedio (\pm Desviación Estándar) de las principales variables ambientales del agua y del sedimento de los humedales estudiados. Los valores de materia orgánica del sedimento (LOI) se han expresado en porcentaje de peso seco. ALFA: Alfacs. ENCA: Encanyissada. FBIO: Filtre Biològic.

| | | ALFA | ENCA | FBIO |
|-----------|---|-----------------|-----------------|----------------|
| Agua | Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) | $53,4 \pm 16,3$ | $32,1 \pm 20,1$ | $2,1 \pm 0,3$ |
| | Clorofila- <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | $4,6 \pm 2,9$ | $33,4 \pm 27,5$ | $28,5 \pm 6,8$ |
| | Sulfato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | $3,4 \pm 0,5$ | $2,4 \pm 0,9$ | $0,1 \pm 0,1$ |
| Sedimento | Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) | $45,8 \pm 15,4$ | $36,2 \pm 16,8$ | $1,7 \pm 0,7$ |
| | LOI (% p.s.) | $26,8 \pm 13,8$ | $25,9 \pm 7,3$ | $3,6 \pm 0,3$ |

Encanyissada y Filtre Biològic mostraron un estado trófico mayor que Alfacs, con mayores concentraciones promedio de Chl-*a* ($33,4$ y $28,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente), mientras que las concentraciones promedio de sulfato fueron más elevadas en Alfacs y Encanyissada ($3,4$ y $2,4 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente) y muy bajas en Filtre Biològic ($0,1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). En cuanto al sedimento, el patrón de conductividad fue el mismo que en el agua, siendo Alfacs la que presentó los valores promedios más elevados ($45,8 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) y Filtre Biològic los más bajos ($1,7 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), mientras que los valores promedio más altos de materia orgánica también se observaron en Alfacs ($26,8\%$) y los más bajos en Filtre Biològic ($3,6\%$).

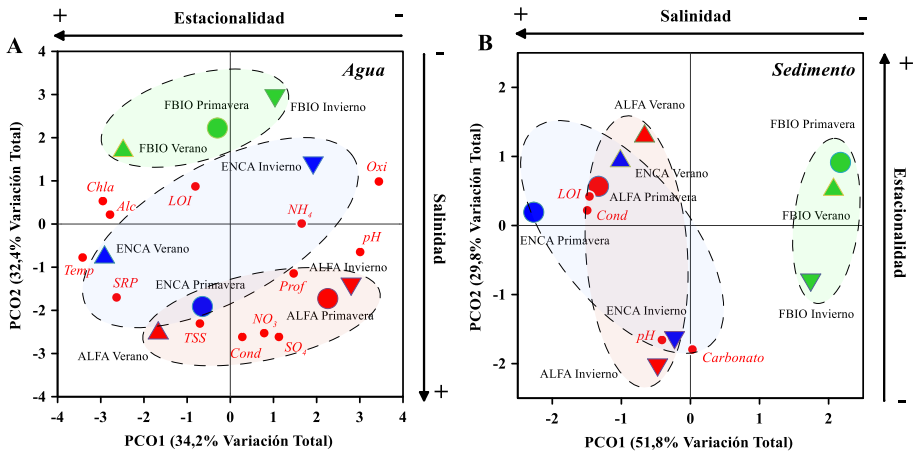


Figura 4.1. PCO de las muestras de agua (A) y sedimento (B) en base a sus variables ambientales. Los símbolos que representan los muestreos de Alfacs están en color rojo, los de Encanyissada en azul y los de Filtre Biològic en verde. La estación de muestreo se indica al lado del nombre del humedal y también mediante la forma del símbolo que lo representa: Invierno (▼), Primavera (●), Verano (▲). Variables ambientales: Chla (Clorofila-*a*), Alc (Alcalinidad), LOI (Materia orgánica), NH₄ (Amonio), Oxi (Oxígeno), Temp (Temperatura), SRP (Ortofosfato reactivo soluble), TSS (Sólidos suspendidos totales), Cond (Conductividad), NO₃ (Nitrato), SO₄ (Sulfato), Prof (profundidad máxima), pH y Carbonato.

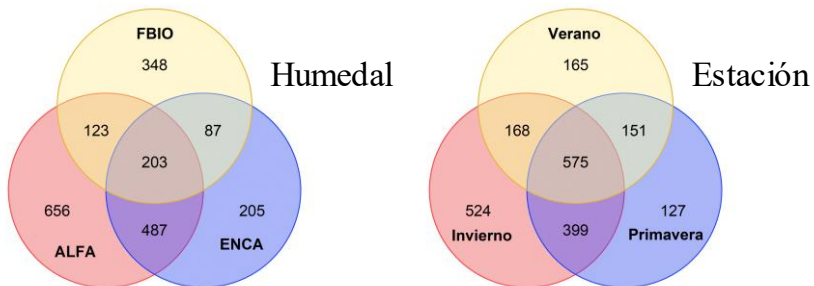
En cuanto a la ordenación de las muestras de agua respecto a los valores de variables ambientales (Figura 4.1-A), la salinidad fue el factor más importante para separar las zonas húmedas, ya que Alfacs y Encanyissada estaban influenciadas por altas conductividades pero también por concentraciones elevadas de sulfato, al contrario que Filtre Biològic. Además, la estacionalidad también fue un factor relevante, puesto que en cada zona húmeda los muestreos de verano estuvieron separados de los de invierno y relacionados con temperaturas más elevadas. En el sedimento (Figura 4.1-B), Alfacs y Encanyissada estuvieron solapadas en la ordenación pero separadas de Filtre Biològic, ya que se mostraron afectadas por valores más altos de conductividad y materia orgánica mientras que los valores de estas variables en Filtre Biològic fueron bajos. A su vez, en el sedimento la estacionalidad

también fue relevante, ya que en cada zona húmeda los muestreos de primavera y verano estaban separados de los de invierno.

4.2. Estructura y dinámica de la comunidad procariota

En el agua, se encontraron 203 ZOTUs cosmopolitas que estuvieron presentes en todas las zonas húmedas (Figura 4.2 agua). Alfacs mostró el mayor número de ZOTUs específicos, seguida de Filtre Biològic y Encanyissada. Filtre Biològic se mostró poco relacionada con las zonas húmedas más salinas ya que compartió muy pocos ZOTUs con Alfacs y Encanyissada, mientras que estas dos tuvieron 487 ZOTUs en común. En cuanto a la distribución de los ZOTUs entre los diferentes muestreos, se encontraron 575 ZOTUs que estaban presentes en todas las estaciones.

Agua



Sedimento

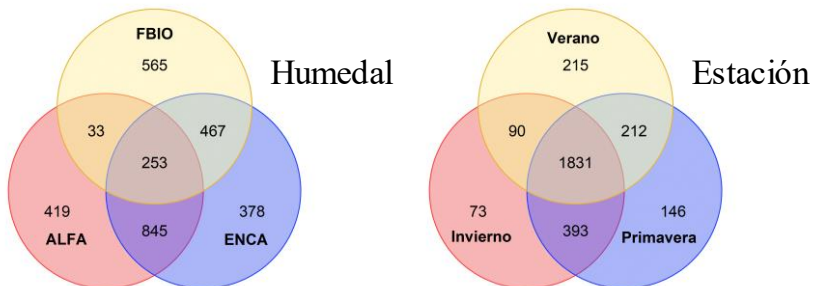


Figura 4.2. Diagramas de Venn mostrando la distribución de los ZOTUs en las muestras de agua y sedimento entre los diferentes humedales y estaciones.

El invierno fue la estación que presentó más ZOTUs específicos, seguida de verano y primavera. A su vez, los muestreos de invierno y primavera estuvieron más relacionados entre sí que con el de verano, ya que ambos compartieron más ZOTUs (399) que cada uno de ellos con el muestreo de verano.

En el sedimento (Figura 4.2 sedimento), se encontraron 253 ZOTUs cosmopolitas que estaban presentes en todas las zonas húmedas. En comparación con el agua, el efecto del gradiente de salinidad fue más evidente, ya que Filtre Biològic compartió muy pocos ZOTUs (33) con Alfacs, la zona húmeda más salada, mientras que Alfacs y Encanyissada compartieron 845 ZOTUs. En cuanto a cómo se distribuyeron los ZOTUs entre las diferentes estaciones, el número de ZOTUs que estuvieron presentes en todos los muestreos fue más elevado que en el agua, con 1831 ZOTUs, y a su vez el verano fue la estación que menos ZOTUs compartió con las demás, especialmente con el invierno, con el cual mostró 90 ZOTUs en común.

Por otra parte, la clasificación taxonómica a partir de los amplicones del gen que codifica para el 16S rRNA resultó en 43 filos para el agua y 54 para el sedimento. En el agua (Figura 4.3-A), el filo más abundante fue Cyanobacteria, estando la familia *Cyanobiaceae* presente a lo largo de todo el gradiente de salinidad pero presentando las mayores abundancias relativas durante las estaciones más cálidas en las zonas húmedas con mayor estado trófico, siendo esta familia la responsable del 25,1% de las lecturas normalizadas en verano en Encanyissada y del 46,1% de las lecturas durante la primavera en Filtre Biològic.

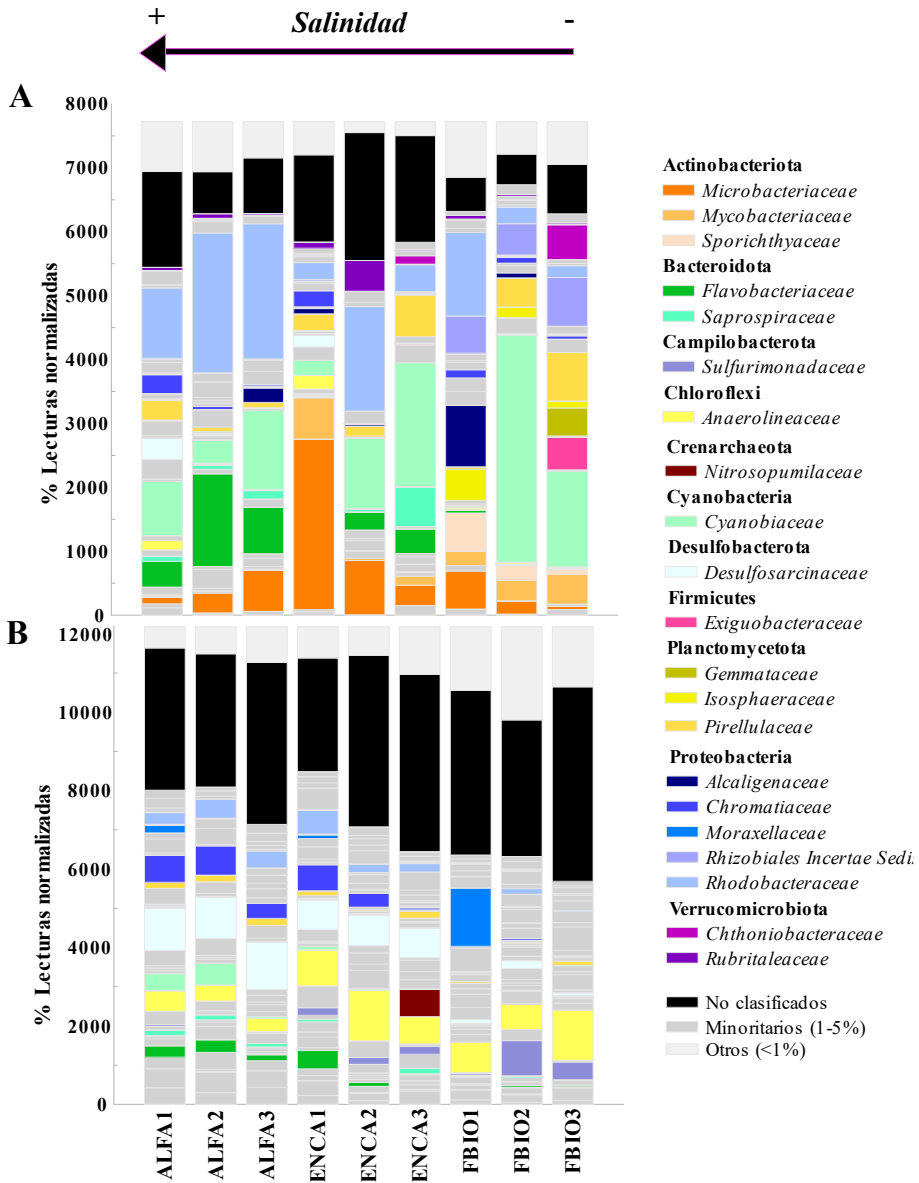


Figura 4.3. Abundancias relativas de las familias de procariotas del agua (A) y del sedimento (B) de las lagunas estudiadas. Las familias están agrupadas por filo. En la leyenda, “Minoritarios” se refiere a las familias que presentaron una abundancia relativa entre 1-5%. “Otros” se refiere a las familias que presentaron una abundancia relativa menor del 1%.

Los otros filos más abundantes fueron Proteobacteria, representado mayoritariamente por la familia *Rhodobacteraceae*, que estuvo presente a lo largo de todo el gradiente de salinidad, y Actinobacteriota, debido a la gran abundancia de la familia *Microbacteriaceae* en Encanyissada durante el invierno (34,5% de las lecturas normalizadas). Contrariamente, en el sedimento (Figura 4.3-B) no hubo ningún taxón con una gran abundancia relativa. Los filos más representados fueron Desulfobacterota, siendo la familia *Desulfosarcinaceae* más abundante en las zonas húmedas más salinas, y Chloroflexi, con la familia *Anaerolineaceae* presentando las mayores abundancias en Encanyissada y en Filtre Biològic (del 2,7 al 10,6% de las lecturas normalizadas), que fueron las zonas húmedas con conductividades medias o bajas.

Por lo que respecta a las diferencias estadísticas entre las comunidades de procariotas de las diferentes zonas húmedas, el análisis PERMANOVA mostró que en el agua hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las comunidades de Filtre Biològic y Encanyissada-Alfacs, pero no entre las de Encanyissada y Alfacs. En cambio, en el sedimento sí hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las comunidades de todas las zonas húmedas.

En cuanto a la relación de las diferentes zonas húmedas en base a sus comunidades (Figura 4.4 y 4.5), tanto en el agua como en el sedimento Alfacs y Encanyissada formaron un grupo y se separaron de Filtre Biològic. En el agua (Figura 4.4), los diferentes muestreos estacionales de cada zona húmeda presentaron grandes diferencias en la composición de la comunidad de procariotas.

Resultados – Lagunas costeras deltaicas

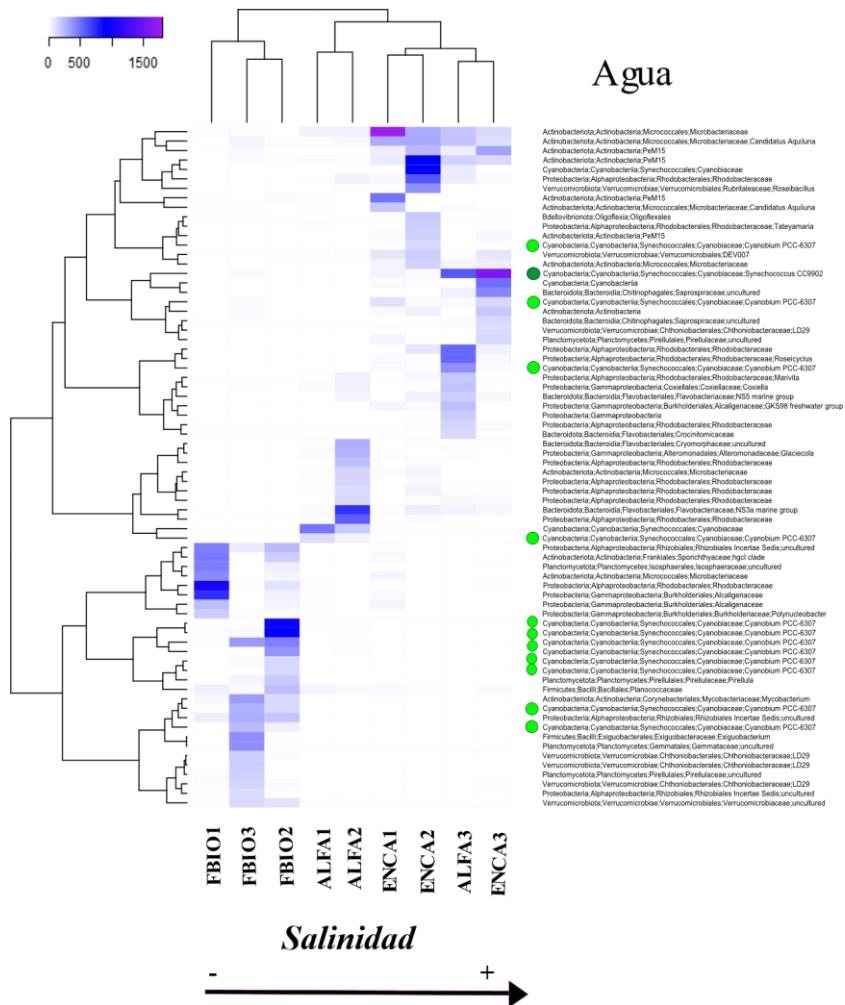


Figura 4.4. Heatmap mostrando la relación de las muestras de agua en base a la composición de sus comunidades. Sólo se tuvieron en cuenta los ZOTUs con una abundancia relativa total mayor del 0,5% para el agua y mayor del 0,3% para el sedimento. 1: Invierno. 2: Primavera. 3: Verano. Los ZOTUs del género *Cyanobium* se indican con un círculo verde claro y los del género *Synechococcus* con un círculo verde oscuro.

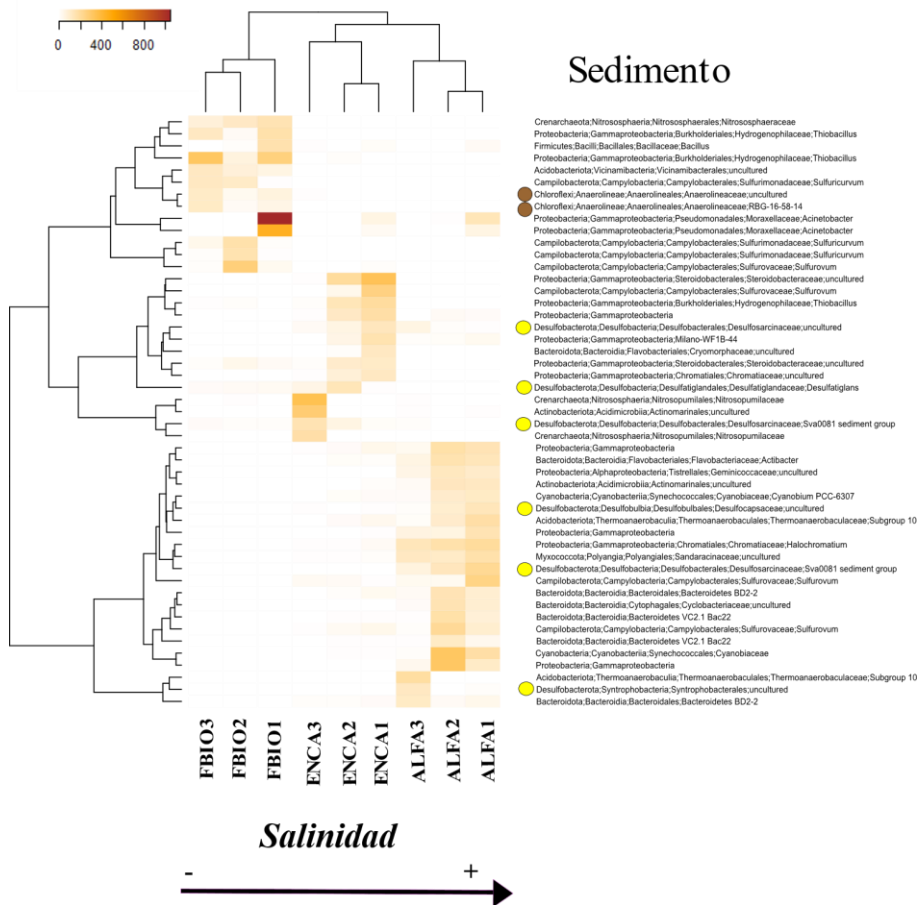


Figura 4.5. Heatmap mostrando la relación de las muestras de sedimento en base a la composición de sus comunidades. Sólo se tuvieron en cuenta los ZOTUs con una abundancia relativa total mayor del 0,5% para el agua y mayor del 0,3% para el sedimento. 1: Invierno. 2: Primavera. 3: Verano. Los ZOTUs del filo Desulfobacterota se indican con un círculo amarillo y los de la familia *Anaerolineaceae* con un círculo marrón.

En Filtre Biológico, los muestreos de primavera y verano estuvieron agrupados y se diferenciaron del muestreo de invierno, ya que presentaron una mayor abundancia relativa de ZOTUs cianobacterianos clasificados como *Cyanobium*, mientras que en el muestreo de invierno los ZOTUs pertenecientes a las familias *Rhodobacteraceae* y *Alcaligenaceae* tuvieron una mayor abundancia. Por otra parte, Alfacs y Encanyissada estuvieron

solapadas y no formaron un grupo específico de cada zona húmeda. Este solapamiento entre las comunidades de las dos zonas húmedas se dio porque sus muestreos de verano formaron un grupo debido a la gran abundancia de un ZOTU cianobacteriano clasificado como *Synechococcus*. Además, Encanyissada y el muestreo de verano de Alfacs se caracterizaron por la gran abundancia relativa de ZOTUs de actinobacterias clasificados como *Microbacteriaceae* y PeM15, mientras que en el resto de los muestreos de Alfacs los ZOTUs más abundantes fueron de las familias *Cyanobiaceae* y *Rhodobacteraceae* y del grupo de flavobacterias *NS3a marine group*.

Al contrario que en el agua, en el sedimento (Figura 4.5) los diferentes muestreos de cada zona húmeda fueron más estables en el tiempo y no presentaron grandes cambios estacionales. Esto llevó a una buena diferenciación de las comunidades de las zonas húmedas, por lo que no hubo solapamiento entre Alfacs y Encanyissada. En Filtre Biològic los ZOTUs con mayor abundancia pertenecieron al género de proteobacterias *Acinetobacter* y a la familia *Anaerolineaceae*, del filo Chloroflexi. Por otra parte, las familias de SRB (que pertenecen al filo Desulfobacterota) se encontraron en las zonas húmedas más saladas y no en FBIO. Uno de los ZOTUs más abundantes de Encanyissada perteneció a la familia de arqueas *Nitrosopumilaceae*, mientras que en Alfacs los ZOTUs más abundantes pertenecieron a la familia *Cyanobiaceae* y al género *Sulfurovum*.

4.3. Metanogénesis y Metanotrofia en humedales Deltaicos

Por lo que respecta a la distribución de las arqueas metanógenas y las bacterias metanótrofas en los sitios estudiados (Figura 4.6), se observaron patrones diferentes entre las zonas húmedas relacionados con el gradiente de salinidad.

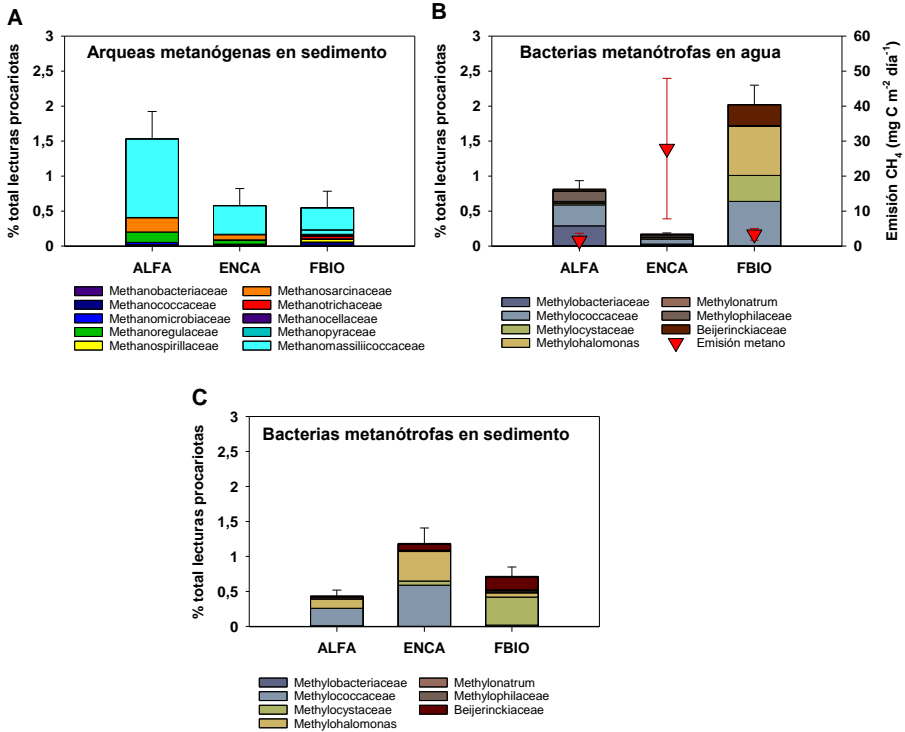


Figura 4.6. Distribución de la abundancia promedio de los microorganismos relacionados con el metano en los humedales estudiados. A: Abundancia relativa de las familias de arqueas metanógenas del sedimento. B: Abundancia relativa de las familias de bacterias metanótrofas del agua. Se representa también la emisión promedio de metano (triángulo rojo) de cada humedal. C: Abundancia relativa de las familias de bacterias metanótrofas del sedimento. En B y C se ha indicado la taxonomía de los microorganismos a nivel de género cuando éste estaba asignado.

Las arqueas metanógenas del sedimento (Figura 4.6-A) mostraron la mayor abundancia relativa en Alfacs, mientras Encanyissada y Filtre Biològic mostraron niveles similares. La familia *Methanomassiliicoccaceae* fue la mayoritaria en todas las zonas húmedas. Alfacs y Encanyissada presentaron una comunidad de metanógenos muy similar, siendo las familias *Methanoregulaceae* y *Methanosarcinaceae* las familias minoritarias más abundantes en ambos sitios. En cambio, las familias *Methanopyraceae* y *Methanobacteriaceae* se encontraron sólo en Filtre Biològic. En cuanto a las

bacterias metanótrofas (Figura 4.6 B-C), se encontraron patrones diferentes entre el agua y el sedimento. En el agua, Filtre Biològic mostró la mayor abundancia relativa, seguida de Alfacs y de Encanyissada, que fue la zona húmeda con menor abundancia relativa de metanótrofos y a su vez la que mayor emisión de metano presentó. Alfacs y Encanyissada mostraron comunidades parecidas dominadas por la familia *Methylococcaceae*, mientras que Filtre Biològic, aparte de presentar familias existentes también en las zonas húmedas de mayor salinidad, mostró una gran abundancia relativa de la familia *Methylocystaceae*, sólo presente en este humedal. En el sedimento, Alfacs y Encanyissada, que fue la zona húmeda con mayor abundancia relativa de metanótrofos, mostraron comunidades similares dominadas por la familia *Methylococcaceae*, mientras que en Filtre Biològic esta familia también fue la más abundante, seguida de la familia *Beijerinckiaceae*.

4.4. Metabolismos del carbono in situ e inferencia molecular

Las relaciones entre las tasas de los metabolismos del carbono medidos *in situ* y la inferencia molecular de las cantidades génicas (gene counts) de sus respectivos genes marcadores mostró patrones comunes y a su vez diferencias entre el agua y el sedimento (Figura 4.7 y 4.8).

Tanto en el agua como en el sedimento hubo una correlación significativa entre las tasas de producción primaria bruta (GPP) y *gene counts* del gen *psbA*, pero no se encontró una relación entre las tasas de respiración aerobia y *gene counts* del gen *coxA* (Figura 4.7 y 4.8 A y B). En el agua, en los humedales con un estado trófico más elevado se observó durante los meses más cálidos un gran incremento de la ratio entre las tasas de fotosíntesis y respiración con respecto a la ratio entre *gene counts* de los respectivos genes marcadores (Figura 4.7-C), lo que resultó en una correlación lineal pero no significativa entre ambas ratios (Figura 4.7-D).

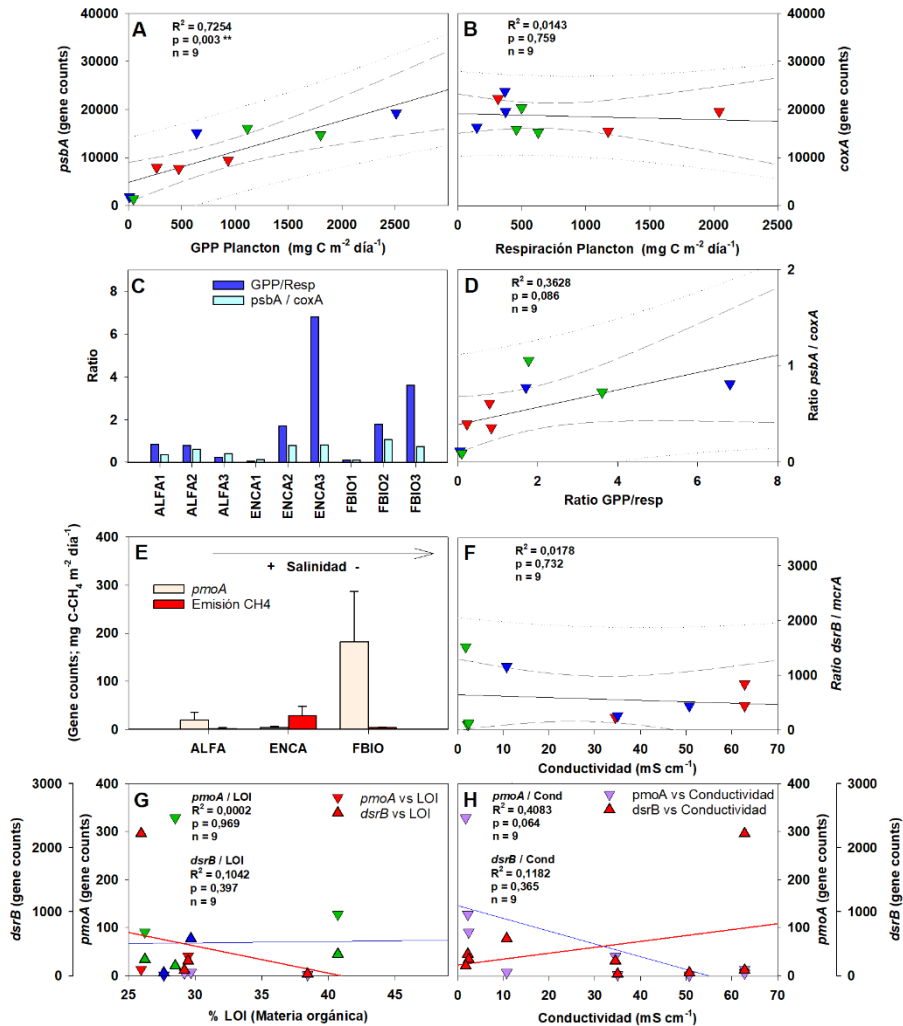


Figura 4.7. Comparación de las tasas metabólicas con los resultados obtenidos con PICRUST2 en el agua. En las regresiones, los símbolos que representan los muestreos de Alfacs están en color rojo, los de Encanyissada en azul y los de Filtre Biològic en verde. A: regresión entre las tasas de producción primaria bruta (GPP) y *gene counts* del gen *psbA*. B: regresión entre las tasas de respiración y *gene counts* del gen *coxA*. C: comparación entre las ratios de las tasas de GPP y respiración con las ratios de los *gene counts* de los genes *psbA* y *coxA*. D: regresión entre las ratios de las tasas de GPP y respiración con las ratios *gene counts* de los genes *psbA* y *coxA*. E: Comparación entre los promedios de *gene counts* del gen *pmoA* y el promedio de emisión de metano de los humedales. F: regresión entre la conductividad y la ratio de *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA*. G: regresión entre la materia orgánica (LOI) y *gene counts* de los genes *dsrB* y *pmoA*. H: regresión entre la conductividad y *gene counts* de los genes *dsrB* y *pmoA*. **: $p < 0,01$.

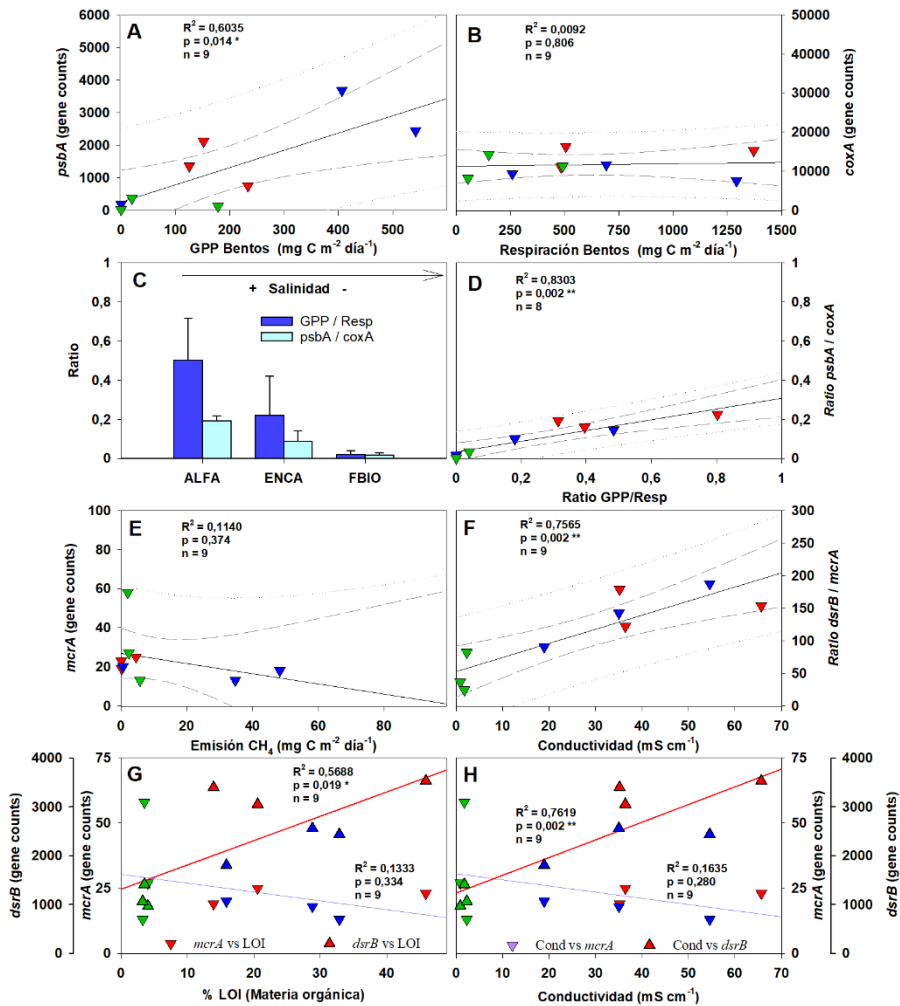


Figura 4.8. Comparación de las tasas metabólicas con los resultados obtenidos con PICRUST2 en el sedimento. En las regresiones, los símbolos que representan los muestreos de Alfacs están en color rojo, los de Encanyissada en azul y los de Filtre Biològic en verde. A: regresión entre las tasas de producción primaria bruta (GPP) y *gene counts* del gen *psbA*. B: regresión entre las tasas de respiración y *gene counts* del gen *coxA*. C: comparación entre la ratio promedio de las tasas de GPP y respiración con la ratio promedio de *gene counts* de los genes *psbA* y *coxA*. D: regresión entre las ratios de las tasas de GPP y respiración con las ratios de *gene counts* de los genes *psbA* y *coxA*. E: regresión entre las tasas de emisión de metano y *gene counts* del gen *mcrA*. F: regresión entre la conductividad y la ratio de *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA*. G: regresión entre la materia orgánica (LOI) y *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA*. H: regresión entre la conductividad y *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA*. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$.

Contrariamente, en el sedimento sí hubo una correlación significativa entre estas ratios, la cual decreció a lo largo del gradiente de salinidad (Figura 4.8 C y D). Por otra parte, el agua de Filtre Biològic mostró el mayor número de *gene counts* del gen *pmoA*, seguida de Alfacs y de Encanyissada, que fue la que presentó el menor número de *gene counts* de este gen y a su vez la mayor emisión de metano (Figura 4.7-E). No obstante, no se encontró una correlación significativa entre la ratio de *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA* con la conductividad ni de *gene counts* de los genes *pmoA* y *dsrB* con la conductividad o la materia orgánica (Figura 4.7 F, G y H). En el sedimento no hubo una correlación entre la emisión de metano y *gene counts* del gen *mcrA* (Figura 4.8-E), pero sí se observó una correlación positiva significativa entre la ratio de *gene counts* de los genes *dsrB* y *mcrA* con la conductividad (Figura 4.8-F). Además, *gene counts* del gen *dsrB* aumentaron significativamente con la conductividad y la materia orgánica, mientras que *gene counts* del gen *mcrA* se mantuvieron constantes independientemente de la salinidad o la cantidad de materia orgánica presentes (Figura 4.8 G y H).

4.5. Redes de coocurrencia de las comunidades de procariotas

El análisis de las interacciones de los miembros de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento resultó en una red de la comunidad del agua formada por 340 nodos y 1259 bordes (Figura 4.9) y una red de la comunidad del sedimento constituida por 458 nodos and 1910 bordes (Figura 4.10). La red del agua mostró un *clustering coefficient* (que informa de la complejidad de la red) de 0,357 y una modularidad (que informa de la compartimentalización de la red) de 0,827, mientras que la del sedimento presentó un *clustering coefficient* de 0,315 y una modularidad de 0,693, sugiriendo una mayor complejidad y compartimentalización de la red del agua respecto a la del sedimento.

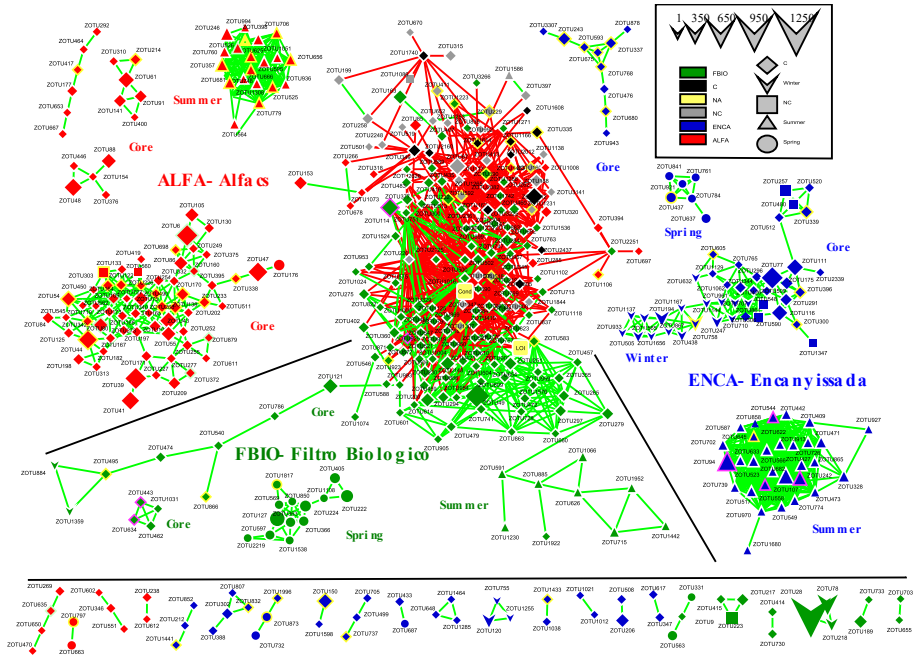


Figura 4.10. Red de coocurrencia de las comunidades de procariotas del sedimento. Los ZOTUs se han representado como nodos y las interacciones entre ellos en forma de líneas llamadas bordes (*edges*). Los nodos que representan las variables ambientales están coloreados en amarillo (Cond: Conductividad, LOI: Materia orgánica). El color de las líneas que representan las interacciones entre los nodos es verde si dicha interacción es de presencia mutua y rojo si dicha interacción es de exclusión mutua. La forma del nodo indica la estación en la que el ZOTU al cual representa es mayoritario y el color del nodo el humedal en el que dicho ZOTU es mayoritario. El tamaño del nodo indica su abundancia en número de lecturas. El color del borde del nodo indica cuál de los siguientes genes está presente en el ZOTU al que representa: amarillo (*dsrB*), verde (*psbA*), azul (*pmoA/amoA*). En la leyenda, C se aplica a los ZOTUs presentes en todos los humedales (cosmopolitas) en la leyenda relativa a los humedales o bien en todas las estaciones (*core*) en la leyenda relativa a la estación. NC se aplica a los ZOTUs que están compartidos entre diferentes humedales o bien entre diferentes estaciones pero sin estar en todos ellos a la vez.

En ambas redes se observó un número muy bajo de ZOTUs cosmopolitas presentes en todos los humedales (17 en la red de agua y 12 en la de sedimento), por lo que las comunidades que formaron las redes de las diferentes zonas húmedas estaban muy diferenciadas entre sí. Además, las dos redes mostraron ZOTUs presentes sólo en estaciones específicas y ZOTUs presentes en todos los muestreos (Figura 4.11), siendo estos últimos mucho más abundantes en la red del sedimento que en la del agua. En la red del agua, los ZOTUs específicos de Alfacs y a su vez presentes durante todo el año en este humedal estaban relacionados negativamente con la Chl-*a*, mientras que los ZOTUs específicos de Filtre Biològic y también presentes en todos los muestreos mostraron una relación negativa con la conductividad. En la red de sedimento, los ZOTUs específicos de Filtre Biològic y presentes en todos los muestreos también estuvieron relacionados negativamente con la conductividad y con la materia orgánica.

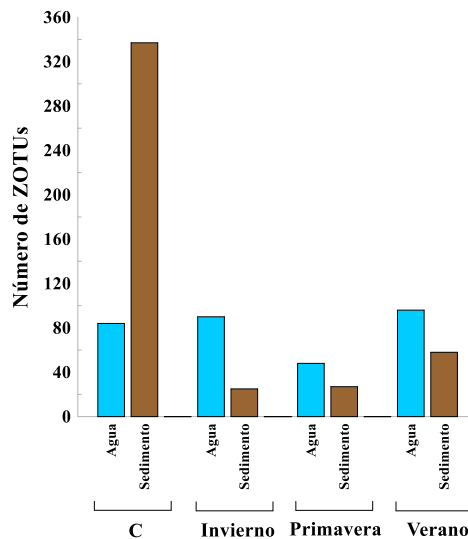


Figura 4.11. Distribución del número de ZOTUs presentes durante todo el año (C de *core*) y de los ZOTUs específicos de cada estación de muestreo en las redes de coocurrencia del agua y del sedimento.

Con respecto a la abundancia y el *degree* total de los ZOTUs relacionados con la fotosíntesis (*psbA*), la sulfatoreducción desasimilatoria (*dsrB*) y la oxidación aerobia del metano (*pmoA*) (Figura 4.12), en la red del agua (Figura 4.12 A-B) se observó que la gran mayoría de ZOTUs con gen *psbA* eran específicos de cada humedal, y hubo pocos ZOTUs presentes en todas las zonas húmedas (cosmopolitas).

En Alfacs y Filtre Biològic se encontraron ZOTUs con *psbA* que estuvieron presentes en todas las estaciones (C de *core*), pero la gran mayoría de ZOTUs que tenían este gen eran estacionales y más numerosos en las estaciones más cálidas de Encanyissada y Filtre Biològic, los humedales con un estado trófico mayor y con mayores tasas de GPP. Por otra parte, el *degree* total de los genes se definió como la suma de los *degrees* (número de conexiones) de los nodos individuales que tenían dichos genes. Así, el *degree* total de los ZOTUs con gen *psbA* también fue mayor en las estaciones cálidas de estos humedales. Contrariamente, los ZOTUS con gen *pmoA* sólo se encontraron en Filtre Biològic, el humedal menos salino, y mayoritariamente en ZOTUs presentes durante todas las estaciones. No obstante, el mayor *degree* total de los ZOTUs con este gen se observó en verano.

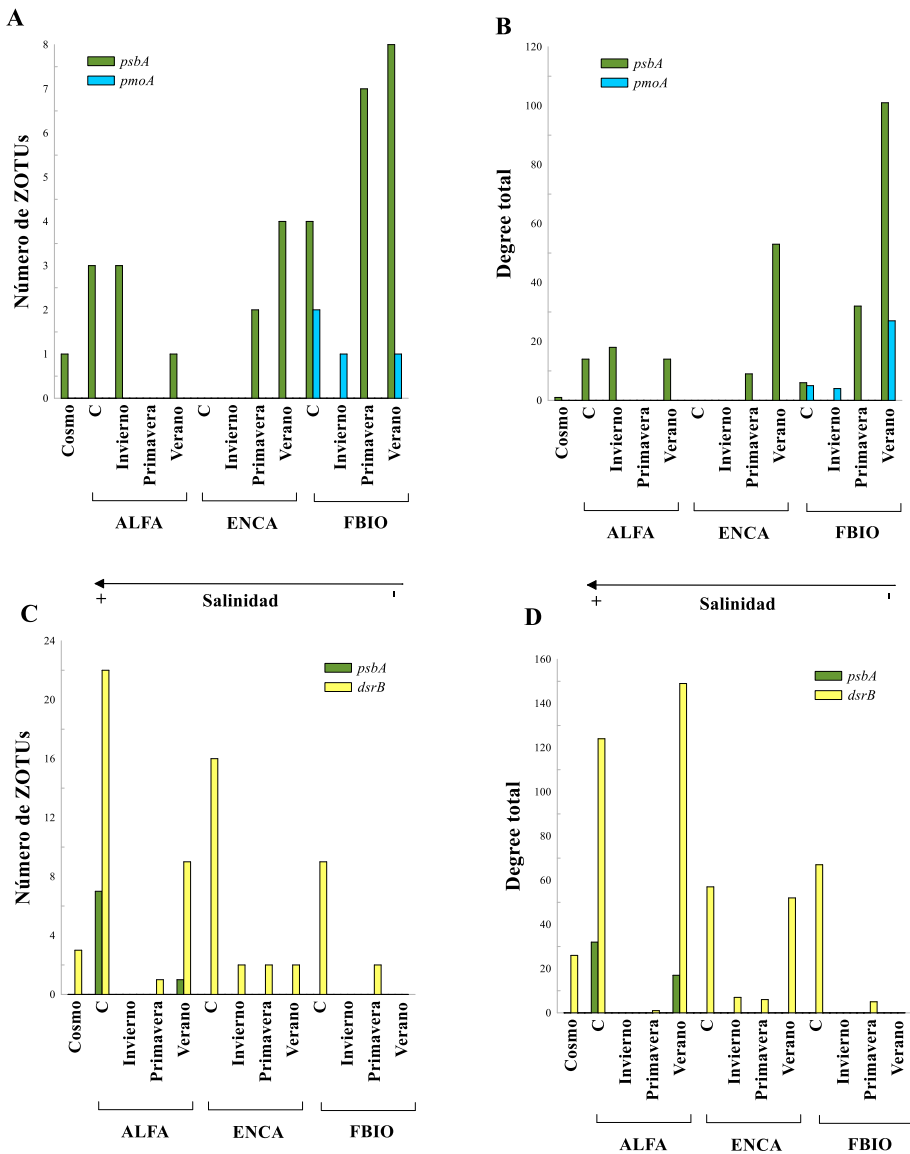


Figura 4.12. Distribución, en cada humedal y estación, del número y del *degree* total de los ZOTUs que presentaron genes relacionados con metabolismos del carbono en la red de coocurrencia del agua (A-B) y del sedimento (C-D). Cosmo: ZOTUs presentes en todos los humedales (cosmopolitas). C: dentro de cada humedal, ZOTUs que estaban en todas las estaciones (*core*).

En cuanto al sedimento (Figura 4.12 C-D), los ZOTUs con gen *psbA* sólo se encontraron en Alfacs, y la gran mayoría estuvieron ZOTUs presentes durante todo el año, aunque también se observaron ZOTUs en verano con este gen cuyo *degree* total fue comparable al de los ZOTUs presentes en todas las estaciones. Por otra parte, los ZOTUs que tenían el gen *dsrB* se encontraron en todas las zonas húmedas (cosmopolitas) y la mayoría eran ZOTUs presentes durante todas las estaciones (C). No obstante, la abundancia de dichos ZOTUs creció a lo largo del gradiente de salinidad, siendo Filtre Biològic el humedal con menor número de ZOTUs con gen *dsrB* y Alfacs el que más ZOTUs con este gen mostró. Además, los mayores *degrees* totales de los ZOTUs con *dsrB* se observaron en Alfacs, sobre todo en los ZOTUs específicos de verano.

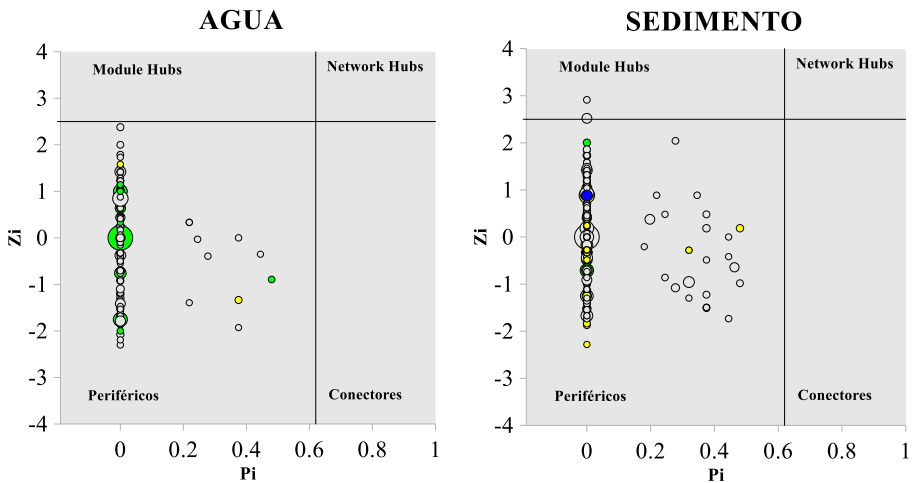


Figura 4.13. Gráfico P_1 - Z_i que muestra, para el agua y para el sedimento, la distribución de los nodos que forman las redes de coocurrencia en base a sus roles topológicos. El tamaño del símbolo que representa a los nodos es proporcional a su abundancia en la red, y el color indica cuál de los siguientes genes está presente en el ZOTU al que representa el nodo: amarillo (*dsrB*), verde (*psbA*), azul (*pmoA*). Z_i : conectividad intramódulo. P_i : conectividad entre módulos.

Los ZOTUs con gen *pmoA* del sedimento no se han mostrado en la figura porque corresponden a arqueas oxidantes del amonio, que en realidad no presentan este gen sino el gen *amoA*. PICRUSt2 no es capaz de diferenciar estos dos genes debido a su gran semejanza evolutiva, y asigna erróneamente el gen *pmoA* a las arqueas oxidantes del amonio.

Por lo que respecta a los roles topológicos de los nodos en las redes de coocurrencia del agua y del sedimento (Figura 4.13), en ambas redes la mayoría de los nodos se clasificaron como periféricos, y sólo se encontraron *module hubs* en la red de sedimento, que se asignaron a la familia *Sulfurovaceae* y al filo Gemmatimonadota (asignación hasta el último rango taxonómico definido). Los nodos periféricos mostraron abundancias relativas muy dispares, siendo algunos muy abundantes y otros muy poco abundantes, mientras que los nodos clasificados como *module hubs* presentaron abundancias relativas bajas. En ambas redes, los nodos que presentaron genes relacionados con los metabolismos del carbono eran todos periféricos. En el agua, el nodo más abundante poseyó el gen *psbA*, y se asignó al género *Synechococcus*. En el sedimento, el nodo más abundante con genes relacionados con el metabolismo del carbono, en concreto el gen *dsrB*, perteneció a la familia *Hydrogenophilaceae*.

4.6. Gradientes ambientales y ordenación de las comunidades de procariontas

El gradiente de salinidad se mostró como el factor más relevante en la ordenación de las comunidades del agua (Figura 4.14-A) y del sedimento (Figura 4.14-B) de los humedales, aunque las comunidades acuáticas también se vieron afectadas por la estacionalidad.

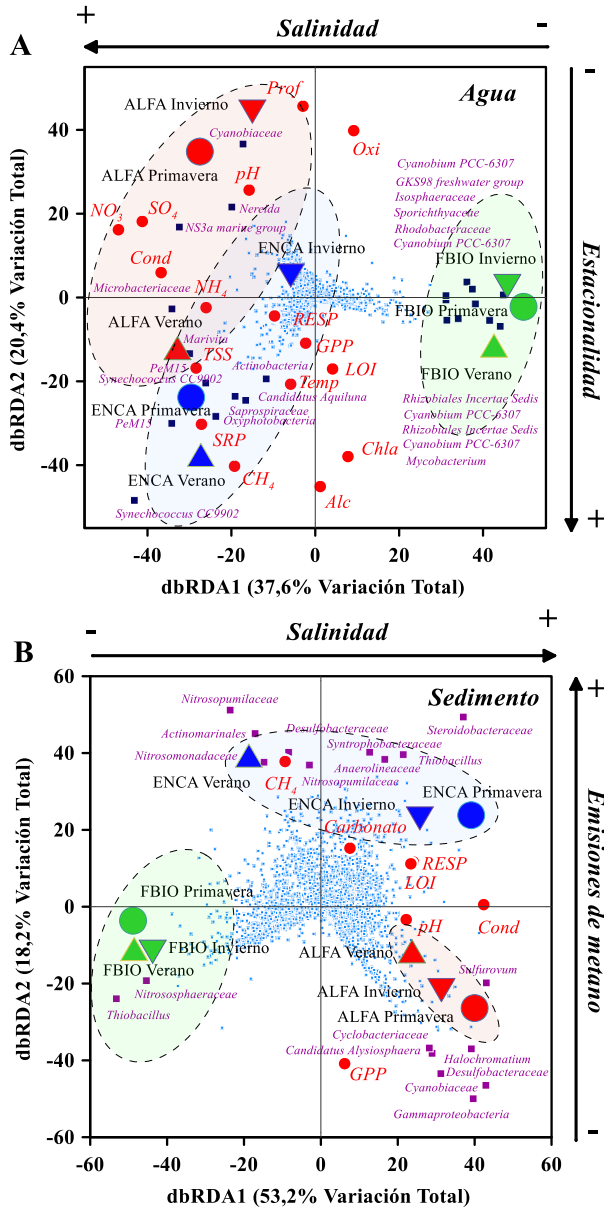


Figura 4.14. dbRDA de la ordenación de las comunidades de procaritas del agua (A) y del sedimento (B) en base a las variables ambientales. Los símbolos que representan los muestreos de Alfacs están en color rojo, los de Encanyissada en azul y los de Filtre Biològic en verde. Las elipses que remarcan los muestreos de cada humedal mantienen el mismo código de color. La estación de muestreo se indica al lado del nombre del humedal y también mediante la forma del

símbolo que lo representa: Invierno (▼), Primavera (●), Verano (▲). Los puntos pequeños de color azul claro representan los ZOTUs considerados en la dbRDA, pero sólo se muestra la asignación taxonómica (hasta el último nivel con asignación) de los ZOTUs con mayor capacidad de discriminación (cuadrados azul oscuro). Variables ambientales: Chla (Clorofila-*a*), Alc (Alcalinidad), LOI (Materia orgánica), NH₄ (Amonio), Oxi (Oxígeno), Temp (Temperatura), SRP (Ortofosfato reactivo soluble), TSS (Sólidos suspendidos totales), Cond (Conductividad), NO₃ (Nitrato), SO₄ (Sulfato), Prof (profundidad máxima), pH y Carbonato. Tasas metabólicas: GPP (producción primaria bruta), RESP (respiración aerobia), CH₄ (emisiones de metano).

En el agua, las comunidades de Alfacs y Encanyissada se vieron influenciadas por una elevada conductividad y por altos niveles de sulfato y además mostraron cierto solapamiento, mientras que las comunidades de Filtre Biològic estuvieron determinadas por bajas conductividades y concentraciones de sulfato y estuvieron claramente diferenciadas de las zonas húmedas más salinas. En todos los humedales, la estacionalidad separó los muestreos de invierno de los de primavera y verano, los cuales se vieron afectados por temperaturas más elevadas y concentraciones mayores de Chl-*a*, y además se observaron mayores tasas de GPP en los humedales con mayor estado trófico. Por otra parte, las comunidades de Alfacs mostraron mayores abundancias de la familia *Cyanobiaceae* y de grupos halotolerantes como NS3a marine group, mientras que en las comunidades de Encanyissada destacaron el género *Synechococcus*, la familia *Saprospiraceae* y el taxón PeM15. Además, esta zona húmeda mostró las mayores emisiones de metano. Por otra parte, en las comunidades de Filtre Biològic destacaron el género *Cyanobium*, la familia *Rhodobacteraceae* y el taxón *GKS98 freshwater group*. En el sedimento, las comunidades de Alfacs y Encanyissada también se vieron determinadas por la conductividad y la materia orgánica, pero al contrario que en el agua estos humedales estaban claramente diferenciados entre sí. Además, la estacionalidad no fue un factor relevante en la estructuración de las comunidades del sedimento, puesto que los muestreos de los diferentes humedales estaban muy cerca entre sí en la ordenación excepto en

Encanyissada, donde el muestreo de verano estaba separado de los demás. En Alfacs destacaron las familias *Desulfobacteraceae* y *Cyanobiaceae* y se observaron las mayores tasas de GPP. En Encanyissada fueron más relevantes las familias *Nitrosopumilaceae*, *Nitrosomonadaceae* y *Desulfobacteraceae*, y además este humedal mostró las mayores tasas de emisión de metano. En cambio, las comunidades de Filtre Biològic se vieron afectadas por bajas conductividades y bajos niveles de materia orgánica, destacando la familia *Nitrososphaeraceae* y el género *Thiobacillus*.

Capítulo 5. Lagunas no salinas de interior.

En este capítulo, se han estudiado los factores más relevantes en la determinación de la estructura y los metabolismos del carbono de las comunidades de procariontas del agua y del sedimento de 20 lagunas someras representativas de los humedales no salinos de interior mediterráneos.

Estas lagunas se agruparon en tres tipos: no salinas de aguas alcalinas, fluviales y no salinas de baja alcalinidad. A su vez, dichas lagunas se pudieron clasificar en diferentes estados ecológicos en base al componente trófico: muy bueno, moderado, malo y muy malo.

5.1. Características ambientales de las lagunas no salinas de interior

Los valores de las principales variables ambientales del agua están representados en la Tabla 5.1, y el resto de los valores de las demás variables ambientales, tanto del agua como del sedimento, se encuentran en el Anexo.

En coherencia con las características limnológicas que definen el tipo de los humedales estudiados en este capítulo, las lagunas estudiadas presentaron un gradiente de alcalinidad muy acusado, siendo los valores de esta variable mayores en las lagunas fluviales (5,24-7,82 meq·L⁻¹) y las no salinas de aguas alcalinas (1,41-5,01 meq·L⁻¹), mientras que las lagunas no salinas de baja alcalinidad mostraron los valores más bajos (0,45 meq·L⁻¹). No obstante, las lagunas no salinas de baja alcalinidad mostraron los valores más altos de materia orgánica, con valores de hasta 88,9 mg·L⁻¹, mientras que los otros dos tipos de lagunas mostraron concentraciones más bajas, con valores mínimos de 3 mg·L⁻¹ en las lagunas no salinas de aguas alcalinas y de 0,9 mg·L⁻¹ en las fluviales.

Tabla 5.1. Valores promedio (\pm Desviación Estándar) de las principales variables ambientales del agua de las lagunas estudiadas. Los códigos de las lagunas se encuentran en la Tabla 2.2. LOI: Materia orgánica. Chl-*a*: Clorofila-*a*. El estado ecológico se determinó en base al componente trófico (n.d. – no determinado).

| Tipo de laguna | Laguna | Estado Ecológico | Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | LOI (mg·L ⁻¹) | Chl- <i>a</i> (µg·L ⁻¹) |
|------------------|--------|------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Alcalinas | ALCA | Muy Bueno | 1,41±0,12 | 5,4±4,4 | 1,86±1,01 |
| | BALD | Malo | 5,01±0,34 | 3,0±1,2 | 8,13±5,58 |
| | CAPE | Muy Bueno | 3,81±2,57 | 6,0±0,9 | 1,70±1,61 |
| Fluviales | ALFR | Muy Bueno | 6,97±0,42 | 14,5±6,7 | 2,90±1,55 |
| | ARQU | Muy Bueno | 5,49±0,11 | 0,9±0,2 | 1,47±1,28 |
| | HERR | Muy Bueno | 5,60±1,37 | 8,7±2,4 | 2,40±2,02 |
| | MARQ | Muy Bueno | 5,24±0,17 | 1,8±0,7 | 1,03±0,33 |
| | MUED | Muy Bueno | 7,82±0,39 | 12,3±10,2 | 0,97±0,63 |
| Baja Alcalinidad | BELE | Muy Bueno | 1,08±n.d. | 71,6±n.d. | 0,05±n.d. |
| | CAMP | Muy Bueno | 0,94±0,43 | 16,1±13,7 | 8,40±4,06 |
| | CARC | Muy Malo | 1,79±0,67 | 38,7±20,4 | 167,03±101,17 |
| | CRIS | Muy Bueno | 1,44±0,20 | 7,9±5,9 | 2,73±2,55 |
| | MONT | Muy Malo | 1,33±0,20 | 88,9±23,7 | 221,20±127,66 |
| | NAVA | Muy Bueno | 2,20±0,97 | 3,4±1,6 | 0,53±0,47 |
| | PALA | Moderado | 0,45±0,28 | 40,0±3,7 | 8,44±0,33 |
| | PRAD | Muy Bueno | 1,05±0,05 | 31,4±15,8 | 10,34±8,78 |

En lo que respecta a la ordenación de las muestras de agua en base a sus variables ambientales (Figura 5.1-A), las lagunas no salinas de baja alcalinidad fueron las más diferenciadas debido a los mayores valores de materia orgánica. Las lagunas fluviales estuvieron influenciadas por valores medios de pH y conductividad, siendo las lagunas no salinas de aguas alcalinas las que mayores valores de pH y conductividad mostraron. Además, los muestreos de los meses más cálidos de las lagunas con un estado ecológico muy malo o moderado se encontraron separados de los respectivos muestreos de otoño-invierno debido a mayores concentraciones de materia orgánica, DOC y clorofila-*a*.

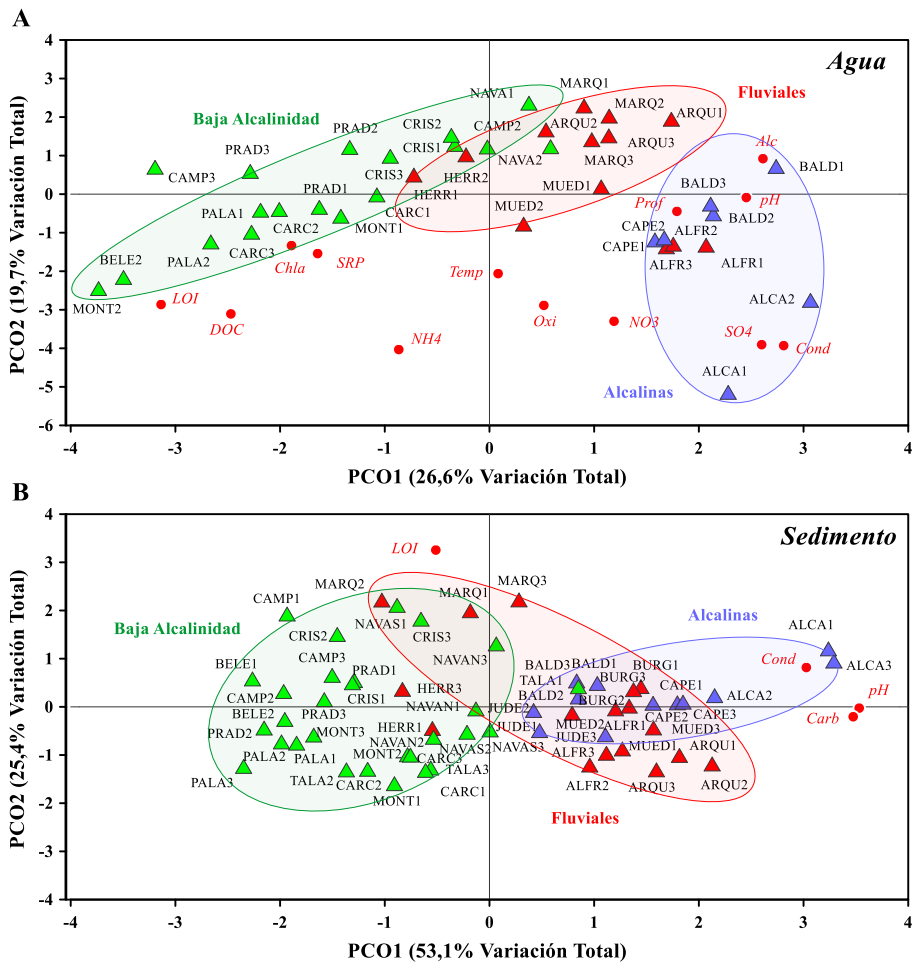


Figura 5.1. PCO de la ordenación de las muestras de agua (A) y de sedimento (B) en base a sus variables ambientales. Los códigos de las lagunas se encuentran en la Tabla 2.2. Los números adyacentes a los códigos de las lagunas indican los periodos de muestreo: 1 (otoño-invierno), 2 (primavera) y 3 (verano). Los colores de los símbolos que representan a las lagunas y los de las elipses que los rodean indican el tipo al que pertenecen: lagunas no salinas de aguas alcalinas (azul), lagunas fluviales (rojo), lagunas no salinas de baja alcalinidad (verde). Variables ambientales: Chla (clorofila-*a*), Alc (alcalinidad), LOI (materia orgánica), DOC (carbono orgánico disuelto), NH₄ (amonio), Oxi (oxígeno disuelto), Temp (temperatura), SRP (ortofosfato reactivo soluble), Cond (conductividad), NO₃ (nitrato), SO₄ (sulfato), Prof (profundidad), pH, Carb (Carbonato).

En la ordenación de las muestras de sedimento a partir de sus variables ambientales (Figura 5.1-B), las lagunas no salinas de baja alcalinidad estaban separadas de los otros tipos de lagunas y estaban relacionadas con pH y niveles de carbonato bajos. Las agrupaciones correspondientes a las lagunas fluviales y las no salinas de aguas alcalinas se encontraron solapadas en el PCO, y estaban influenciadas por pH, niveles de carbonato y conductividades elevadas. Por otra parte, en el sedimento no se encontró ningún patrón de cambio estacional, y el efecto del estado ecológico en base al componente trófico no fue tan evidente como en el agua.

5.2. Patrones generales y taxones marcadores

La asignación taxonómica a partir de los amplicones del gen que codifica para el 16S rRNA resultó en 58 fillos para el agua y 62 para el sedimento (Figura 5.2). En el agua (Figura 5.2-A), el filo Proteobacteria fue el más representado. Dentro de este filo, las familias *Rhodobacteraceae* y *Burkholderiaceae* se encontraron representadas en todos los tipos de humedales, pero las familias *Comamonadaceae* y *Beijerinckiaceae* fueron más abundantes en las lagunas no salinas de baja alcalinidad. El segundo filo más abundante fue Actinobacteriota, debido a la familia *Microbacteriaceae*, que estuvo presente en todos los tipos de lagunas, y por la familia *Mycobacteriaceae*, que fue más abundante en las lagunas fluviales y en las no salinas de baja alcalinidad. A su vez, el filo Cyanobacteria mostró picos de abundancia relativa en las lagunas con un estado trófico malo, pero al mismo tiempo también en las que presentaron un estado ecológico bueno. En el sedimento (Figura 5.2-B), el filo Chloroflexi fue el más abundante debido a la familia *Anaerolineaceae*, que estuvo presente en todos los tipos de lagunas. El filo Proteobacteria fue el segundo más abundante, estando las familias *Sphingomonadaceae* y *Comamonadaceae* repartidas por todos los tipos de lagunas.

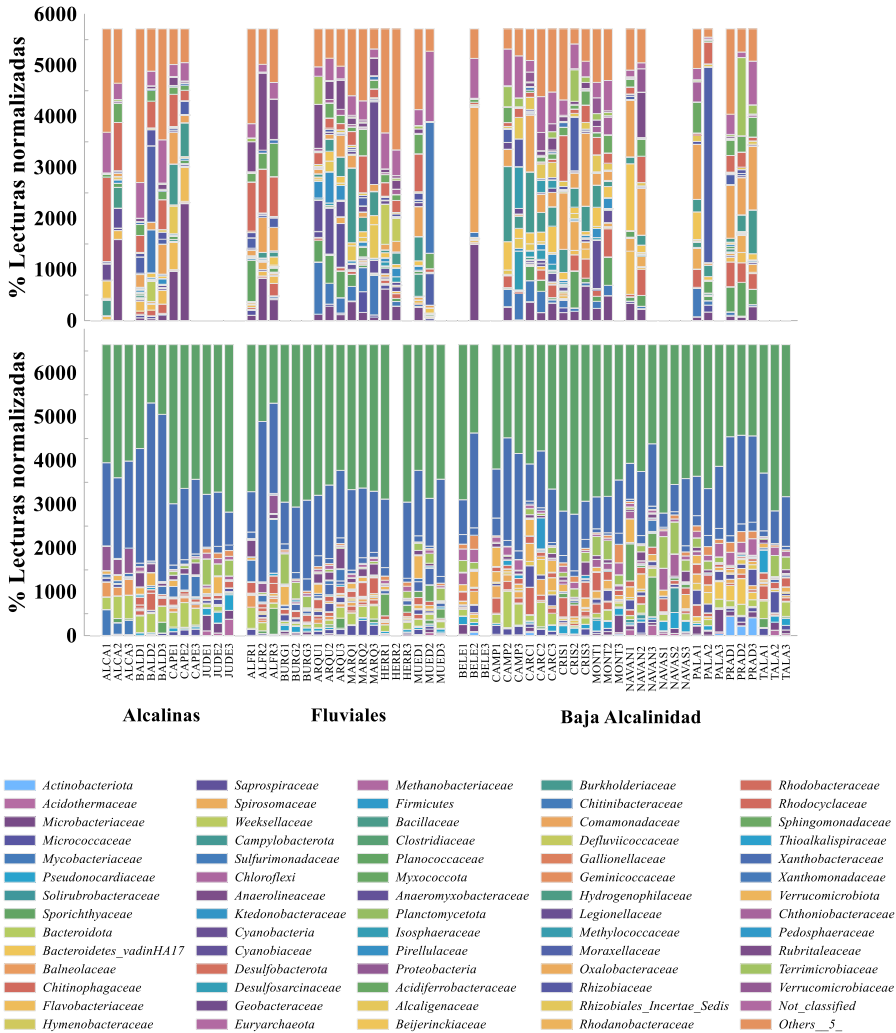


Figura 5.2. Abundancias relativas de las familias de procariotas del agua (arriba) y del sedimento (abajo) de las lagunas estudiadas. Las familias están agrupadas por filo. En el agua, las barras vacías indican que en ese periodo de muestreo la laguna estaba seca. En el sedimento, las barras vacías corresponden a las lagunas que se eliminaron de la rarefacción. En la leyenda, “Otros” se refiere a las familias que presentaron una abundancia relativa menor del 5%.

Por otra parte, los resultados del análisis IndVal (utilizado para detectar los taxones característicos) mostraron que los diferentes tipos de lagunas y a su

vez la mayoría de los diferentes estados ecológicos presentaron taxones indicadores (Figuras 5.3 y 5.4). No obstante, no se encontraron taxones indicadores para el estado ecológico alto, por lo que se decidió mostrar la asignación taxonómica de los ZOTUs que presentaron una abundancia relativa mayor del 70% en las lagunas que tenían este estado ecológico. En general, tanto en el agua como en el sedimento las familias de bacterias relacionados con el metabolismo del metano se encontraron entre los taxones indicadores más importantes, y mostraron más ZOTUs en las categorías y estados ecológicos con mayores emisiones de metano.

En cuanto a los taxones indicadores de los diferentes tipos de lagunas, en el agua (Figura 5.3-A), los taxones discriminantes con más ZOTUs en las lagunas no salinas de aguas alcalinas correspondieron a las familias *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae* y *Rhodobacteraceae*. En las lagunas fluviales, la familia *Rhodobacteraceae* también estuvo más representada, junto a las familias *Legionellaceae* y *Mycobacteriaceae*, mientras que en las lagunas no salinas de baja alcalinidad los taxones discriminantes con más ZOTUs fueron la familia *Comamonadaceae* y el orden *Rhizobiales*, aunque la familia *Beijerinckiaceae*, con miembros metanótrofos, también fue relevante. En el sedimento (Figura 5.4-A), en las lagunas no salinas de aguas alcalinas sólo se encontró un ZOTU indicador correspondiente al orden *Ardenticatenales* del filo Chloroflexi, mientras que en las lagunas fluviales los taxones discriminantes fueron las familias *Microscillaceae* y *Steroidobacteraceae*. En las lagunas no salinas de baja alcalinidad la familia *Pedosphaeraceae* fue la que más ZOTUs presentó, y al igual que en el agua la familia *Beijerinckiaceae* también fue relevante en este tipo de lagunas.

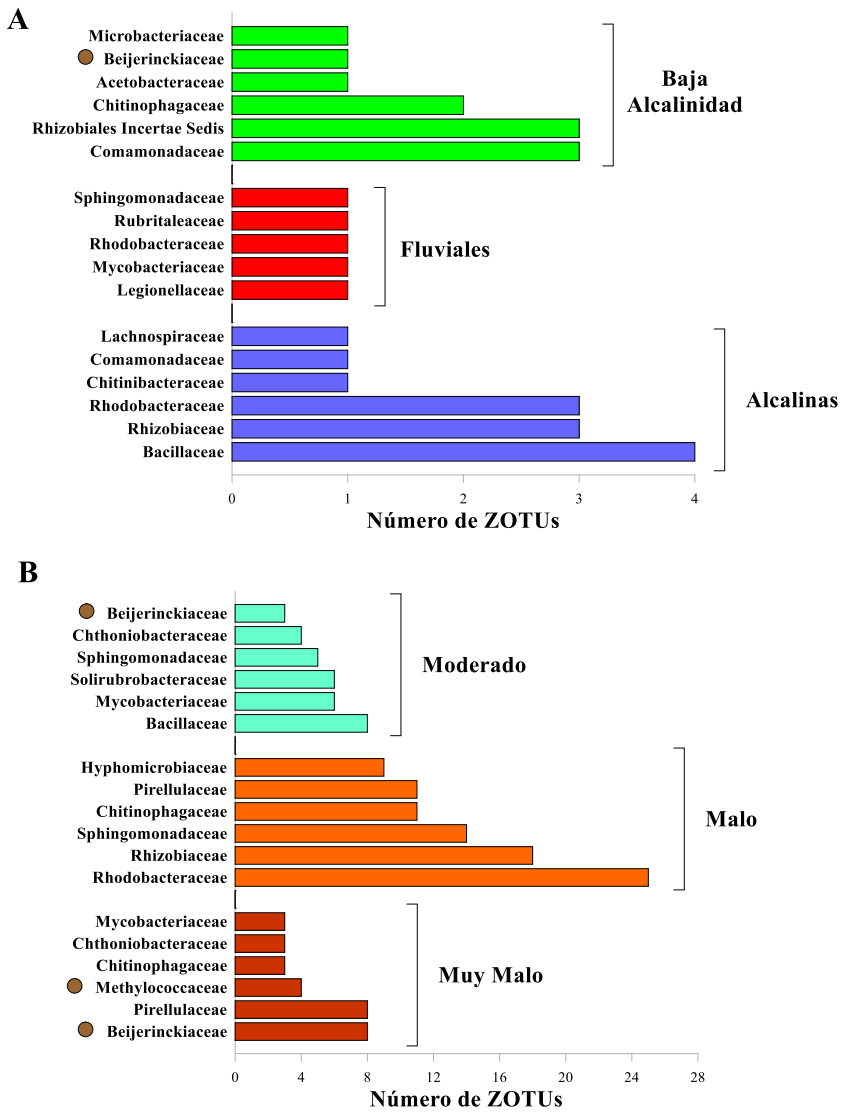


Figura 5.3. Taxonomía a nivel de familia de los taxones indicadores en el agua (ZOTUs con IndVal $R > 0,7$ y $p < 0,05$) para los diferentes tipos de lagunas (A) y para los diferentes estados ecológicos en base al componente trófico (B) en los que se agrupan las lagunas estudiadas. Si la asignación taxonómica no llegaba a nivel de familia, se ha mostrado el último nivel taxonómico con asignación. Se muestran como máximo las 6 familias con mayor número de ZOTUs. Las familias relacionadas con el metabolismo del metano se han señalado con un círculo marrón.

Por lo que respecta a los taxones indicadores de los diferentes estados ecológicos, en el agua (Figura 5.3-B), las familias con más ZOTUs indicadores para el estado ecológico muy malo fueron *Beijerinckiaceae*, *Pirellulaceae* y la familia de metanótrofos *Methylococcaceae*. En el estado ecológico malo, la familia *Rhodobacteraceae* fue la que más ZOTUs presentó, y en el estado ecológico moderado lo fue la familia *Bacillaceae*, aunque la familia *Beijerinckiaceae* también presentó ZOTUs marcadores. Para el estado ecológico muy bueno, las familias con más ZOTUs fueron *Anaerolineaceae* (136) y *Pirellulaceae* (86). En el sedimento (Figura 5.4-B), para el estado ecológico muy malo las familias con más ZOTUs indicadores fueron *Anaerolineaceae* y *Peptostreptococcaceae*, y la familia *Methylococcaceae* también fue relevante. En el estado ecológico malo, las familias indicadoras con más ZOTUs fueron *Anaerolineaceae* y *Spirochaetaceae*, mientras que en el estado ecológico moderado lo fueron las familias *Pedosphaeraceae* y *Ktedonobacteraceae*. Para el estado ecológico muy bueno, las familias con más ZOTUs fueron *Anaerolineaceae* (270) y *Rhodobacteraceae* (128). Así, tanto en el agua como en el sedimento las familias de bacterias que estaban relacionadas con el metabolismo del metano se encontraron sobre todo en el estado ecológico muy malo.

Por otra parte, el análisis PERMANOVA mostró que en el agua las comunidades de los diferentes tipos de laguna mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), y en lo respectivo a los diferentes estados ecológicos en base al componente trófico, las comunidades también mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) excepto entre los estados Malo-Moderado y Muy Malo-Moderado, que no mostraron diferencias entre ellos. En el sedimento, todos los tipos de lagunas mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,01$) y también todos los estados ecológicos ($p < 0,01$) excepto entre Muy Malo-Moderado, que no mostraron diferencias.

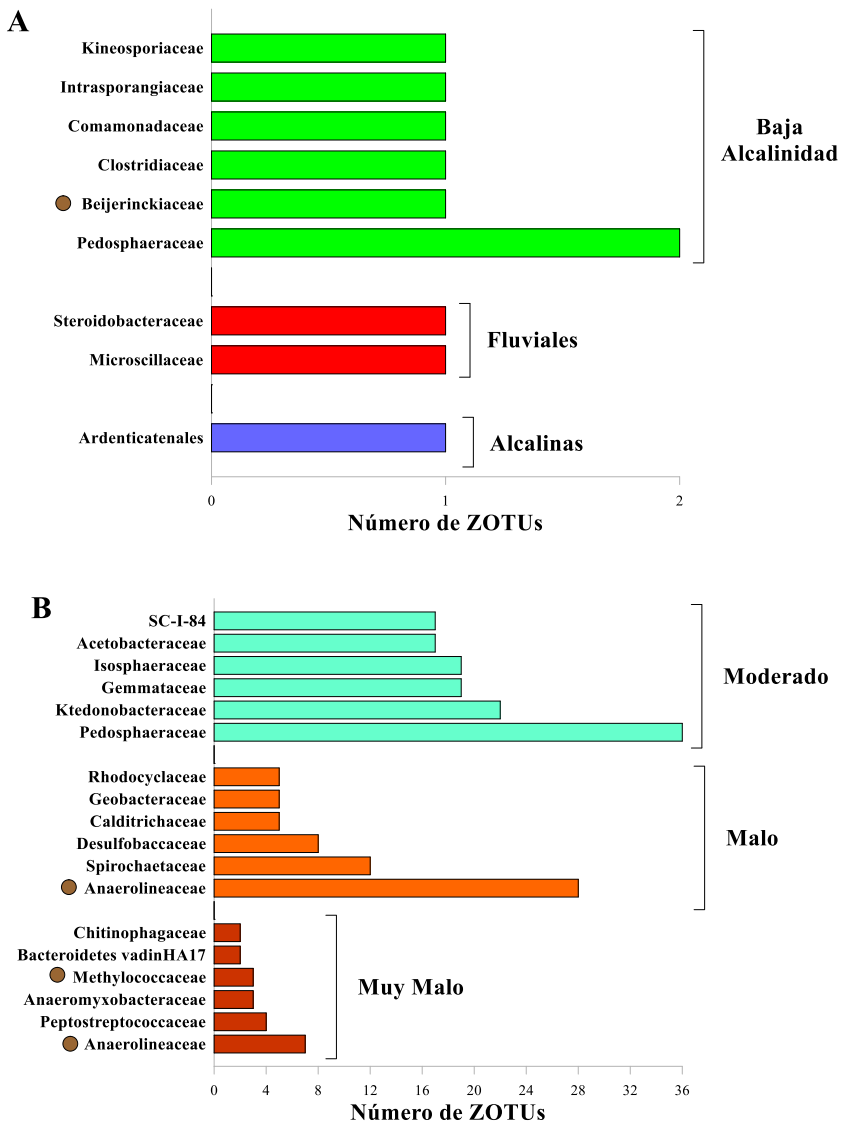


Figura 5.4. Taxonomía a nivel de familia de los taxones indicadores en el sedimento (ZOTUs con IndVal $R > 0,7$ y $p < 0,05$) para los diferentes tipos de lagunas (A) y para los diferentes estados ecológicos en base al componente trófico (B) en los que se agrupan las lagunas estudiadas. Si la asignación taxonómica no llegaba a nivel de familia, se ha mostrado el último nivel taxonómico con asignación. Se muestran como máximo las 6 familias con mayor número de ZOTUs. Las familias relacionadas con el metabolismo del metano se han señalado con un círculo marrón.

5.3. *Metanogénesis y metanotrofia en lagunas no salinas de interior*

En cuanto a la distribución de las diferentes familias de arqueas metanógenas y de bacterias metanótrofas, se pudieron observar patrones diferentes entre los tipos de lagunas y entre los estados ecológicos (Figura 5.5).

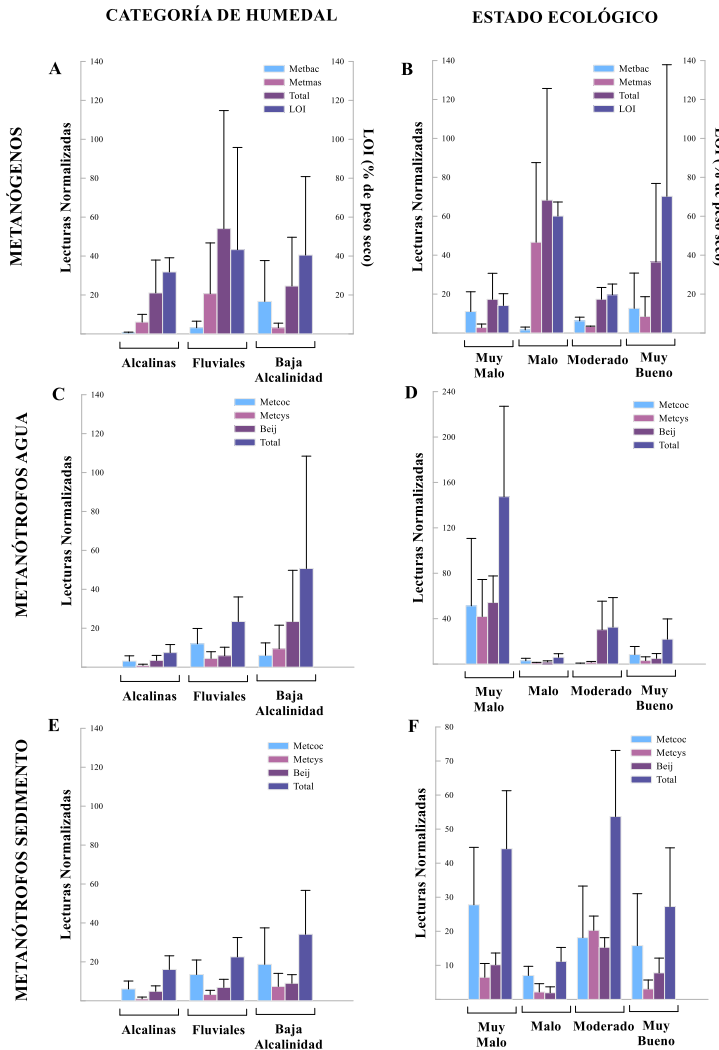


Figura 5.5. Distribución de la abundancia relativa promedio de las arqueas metanógenas en el sedimento (A-B) y de las bacterias metanótrofas en el agua (C-D) y en el sedimento (E-F) a lo largo de los diferentes tipos de lagunas y estados ecológicos determinados en base al

componente trófico. Se muestran la abundancia total de las arqueas metanógenas y de las bacterias metanótrofas y a su vez la abundancia de las familias más relevantes de cada uno de estos grupos de microorganismos. En A y B, se muestra también el contenido promedio en materia orgánica del sedimento (LOI). Total: abundancia total. Metbac: Familia *Methanobacteriaceae*. Metmas: Familia *Methanomassiliococcaceae*. Metcoc: Familia *Methylococcaceae*. Metcys: Familia *Methylocystaceae*. Beij: Familia *Beijerinckiaceae*.

Respecto a las arqueas metanógenas del sedimento en los diferentes tipos de lagunas (Figura 5.5-A), la menor abundancia relativa de metanógenos se observó en las lagunas no salinas de aguas alcalinas y las mayores en las lagunas fluviales. A su vez, la menor cantidad de materia orgánica en sedimento se observó en las lagunas no salinas de aguas alcalinas, mientras que las lagunas fluviales y las no salinas de baja alcalinidad mostraron más cantidad de materia orgánica. Por otra parte, los tres tipos de lagunas mostraron una comunidad de metanógenos taxonómicamente similar, pero con diferencias en la abundancia relativa de las familias mayoritarias. Las lagunas no salinas de aguas alcalinas y las lagunas fluviales presentaron una comunidad de metanógenos parecida, siendo la familia *Methanomassiliococcaceae* la que mostró la mayor abundancia relativa. En cambio, en las lagunas no salinas de baja alcalinidad la familia de metanógenos mayoritaria fue *Methanobacteriaceae*, con una abundancia significativamente mayor respecto a las lagunas alcalinas ($p < 0,01$) y fluviales ($p < 0,05$). En lo concerniente a los estados ecológicos determinados en base al componente trófico (Figura 5.5-B), no se observaron tendencias estadísticamente significativas, pero las arqueas metanógenas mostraron la abundancia relativa más baja en las lagunas con un estado muy malo o moderado, y su abundancia fue mayor en las lagunas con un estado malo o muy bueno. Este mismo patrón se repitió para la materia orgánica del sedimento, siendo las lagunas con un estado muy malo o moderado las que menor cantidad de materia orgánica en el sedimento presentaron y las lagunas con un estado malo o muy bueno las que más materia orgánica mostraron.

Además, la familia *Methanomassiliicoccaceae* fue la más abundante en las lagunas con estados ecológicos malo, mientras que la familia *Methanobacteriaceae* fue la más abundante en las lagunas con estados ecológicos muy malos o moderados.

En cuanto a las bacterias metanótrofas en el agua, las lagunas no salinas de baja alcalinidad mostraron una abundancia relativa de metanótrofos significativamente más alta respecto a las lagunas de aguas alcalinas ($p < 0,05$), y las lagunas fluviales también mostraron una abundancia mayor respecto a las lagunas de aguas alcalinas ($p < 0,01$) (Figura 5.5-C). Los diferentes tipos de lagunas mostraron una comunidad de metanótrofos similar, siendo la familia *Methylococcaceae* significativamente más abundante en las lagunas fluviales respecto a las alcalinas ($p < 0,01$) y las de baja alcalinidad ($p < 0,05$). Respecto a los diferentes estados ecológicos determinados en base al componente trófico (Figura 5.5-D), la mayor abundancia relativa de metanótrofos se observó en las lagunas con un estado ecológico muy malo, con diferencias significativas con las lagunas con estado ecológico malo ($p < 0,05$) y muy bueno ($p < 0,01$). La familia *Methylococcaceae* se mostró como las más abundante en todos ellos excepto en el estado ecológico moderado, sin diferencias significativas entre ellos. Las familias *Methylocystaceae* y *Beijerinckiaceae* mostraron una abundancia relativa significativamente mayor en las lagunas con estado ecológico muy malo respecto a las lagunas con estado ecológico malo ($p < 0,05$) y muy bueno ($p < 0,01$). En el sedimento, las lagunas fluviales y las lagunas no salinas de baja alcalinidad mostraron una abundancia de metanótrofos similar, siendo las lagunas no salinas de aguas alcalinas las que mostraron la abundancia más baja, significativamente menor en comparación con las de baja alcalinidad ($p < 0,05$) (Figura 5.5-E). Las familias *Methylococcaceae* y *Methylocystaceae* fueron significativamente más abundantes en las lagunas fluviales ($p < 0,01$) y las de baja alcalinidad (p

< 0,05) con respecto a las alcalinas. La familia *Beijerinckiaceae* fue más abundante en las lagunas de baja alcalinidad con respecto a las alcalinas ($p < 0,05$). Por otra parte, los estados de conservación muy malo y moderado presentaron las mayores abundancias (Figura 5.5-F), con diferencias significativas entre muy malo-malo ($p < 0,05$), muy malo-muy bueno ($p < 0,05$), malo-muy bueno ($p < 0,05$) y moderado-muy bueno ($p < 0,05$). La familia *Methylococcaceae* fue la que mayor abundancia relativa presentó, pero sin diferencias significativas entre estados ecológicos, mientras que la familia *Methylocystaceae* mostró diferencias entre los estados muy malo-moderado ($p < 0,05$), muy malo-muy bueno ($p < 0,05$) y moderado-muy bueno ($p < 0,01$). La familia *Beijerinckiaceae* mostró diferencias entre los estados muy malo-malo ($p < 0,05$), malo-muy bueno ($p < 0,05$) y moderado-muy bueno ($p < 0,05$).

5.4. Metabolismos del carbono *in situ* e inferencia molecular

Las regresiones entre las tasas promedio de producción primaria bruta (GPP) y de respiración medidas *in situ* y la inferencia molecular de las cantidades génicas (*gene counts*) promedio de sus respectivos genes marcadores mostraron un patrón antagónico, mientras que las regresiones entre las abundancias de las arqueas metanógenas y de las bacterias metanótrofas y las regresiones de las emisiones de metano con la abundancia relativa de las bacterias metanótrofas fueron positivas (Figura 5.6).

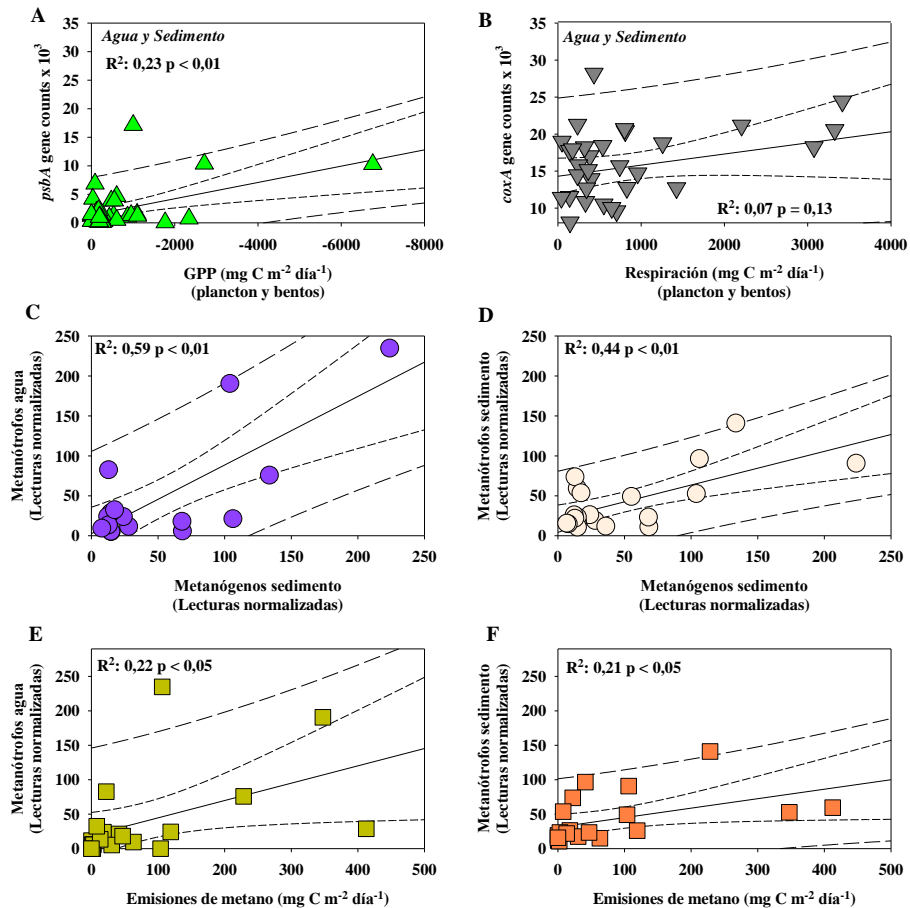


Figura 5.6. Regresiones entre los promedios por laguna de las tasas metabólicas con *gene counts* de los respectivos genes marcadores obtenidos con PICRUST2, de la abundancia relativa de las arqueas metanógenas con la abundancia relativa de las bacterias metanótroficas y de las emisiones de metano con la abundancia relativa de las bacterias metanótroficas. A: regresión entre las tasas de GPP y *gene counts* del gen *psbA* de agua y sedimento. B: regresión entre las tasas de respiración aerobia y *gene counts* del gen *coxA* de agua y sedimento. C: regresión entre las abundancias relativas de las arqueas metanógenas y de las bacterias metanótroficas en el agua. D: regresión entre las abundancias relativas de las arqueas metanógenas y de las bacterias metanótroficas en el sedimento. E: regresión entre las tasas de emisión de metano y las abundancias relativas de las bacterias metanótroficas en el agua. F: regresión entre las tasas de emisión de metano y las abundancias relativas de las bacterias metanótroficas en el sedimento.

La producción primaria bruta (GPP) presentó una correlación significativa entre las tasas medidas y *gene counts* del gen *psbA* (Figura 5.6-A), pero la respiración no mostró una correlación significativa entre las tasas medidas y los *gene counts* del gen *coxA* (Figura 5.6-B). Por otra parte, tanto en agua como en sedimento hubo una correlación significativa entre las abundancias relativas promedio de metanógenos y de metanótrofos (Figura 5.6-C y D), y también hubo una correlación significativa entre las abundancias relativas de metanótrofos de agua y de sedimento con las emisiones de metano (Figura 5.6-E y F). No obstante, no se encontró ninguna correlación entre *gene counts* promedio del gen *mcrA* en sedimento y las emisiones promedio de metano ($R^2: 0,03$, $p = 0,47$) ni entre las emisiones promedio de metano y la abundancia promedio de metanógenos en sedimento ($R^2: 0,09$, $p = 0,21$). Tampoco se encontró una correlación entre la cantidad promedio de materia orgánica del sedimento y la abundancia promedio de metanógenos ($R^2: 0,17$, $p = 0,07$). Por otra parte, no se encontró ninguna correlación entre las emisiones promedio de metano ni con *gene counts* promedio de gen *pmoA* en agua ($R^2: 0,18$, $p = 0,06$) ni con los de sedimento ($R^2: 0,002$, $p = 0,87$).

5.5. Redes de coocurrencia de las comunidades de procariontas

La inferencia de las interacciones entre los miembros de las comunidades de procariontas resultó en una red para la comunidad del agua formada por 366 nodos y 1513 bordes (Figura 5.7-A) y una red de la comunidad de sedimento compuesta por 441 nodos y 1902 bordes (Figura 5.7-B).

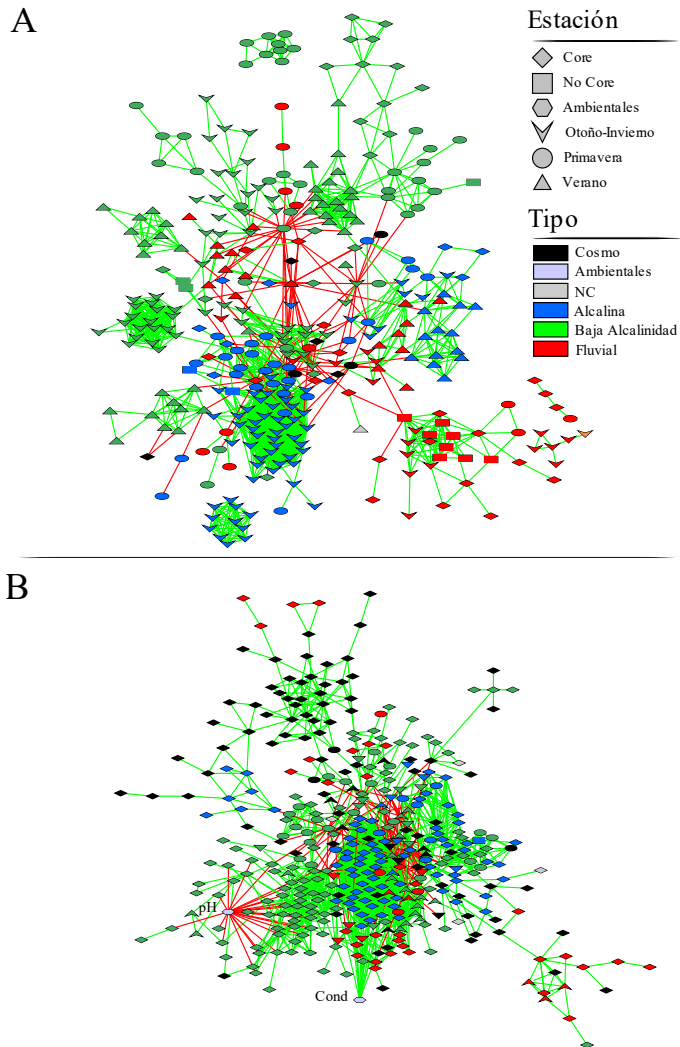


Figura 5.7. Red de coocurrencia de las comunidades de procariotas del agua (A) y del sedimento (B). Los ZOTUs se han representado como nodos y las interacciones entre ellos en forma de líneas llamadas bordes (*edges*). El color de las líneas que representan las interacciones entre los nodos es verde si dicha interacción es de presencia mutua (coocurrencia) y rojo si dicha interacción es de exclusión mutua (coexclusión). La forma del nodo indica la estación en la que el ZOTU al cual representa es mayoritario y el color del nodo la laguna en el que dicho ZOTU es mayoritario. Cosmo: ZOTUs presentes en todas las lagunas o cosmopolitas. Core: ZOTUs presentes en todas las estaciones. Los ZOTUs que están compartidos entre varias lagunas, pero no están en todas ellas se indican como NC, y los que están compartidos entre varias estaciones pero no están en todas ellas se indican como No Core.

La red del agua presentó un *clustering coefficient* (que informa de la complejidad de la red) de 0,595 y una modularidad (que informa del grado de compartimentalización de la red) de 0,809, mostrando una mayor complejidad y compartimentalización que la red del sedimento, que mostró un *clustering coefficient* de 0,498 y una modularidad de 0,722. A su vez, en la red del sedimento el nodo que representa a la conductividad mostró relaciones de copresencia con los nodos asociados a la Laguna de Alcaparrosa, mientras que el nodo que representa al pH mostró relaciones de exclusión con los nodos de las lagunas no salinas de baja alcalinidad.

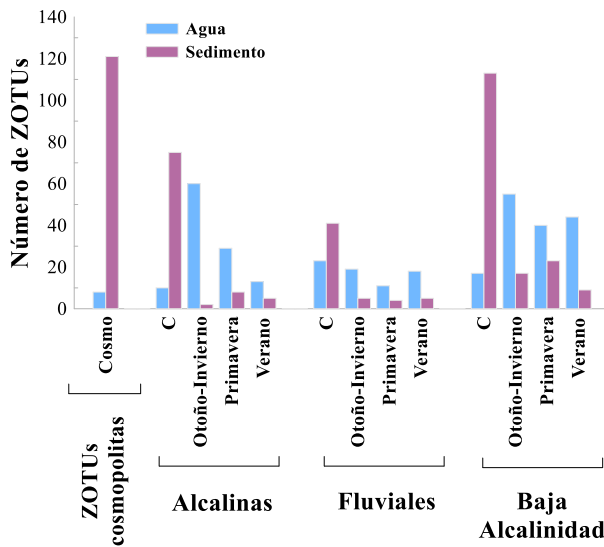


Figura 5.8. Distribución de los ZOTUs de las redes de coocurrencia del agua y del sedimento. Se muestra el número de ZOTUs presentes en todos los tipos de lagunas o cosmopolitas (Cosmo). Además, dentro de cada tipo de laguna, se muestra la distribución de los ZOTUs presentes en todas las estaciones (C) y de los ZOTUs específicos de cada estación de muestreo.

Por otra parte, las redes del agua y del sedimento mostraron patrones muy diferentes en cuanto a la distribución de los ZOTUs entre los diferentes tipos de lagunas y estaciones (Figura 5.8). La red del agua mostró un número muy bajo de ZOTUs cosmopolitas (Cosmo), presentes en todos los tipos de

lagunas, mientras que la red del sedimento mostró un número muy alto de estos ZOTUs. Además, los diferentes tipos de lagunas tanto el agua como el sedimento mostraron ZOTUs específicos de determinadas estaciones y ZOTUs presentes en todas las estaciones (C). No obstante, en el agua los ZOTUs estacionales eran más abundantes que los ZOTUs presentes en todas las estaciones (C), mientras que en el sedimento ocurrió lo contrario, siendo los ZOTUs presentes durante todas las estaciones (C) los mayoritarios en todas las categorías de humedales y habiendo pocos ZOTUs estacionales.

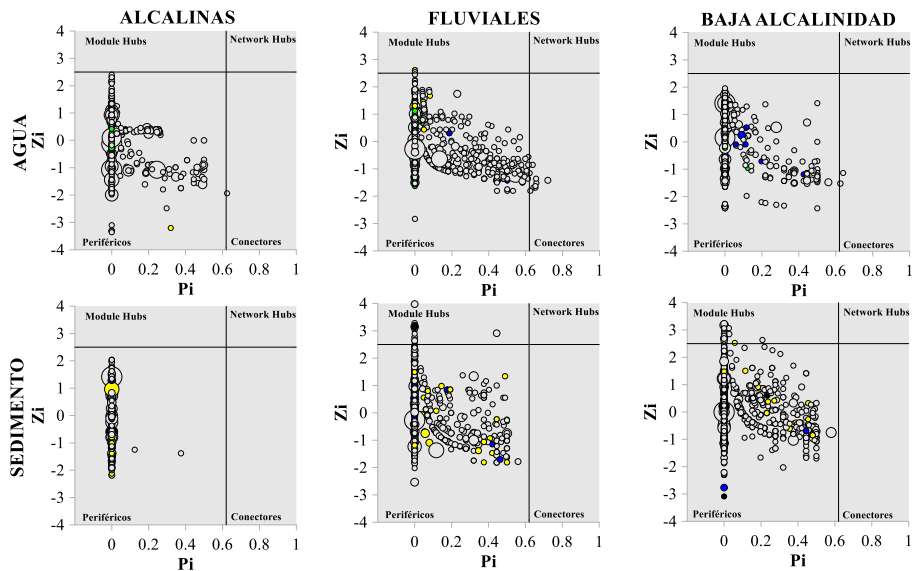


Figura 5.9. Gráfico Z_i - P_i que muestra, para el agua y para el sedimento, la distribución de los nodos que forman las redes de coocurrencia específicas de cada tipo de laguna en base a sus específicas de cada tipo de laguna en base a sus roles topológicos. El tamaño del símbolo que representa a los nodos es proporcional a su abundancia en la red, y el color indica cuál de los siguientes genes está presente en el ZOTU al que representa el nodo: amarillo (*dsrB*), verde (*psbA*), azul (*pmoA*), negro (*mcrA*). Z_i : conectividad intramódulo. P_i : conectividad entre módulos.

En cuanto a los roles topológicos de los nodos de las redes de coocurrencia de cada tipo de laguna (Figura 5.9), tanto en las redes del agua como en las del sedimento la mayoría de los nodos se clasificaron como periféricos. Además,

muchos nodos periféricos fueron los que mostraron la abundancia relativa más grande de sus respectivas redes. Contrariamente, los nodos clasificados como *module hubs* o como conectores mostraron una abundancia relativa baja.

En la red del agua de las lagunas fluviales, los nodos clasificados como *module hubs* pertenecieron al orden *Bacteroidales* y a las familias *Syntrophobacteraceae* y *Rubritaleaceae*. En el sedimento, los nodos de la red de las lagunas fluviales clasificados como *module hubs* pertenecieron sobre todo a familias relacionadas con el metabolismo del metano, como la familia arqueana *Methanobacteriaceae* y las bacterianas *Anaerolineaceae* y *Methylococcaceae*. En la red de sedimento de las lagunas no salinas de baja alcalinidad, los *module hubs* pertenecieron mayoritariamente a las familias *Ktedonobacteraceae*, *Isosphaeraceae*, *Syntrophobacteraceae* (que es una familia de bacterias sulfatoreductoras), y *Beijerinckiaceae*.

Por otra parte, los nodos conectores sólo se encontraron en las redes del agua. En la red de las lagunas no salinas de aguas alcalinas, el único nodo conector fue asignado a la familia *Rhodobacteraceae*. En la red de lagunas fluviales, estos nodos pertenecieron a las familias *Beijerinckiaceae*, *Legionellaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Reyranellaceae*, *Pirellulaceae* y al orden *Rhizobiales*.

En la red de las lagunas no salinas de baja alcalinidad, los nodos conectores pertenecieron a las familias *Mycobacteriaceae* y *Pirellulaceae*. Por lo que respecta a los genes relacionados con los metabolismos del carbono y del azufre, tanto en el agua como en el sedimento estaban presentes mayoritariamente en los nodos periféricos de las redes de todos los tipos de lagunas. No obstante, estos genes también los presentaron algunos nodos clasificados como *module hubs*, sobre todo en la red de las lagunas fluviales del sedimento.

5.6. Gradientes ambientales y ordenación de las comunidades de procariotas

La alcalinidad, el pH y el contenido de carbonato se mostraron como las variables ambientales más relevantes en la ordenación de las comunidades de procariotas del agua (Figura 5.10-A) y del sedimento (Figura 5.10-B).

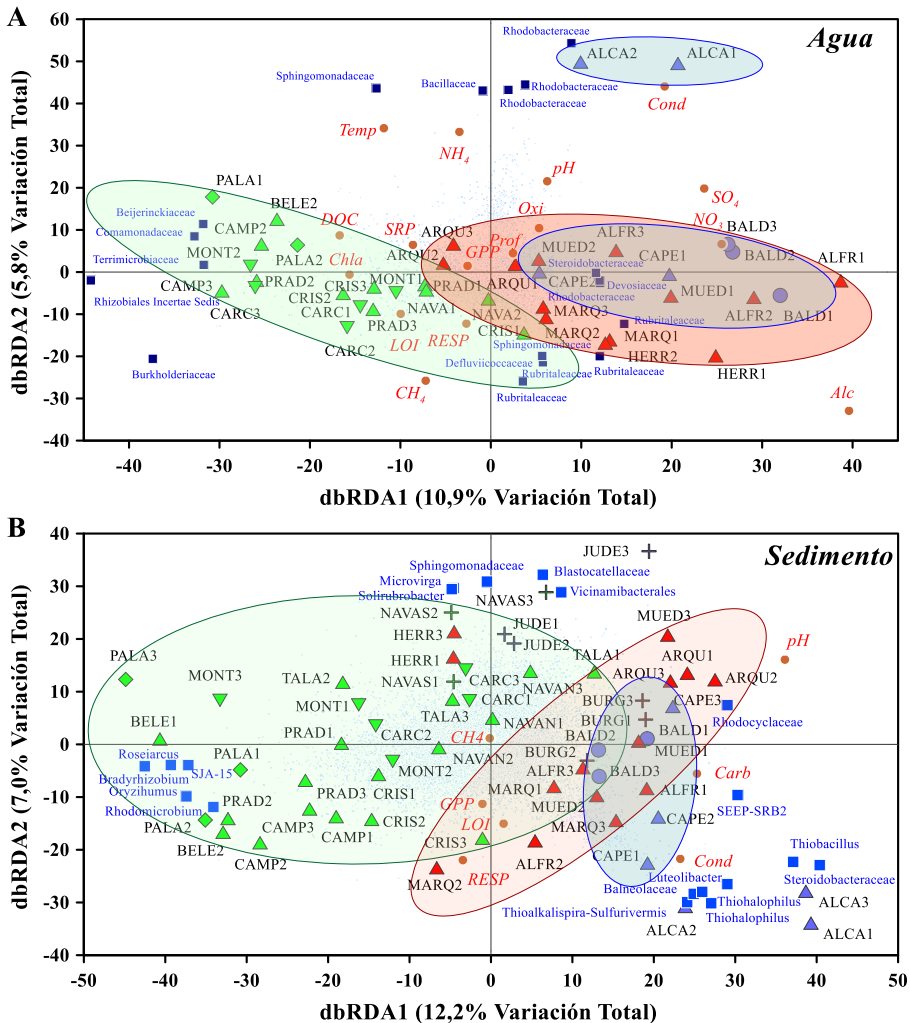


Figura 5.10. dbRDA mostrando la ordenación de las comunidades de procariotas del agua en base a las variables ambientales. Los códigos de las lagunas están descritos en la Tabla 2.2. Los números adyacentes a los códigos de las lagunas indican los periodos de muestreo: 1 (otoño-invierno), 2 (primavera) y 3 (verano). Los colores de los símbolos que representan a las lagunas

indican el tipo de laguna al que pertenecen: lagunas no salinas de aguas alcalinas (azul), lagunas fluviales (rojo), lagunas no salinas de baja alcalinidad (verde). La forma de los símbolos que representan las lagunas indica el estado ecológico en el que se encuentran: alto (▲), moderado (◆), pobre (●) y malo (▼). Los puntos pequeños de color azul representan los ZOTUs considerados en la dbRDA, pero sólo se muestra la asignación taxonómica (hasta el último nivel con asignación) de los ZOTUs con mayor capacidad de discriminación (cuadrados azul oscuro). Variables ambientales: Chla (clorofila-a), Alc (alcalinidad), LOI (materia orgánica), DOC (carbono orgánico disuelto), NH₄ (amonio), Oxi (oxígeno disuelto), Temp (temperatura), SRP (ortofosfato reactivo soluble), Cond (conductividad), NO₃ (nitrato), SO₄ (sulfato), Prof (profundidad), pH y Carb (Carbonato). Tasas metabólicas: GPP (producción primaria bruta), RESP (respiración aerobia), CH₄ (emisiones de metano).

En el agua, las comunidades de las lagunas no salinas de baja alcalinidad se relacionaron con mayores tasas de emisión de metano, mayor contenido de materia orgánica y con las familias *Beijerinckiaceae*, *Comamonadaceae* y *Burkholderiaceae*. A su vez, estas lagunas formaron un grupo separado de las comunidades de las lagunas fluviales y las no salinas de aguas alcalinas, que se mostraron parcialmente solapadas y relacionadas con mayores niveles de alcalinidad y pH. Las lagunas fluviales mostraron una mayor relevancia de las familias *Rhodobacteraceae*, *Rubritaleaceae* y *Sphingomonadaceae*. Las lagunas no salinas de aguas alcalinas no formaron un grupo homogéneo porque la laguna de Alcaparrosa se relacionó con conductividades altas. Este tipo de lagunas presentó una mayor abundancia de las familias *Rhodobacteraceae* (Alcaparrosa), *Steroidobacteraceae* y *Devosiaceae*. Por otra parte, las lagunas con un estado ecológico (determinado en base al componente trófico) muy malo o moderado formaron un grupo durante los muestreos de las estaciones más cálidas que estaba relacionado con niveles más elevados de Chl-*a* y DOC y con mayor relevancia de la familia *Beijerinckiaceae*. Contrariamente, las lagunas con un estado ecológico malo o muy bueno formaron grupos dispersos más influenciados por la categoría de humedal a la que pertenecían que por su estado ecológico.

En el sedimento, las comunidades de procariotas de las lagunas no salinas de baja alcalinidad formaron un grupo separado del resto de categorías de humedales y se relacionaron con valores bajos de pH y de carbonato. Los géneros más relevantes en este grupo fueron *Roseiarcus* y *Rhodomicrobium*. Las lagunas fluviales y las no salinas de aguas alcalinas formaron dos grupos parcialmente solapados en la ordenación, y se relacionaron con valores más altos de pH y carbonato. Las lagunas fluviales mostraron una mayor relevancia de la familia *Rhodocyclaceae*, mientras que las lagunas no salinas de aguas alcalinas formaron un grupo disperso debido a la mayor influencia de la conductividad en la Laguna de Alcaparrosa y en la Laguna de Capellanes, que presentaron una mayor abundancia de las familias *Steroidobacteraceae* y *Balneolaceae* y del género *Thiohalophilus*. El Ullal de Baldoví y la Laguna de Judes estuvieron solapados con las lagunas fluviales y mostraron una mayor abundancia de las familias *Rhodocyclaceae* y *Blastocatellaceae*. Contrariamente al agua, en el sedimento no se observó un efecto de la estacionalidad ni del estado ecológico (determinado en base al componente trófico) muy malo en las comunidades de procariotas, ni en el caso de los muestreos más cálidos.

Capítulo 6. Efecto de la temperatura en la expresión génica de las arqueas metanógenas

En este capítulo, se ha estudiado experimentalmente el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en las emisiones de metano y en la transcripción de los genes que codifican para el 16S rRNA de las arqueas metanógenas y para la subunidad alfa de la enzima *methyl-coenzyme M reductase (mcrA)* de estos microorganismos, la cual participa en el último paso de la metanogénesis. El experimento se llevó a cabo con sedimento de humedales representativos de las grandes categorías de zonas húmedas mediterráneas: lagunas salinas de interior, lagunas costeras, lagunas volcánicas y lagunas no salinas de interior. Para este experimento, dichos humedales fueron muestreados de forma única en un periodo concreto del ciclo hidrológico.

6.1. Emisiones de metano y relación con la temperatura

Los humedales estudiados en este capítulo presentaron una gran variación en la conductividad y el contenido en materia orgánica del sedimento (Tabla 6.1). Las mayores conductividades se observaron en las lagunas salinas de interior y en algunas de las costeras. En cuanto a la materia orgánica del sedimento, en general los valores más altos se observaron en las lagunas volcánicas y en las no salinas de interior. Respecto a las salinas de interior, en estas se observó un gradiente de salinidad, mostrando la laguna de Caballo Alba las conductividades y la cantidad de materia orgánica más baja, mientras que las lagunas de Zorrilla y Salada de Chiprana mostraron las conductividades y materia orgánica más elevadas. En las lagunas costeras también se observó un gradiente de salinidad muy marcado, siendo la Desembocadura del Bullent la que mostró al mismo tiempo la menor conductividad y a su vez una cantidad de materia orgánica muy baja, mientras que las mayores conductividades se

observaron en Encayissada y las Salinas del Cabo de Gata. Las lagunas volcánicas mostraron una cantidad de materia orgánica en el sedimento elevada, excepto la laguna de Fuentillejo, que mostró los valores más bajos de esta variable y a su vez la mayor conductividad.

Tabla 6.1. Valores de conductividad y de materia orgánica (LOI, expresada en porcentaje de peso seco) del sedimento de los humedales estudiados en este capítulo. Los códigos de las lagunas se encuentran en el apartado de lugares de estudio del capítulo 2 y en las Tablas 2.1 y 2.2.

| Categoría de humedal | Humedal | Conductividad (mS·cm ⁻¹) | LOI (%) |
|------------------------|---------|---|---------|
| Salinas de Interior | ALBA | 9,9 | 5,6 |
| | ZORR | 51,0 | 12,6 |
| | CHIP | 78,5 | 14,4 |
| Costeras | BULL | 3,5 | 0,6 |
| | SENI | 6,9 | 5,1 |
| | ENCA | 19,0 | 15,9 |
| | GATA | 47,3 | 8,3 |
| Volcánicas | CARR | 0,5 | 15,5 |
| | CARA | 0,6 | 10,5 |
| | FUEN | 4,9 | 6,5 |
| No salinas de interior | BELE | 0,1 | 11,7 |
| | MUED | 1,5 | 12,3 |
| | PRAD | 0,5 | 11,4 |
| | ALCA | 2,4 | 6,3 |
| | BALD | 3,2 | 16,8 |
| | BURG | 11,8 | 9,4 |

En cuanto a las lagunas no salinas de interior, las lagunas de Beleña, Balsa la Mueda y Pradales mostraron las menores conductividades, pero una cantidad de materia orgánica elevada, mientras que las lagunas de Alcaparrosa, Ullal de Baldoví y Burgo de Ebro mostraron unas conductividades elevadas, sobre

todo el Burgo de Ebro, que es un humedal que normalmente se encuentra seco y sólo se inunda ocasionalmente durante las crecidas del río Ebro.

Por otra parte, la influencia del incremento de la temperatura en las emisiones de metano mostró patrones diferentes en cada categoría de humedal y a su vez en cada laguna (Figura 6.1).

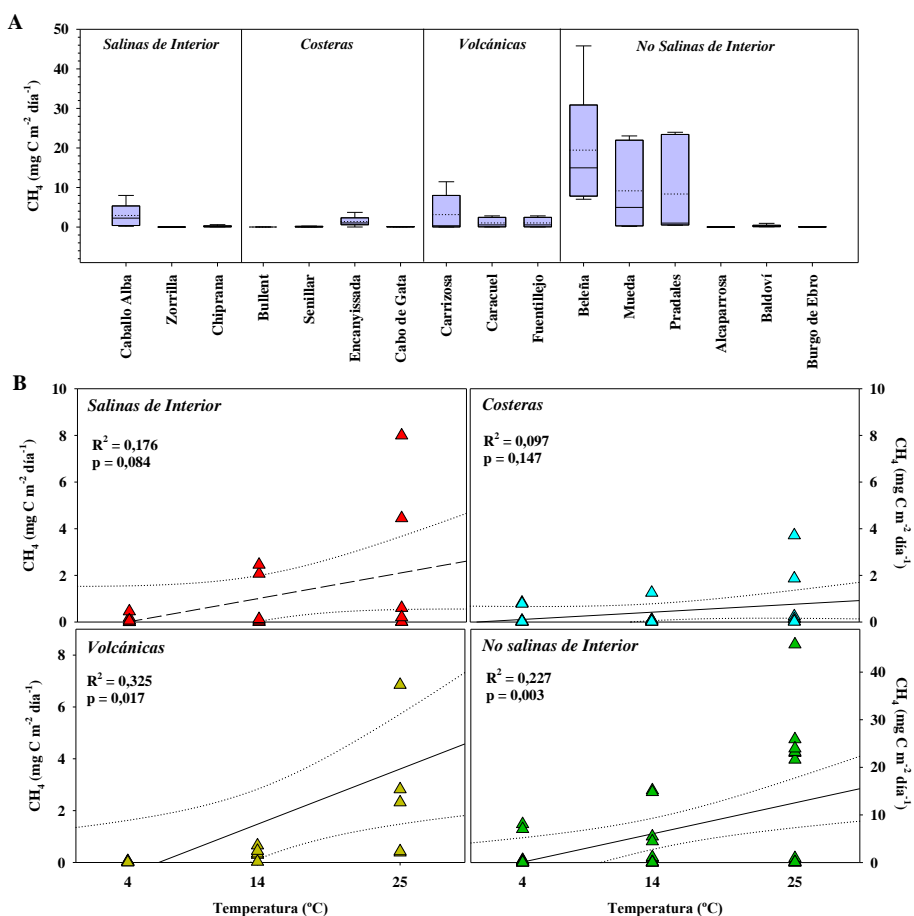


Figura 6.1. Emisiones de metano en cada laguna y su relación con la temperatura. A) Diagramas de caja que muestra las emisiones de metano de cada laguna medidas durante el experimento de temperatura. Las lagunas se han agrupado en 4 categorías de humedales: salinas de interior, costeras, volcánicas y no salinas de interior. En las lagunas salinas de interior y costeras, se han ordenado las lagunas siguiendo un gradiente de salinidad ascendente. B)

Correlación entre las emisiones de metano y el incremento de temperatura en cada categoría de humedal

En general, las mayores emisiones de metano se observaron en las lagunas no salinas de interior y en las volcánicas, mientras que las lagunas costeras y las salinas fueron las que mostraron una menor emisión de metano. No obstante, dentro de cada categoría de humedal se observó una gran variabilidad en las emisiones de metano, sobre todo en las lagunas no salinas de interior, donde se midieron las mayores emisiones de metano de todo el estudio. En concreto, la Laguna de Beleña, la Laguna de Pradales y la Balsa de la Mueda mostraron las mayores emisiones, pero en el Ullal de Baldoví, la Laguna de Alcaparrosa y el Galacho de El Burgo de Ebro se midieron emisiones de metano muy bajas. Por otra parte, en las lagunas salinas y en las costeras se observó una disminución de las emisiones de metano a medida que aumentaron los valores de conductividad del sedimento. Por lo que respecta a la relación entre las emisiones de metano y la temperatura, sólo se observó una correlación positiva significativa entre el aumento de la temperatura y las emisiones de metano en las lagunas volcánicas y en las no salinas de interior.

6.2. Influencia de la temperatura y de la categoría de humedal y la expresión de los genes *mcrA* y *16S*.

El incremento de la temperatura determinó la cantidad, detectada mediante qPCR, de transcritos del gen *mcrA* (Figura 6.2). La variación en las cantidades de los transcritos de este gen dependió de la categoría de humedal en que se clasificaron las lagunas, y a su vez mostró patrones específicos en cada laguna.

Las mayores cantidades de transcritos del gen *mcrA* detectadas por qPCR se observaron en las lagunas no salinas de interior y en las volcánicas, mientras que las lagunas costeras y las salinas de interior mostraron una cantidad baja de transcritos de este gen, indetectables en la mayoría de las lagunas. A su vez,

en cada categoría de humedal se observó una gran variabilidad en la cantidad de transcritos.

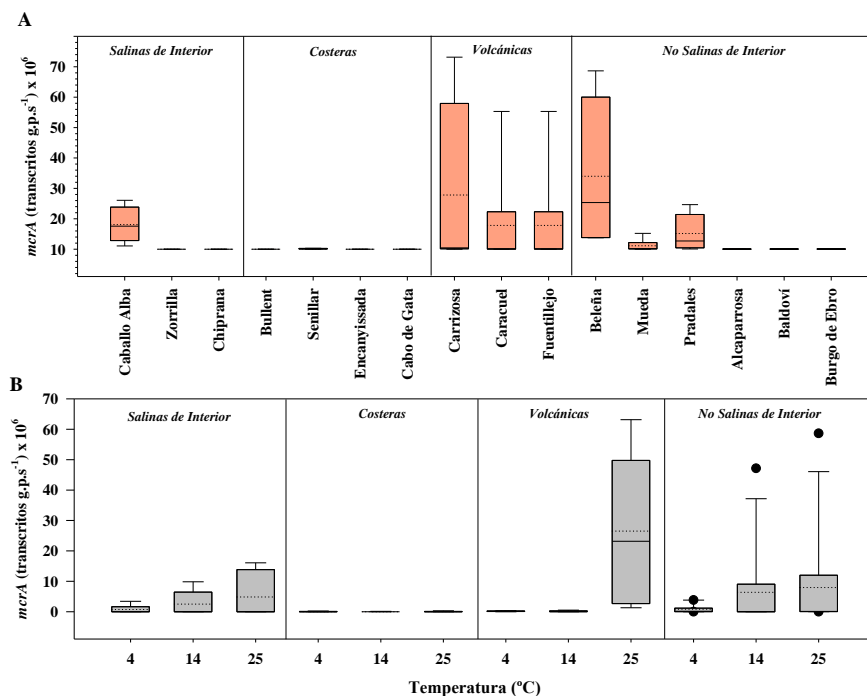


Figura 6.2. Resultados de la cuantificación por qPCR de los transcritos del gen *mcrA*. A) Diagramas de caja que muestran la cantidad de transcritos del gen *mcrA* en cada laguna. Las lagunas se han agrupado en 4 categorías de humedales: salinas de interior, costeras, volcánicas y no salinas de interior. En las lagunas salinas de interior y costeras, se han ordenado las lagunas siguiendo un gradiente de salinidad ascendente. B) Diagramas de caja que muestran la cantidad de transcritos del gen *mcrA* en cada categoría de humedal y temperatura.

En las lagunas no salinas de interior, las mayores cantidades se observaron en la Laguna de Beleña, la Laguna de Pradales y en la Balsa de la Mueda, pero en el Ullal de Baldoví, la Laguna de Alcaparrosa y el Galacho de El Burgo de Ebro se detectaron cantidades muy bajas. En las lagunas volcánicas las cantidades de transcritos fueron elevadas, y los valores más bajos se observaron en la Laguna de Fuentillejo. En las lagunas costeras sólo se detectaron transcritos del gen *mcrA* en El Senillar de Moraira, que es una

surgencia o *ullal* de aguas salobres, mientras que el resto de las lagunas costeras tuvieron una salinidad elevada.

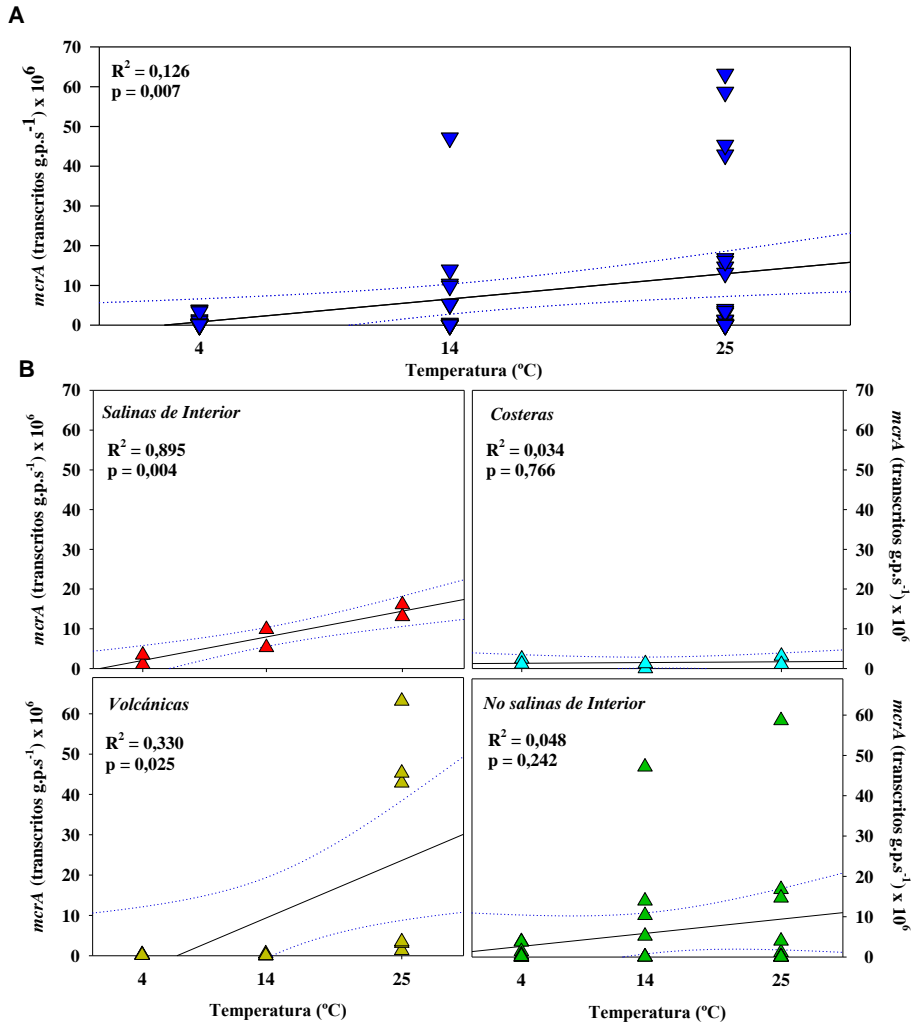


Figura 6.3. A) Correlación global del incremento de la temperatura frente a la abundancia de transcritos del gen *mcrA* estimados por qPCR. B) Correlación entre el incremento de la temperatura y la abundancia de transcritos del gen *mcrA* estimados por qPCR en cada categoría de humedal.

En las lagunas salinas de interior sólo se detectaron transcritos en la Laguna de Caballo Alba, que fue la menos salina de todas las que formaron parte de esta categoría. Al tener en cuenta las cantidades de transcrito por categoría de humedal y temperatura (Figura 6.2-B), se observó que excepto en el Senillar de Moraira (única costera con transcritos de *mcrA* detectados), en todas las categorías la cantidad de transcrito se incrementó con la temperatura pero con un patrón específico para cada categoría de humedal. En las lagunas no salinas de interior, el incremento de transcritos se dio entre 4°C y 14-25°C, pero no hubo diferencia entre 14-25°C. En la Laguna del Caballo Alba (única salina de interior con transcritos de *mcrA* detectados), el incremento fue lineal, y en las lagunas volcánicas el incremento fue exponencial, registrándose un incremento brusco de los transcritos en 25°C. Por otra parte, al tener en cuenta todas las lagunas (Figura 6.3-A), se observó una correlación positiva significativa entre la temperatura y la cantidad de transcritos (R^2 : 0,126, $p < 0,01$). No obstante, al desglosar esta relación entre las diferentes categorías de humedal (Figura 6.3-B), la Laguna del Caballo Alba (única salina de interior con transcritos de *mcrA* detectados) (R^2 : 0,895, $p < 0,01$) y las volcánicas (R^2 : 0,33, $p < 0,05$) fueron las únicas que presentaron una correlación positiva significativa. Las lagunas no salinas de interior, al incluir al Ullal de Baldoví, la Laguna de Alcaparrosa y el Galacho de El Burgo de Ebro, mostraron una correlación no significativa, mientras que el Senillar de Moraira, la única laguna costera donde se pudieron detectar transcritos del gen *mcrA*, mostró también una correlación no significativa debido a las bajas cantidades de transcritos detectadas.

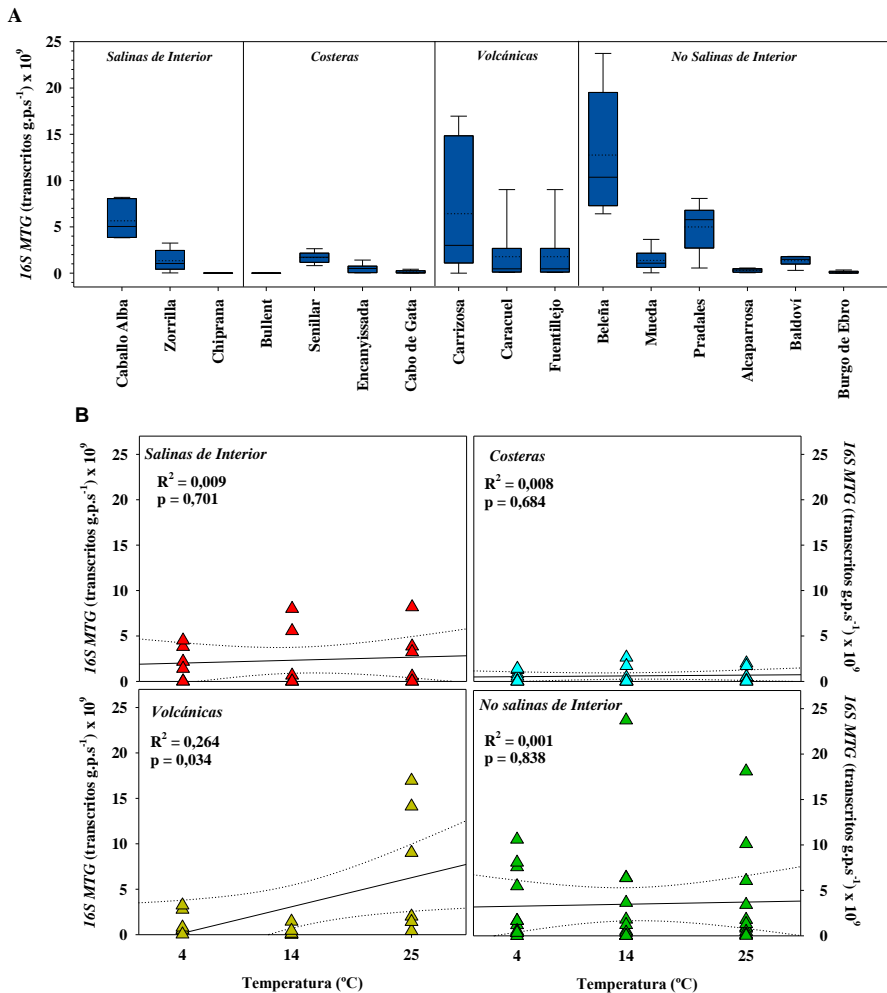


Figura 6.4. Resultados de la cuantificación por qPCR de los transcritos del gen 16S de metanógenos. A) Diagramas de caja que muestran la cantidad de transcritos del gen 16S en cada laguna. Las lagunas se han agrupado en 4 categorías de humedales: salinas de interior, costeras, volcánicas y no salinas de interior. En las lagunas salinas de interior y costeras, se han ordenado las lagunas siguiendo un gradiente de salinidad ascendente. B) Correlación entre el incremento de la temperatura y la cantidad de transcritos del gen 16S.

Al contrario que con los transcritos del gen *mcrA*, se pudieron detectar transcritos del gen 16S de metanógenos mediante qPCR en todas las lagunas estudiadas, pero con una gran variabilidad dentro de cada categoría de humedal (Figura 6.4). La mayor cantidad de transcritos se detectó en las

lagunas no salinas de interior, en concreto en la Laguna de Beleña. No obstante, en esta categoría también se detectaron cantidades bajas de transcritos del gen 16S de metanógenos, sobre todo en la Laguna de Alcaparrosa y en el Galacho de El Burgo de Ebro. En las lagunas volcánicas, la mayor cantidad de transcritos se determinó en la Laguna de Carrizosa, mientras que las lagunas de Caracuel y Fuentillejo mostraron valores similares. En las lagunas costeras, la cantidad de transcritos del gen 16S de metanógenos decreció a medida que aumentaba la conductividad del sedimento, mostrándose los valores más bajos en las Salinas del Cabo de Gata y en la desembocadura del río Bullent que, aunque no presentó conductividades altas, sí mostró una cantidad muy baja de materia orgánica en el sedimento. En las lagunas salinas también se observó una relación negativa de la conductividad con la cantidad de transcritos del gen 16S de metanógenos, ya que los valores más altos se observaron en la Laguna del Caballo Alba, que es la menos salina de su categoría de humedal, y los más bajos en la Salada de Chiprana, que es una laguna hipersalina. Por otra parte, no se observó una correlación significativa entre el incremento de la temperatura y las cantidades de transcritos del gen 16S de metanógenos a nivel global, y al desglosarlo por categoría de humedal (Figura 6.4-B) sólo se observó una correlación positiva significativa en las lagunas volcánicas (R^2 : 0,264, $p < 0,05$).

6.3. Emisiones de metano y expresión de los genes *mcrA* y 16S MTG:

La relación entre las emisiones de metano y el número de transcritos detectados por qPCR del gen *mcrA* y del gen 16S de metanógenos mostró unos patrones distintos al comparar a nivel global todas las lagunas y al separarlas por categorías de salinidad (Figura 6.5 y 6.6).

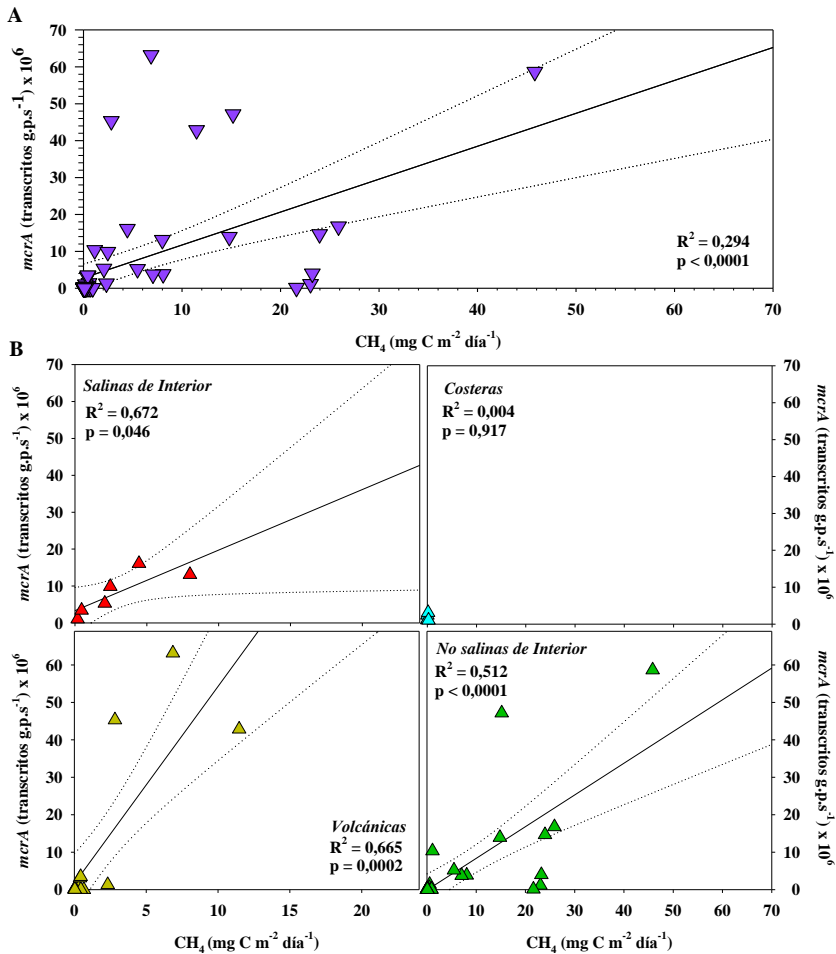


Figura 6.5. Relación de los transcritos de los genes *mcrA* cuantificados por qPCR con las emisiones de metano. A) correlación entre las emisiones de metano y la cantidad de transcritos del gen *mcrA*. B) correlación entre las emisiones de metano y la cantidad de transcritos del gen *mcrA* en cada categoría de humedal.

Las emisiones de metano mostraron una correlación positiva significativa con la cantidad de transcritos cuantificada por qPCR de los genes *mcrA* (R^2 : 0,294, $p < 0,01$) y 16S de metanógenos (R^2 : 0,318, $p < 0,01$). Al separar dicha correlación por categoría de humedal, para el gen *mcrA* (Figura 6.5-B) se observó que todas las categorías mostraron una correlación positiva elevada y

significativa, excepto en las lagunas costeras y las salinas de interior. No obstante, para el gen 16S de metanógenos (Figura 6.6-B) sólo se observó una correlación significativa en las lagunas no salinas de interior (R^2 : 0,436, $p < 0,01$) y en las volcánicas (R^2 : 0,863, $p < 0,01$).

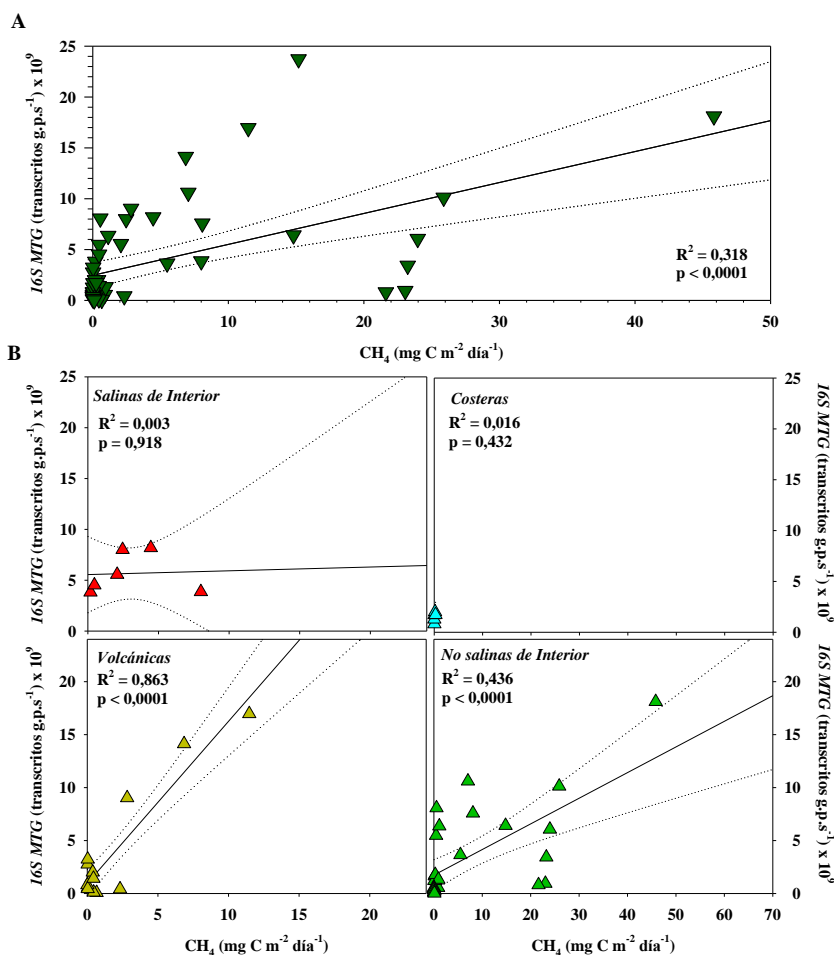


Figura 6.6. Relación de los transcritos de los genes 16S de metanógenos cuantificados por qPCR con las emisiones de metano. En el análisis estadístico sólo se incluyeron las muestras donde se detectaron a la vez transcritos del gen *mcrA* y del gen 16S. A) correlación entre las emisiones de metano y la cantidad de transcritos del gen 16S. B) correlación entre las emisiones de metano y la cantidad de transcritos del gen 16S en cada categoría de humedal.

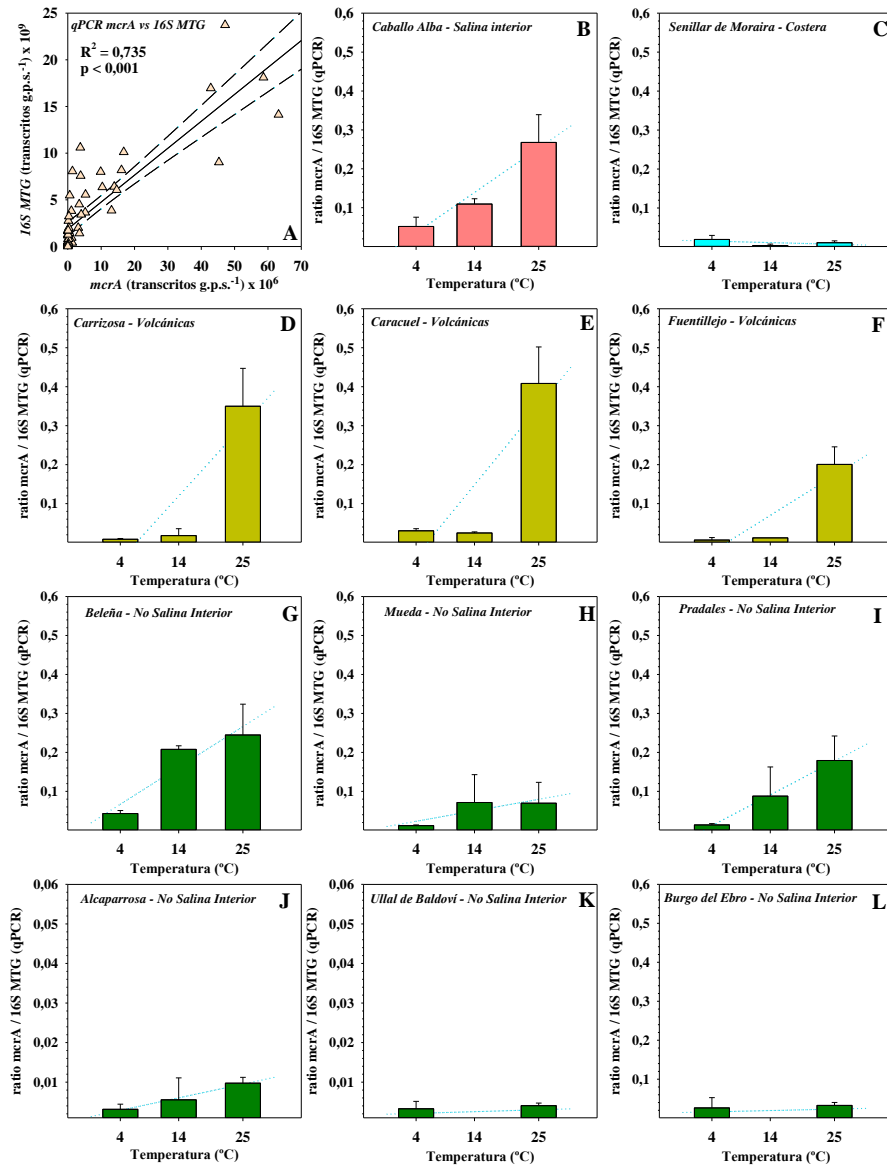


Figura 6.7. Efecto del incremento de temperatura en la relación entre las cantidades determinadas por qPCR de los transcritos de los genes *mcrA* y 16S de metanógenos. Sólo se incluyeron las muestras donde se detectaron a la vez transcritos del gen *mcrA* y del gen 16S de metanógenos. A) correlación entre las cantidades de los transcritos de los genes *mcrA* y 16S. B-L) Figuras de barras con los ratios entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y del 16S por laguna y temperatura.

Por otra parte, las cantidades de transcritos de los genes *mcrA* y 16S de metanógenos estuvieron relacionadas, pero el patrón de relación entre ambas cantidades se vio influenciado por el incremento de temperatura (Figura 6.7).

Las cantidades de transcritos detectadas por qPCR de los genes *mcrA* y 16S de metanógenos presentaron una correlación significativa (R^2 : 0,735, $p < 0,01$). No obstante, la mayoría de las muestras de 25°C mostraron una cantidad mayor de transcritos del gen *mcrA* de la que deberían tener para la cantidad de transcritos del gen 16S de metanógenos que tenían, ya que los puntos que representan a dichas muestras se situaron por debajo de la recta del ajuste. Al observar la ratio entre las cantidades de transcritos de ambos genes, se pudo determinar que a medida que aumentaba la temperatura también aumentaba la cantidad de transcritos del gen *mcrA* por transcrito del gen 16S de metanógenos. No obstante, dicha ratio mostró los valores más elevados en las lagunas volcánicas, donde a 25°C la cantidad de transcritos del gen *mcrA* era casi la mitad que la de transcritos del gen 16S de metanógenos, y también en las lagunas no salinas de interior que a su vez presentaron mayores emisiones de metano (lagunas de Beleña, Pradales y la Balsa de la Mueda). Esta ratio también fue elevada en la laguna de Caballo Alba (que tiene una salinidad baja), la única laguna salina de interior donde se pudieron detectar transcritos de *mcrA* y que también fue la que mayores emisiones de metano presentó en su categoría de humedal. El Ullal de Baldoví, la Laguna de Alcaparrosa y el Galacho de El Burgo de Ebro, las lagunas no salinas de interior donde se midieron las emisiones de metano más bajas, fueron las que presentaron también una ratio de transcritos *mcrA*/16S de metanógenos más baja que apenas cambió con la temperatura, junto al Senillar de Moraira, que también presentó bajas emisiones de metano. Por otra parte, el patrón de incremento de dicha ratio con la temperatura fue diferente según la categoría de humedal. Así, en las lagunas no salinas de interior con mayores emisiones de metano y

en la laguna de Caballo Alba, el aumento de la ratio con la temperatura fue progresivo, mientras que en las lagunas volcánicas la ratio no cambió entre 4-14°C pero se incrementó bruscamente a los 25°C.

6.4. Expresión del gen *mcrA* y potencial metabólico

La relación entre las cantidades de los transcritos del gen *mcrA* detectadas por qPCR y *gene counts* de este gen inferidos mediante PICRUST2, y la relación entre las emisiones de metano y *gene counts* del gen *mcrA*, fue diferente si la inferencia se realizó a partir de las secuencias del 16S provenientes del ADN o del cDNA, y varió según la temperatura y la categoría de humedal (Figura 6.8).

No se observó una relación significativa entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* detectados por qPCR y *gene counts* inferidos por el PICRUST2 a partir del ADN, pero la cantidad de transcritos del gen *mcrA* detectados por qPCR sí presentó una correlación positiva significativa con *gene counts* inferidos a partir del cDNA (R^2 : 0,439, $p < 0,01$). Además, esta última correlación se mostró significativa en las lagunas no salinas de interior (R^2 : 0,552, $p < 0,01$), en las volcánicas (R^2 : 0,737, $p < 0,01$) y en la laguna de Caballo Alba, la menos salina de las lagunas salinas de interior (R^2 : 0,446, $p < 0,01$), mientras que en El Senillar de Moraira (la única costera con transcritos de *mcrA* detectados por qPCR) no se observó ninguna correlación. Por otra parte, la correlación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* detectados por qPCR y *gene counts* inferidos a partir del cDNA se mostró positiva y significativa en todas las temperaturas (valor mínimo de R^2 : 0,423, $p < 0,01$). Además, tanto los *gene counts* del gen *mcrA* inferidos a partir del ADN (R^2 : 0,21, $p < 0,05$) como los inferidos a partir del cDNA (R^2 : 0,574, $p < 0,01$) mostraron una correlación positiva significativa con las emisiones de metano, pero la correlación basada en los *gene counts* a partir del cDNA mostró un R^2

mayor. Por lo tanto, la inferencia de los gene counts mediante PICRUST2 tanto a partir del ADN como del cDNA arrojó resultados fiables.

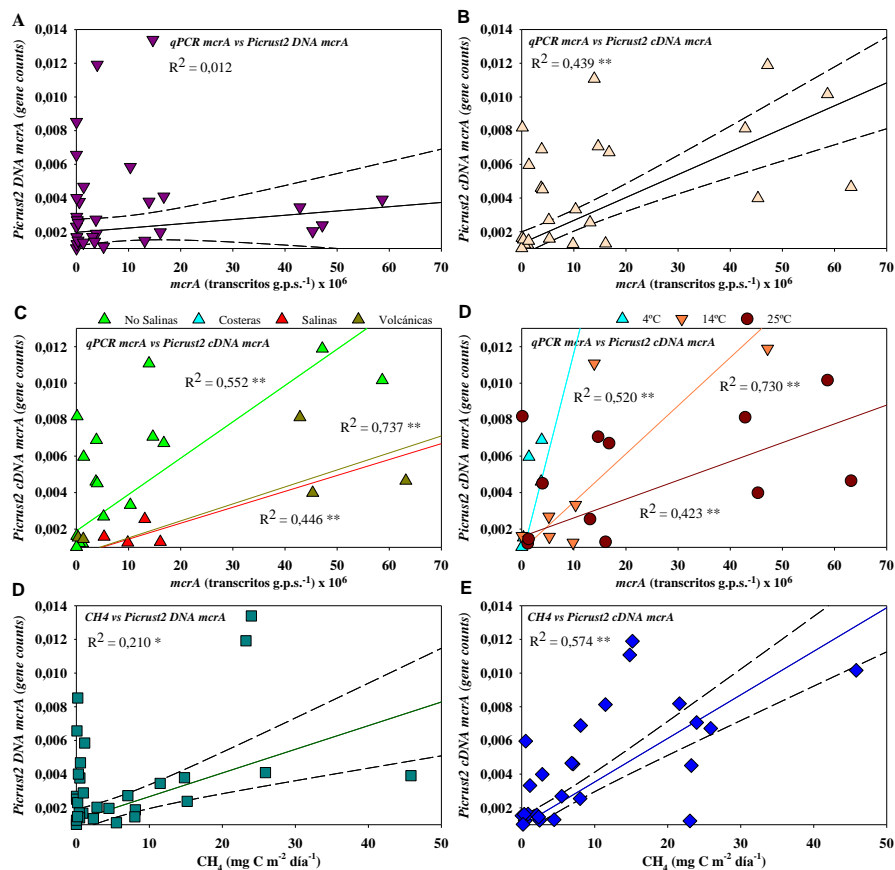


Figura 6.8. Relación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* cuantificados por qPCR y *gene counts* de dicho gen inferidos mediante PICRUST2. En el análisis estadístico sólo se incluyeron las muestras donde se detectaron mediante qPCR transcritos del gen *mcrA*. A) correlación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y *gene counts* inferidos a partir del ADN. B) correlación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y *gene counts* inferidos a partir del cDNA. C) correlación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y *gene counts* inferidos a partir del cDNA por categoría de humedal. D) correlación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y los *gene counts* inferidos a partir del cDNA por temperatura. E) correlación entre las emisiones de metano y *gene counts* del gen *mcrA* inferidos a partir del ADN. F) correlación entre las emisiones de metano y *gene counts* del gen *mcrA* inferidos a partir del cDNA. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$.

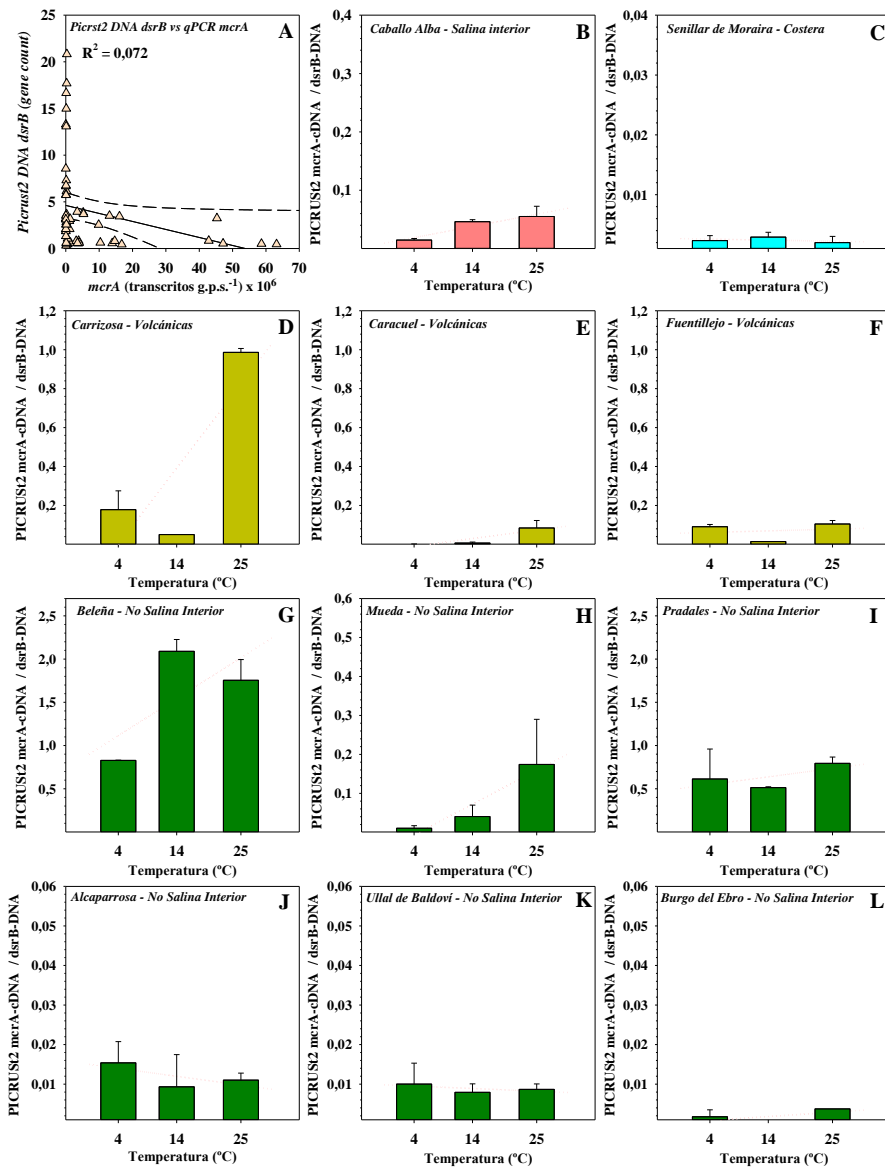


Figura 6.9. A) Correlación entre los transcritos de *mcrA* detectados por qPCR y gene counts del gen *dsrB* inferidos a partir del ADN. B-L: Ratio entre los promedios por laguna de *gene counts* obtenidos con PICRUS2 a partir del cDNA para el gen *mcrA* y a partir del ADN para el gen *dsrB*. Sólo se realizaron estas ratios en las lagunas donde se detectaron por qPCR transcritos del gen *mcrA*. Se muestran los valores de dicha ratio en cada laguna y temperatura.

Por otra parte, no se observó una correlación entre los transcritos del gen *mcrA* detectados por qPCR y gene counts del gen *dsrB* (marcador de sulfatoreducción desasimilatoria, llevada a cabo por las bacterias sulfatoreductoras) obtenidos a partir del ADN mediante PICRUSt2 (Figura 6.9-correlación). No obstante, en lo que respecta a la relación entre *gene counts* del gen *mcrA* (inferidos a partir del PICRUSt2 realizado con el cDNA), con *gene counts* del gen *dsrB* (inferidos a partir del PICRUSt2 realizado con el ADN), se observó que en general esta ratio aumentó con la temperatura (Figura 6.9). Al estar los datos del PICRUSt2 del gen *dsrB* normalizados por copias del gen *recA*, (asumiendo que sólo hay una copia del gen *recA* en el genoma de los procariontes), observamos que el número de gene counts del gen *mcrA* (cDNA) por gene count de gen *dsrB* (ADN), o lo que es lo mismo, el número de gene counts del gen *mcrA* por individuo de bacteria sulfatoreductora, aumentó con la temperatura. Así, un aumento de la temperatura favoreció a las arqueas metanógenas frente a las bacterias sulfatoreductoras. Las lagunas no salinas de interior mostraron una gran variabilidad en los valores de esta ratio, registrándose los más elevados en la Laguna de Beleña, en la Laguna de Pradales y en la Balsa de la Mueda. En la laguna de Alcaparrosa y en el Ullal de Baldoví la ratio no se incrementó con la temperatura, mientras que en el Burgo de Ebro únicamente lo hizo a 25°C. Estas tres lagunas fueron las lagunas no salinas de interior que mostraron una menor emisión de metano. En las lagunas volcánicas y en la laguna de Caballo Alba (única salina de interior con transcritos de *mcrA* detectados por qPCR) esta ratio también se incrementó, mientras que en El Senillar de Moraira (única costera con transcritos de *mcrA* detectados por qPCR), que mostró unas emisiones de metano muy bajas, no se encontró ninguna relación con la temperatura. Por otra parte, el patrón de incremento de dicha ratio fue

diferente según cada laguna, mostrándose progresivo en la mayoría excepto en la laguna de Carrizosa, donde el incremento fue exponencial.

Discusión General

Capítulo 7. Discusión General

En esta tesis se han estudiado los factores que determinan la estructura y la función, en concreto los metabolismos relacionados con el carbono, de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento de un total de 43 humedales mediterráneos. Dichos humedales fueron clasificados en diferentes categorías y presentaron distintos estados de conservación, siendo ambos factores muy relevantes tanto en la estructuración de la comunidad como en las tasas metabólicas y en el potencial metabólico de los diferentes metabolismos relacionados con el carbono. Así, en esta tesis se ha descrito la estructura y los metabolismos del carbono asociados de las comunidades de procariotas de lagunas salinas de interior, lagunas deltaicas y lagunas no salinas de interior, además de estudiar el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en las emisiones de metano y en la expresión génica de las arqueas metanógenas del sedimento de lagunas representativas de las grandes categorías de lagunas mediterráneas.

7.1. Estructura de las comunidades de procariotas de las lagunas salinas de interior y su relación con los metabolismos del carbono

En el capítulo 3 se han estudiado los factores que determinan la estructura y los metabolismos potenciales relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas que habitan el agua y el sedimento de 15 lagunas salinas de interior mediterráneas. Estas lagunas se clasificaron en diferentes categorías de salinidad y estados de conservación que mostraron comunidades de procariotas y taxones característicos específicos.

En una visión general de las comunidades de procariotas de las lagunas salinas de interior, destacan por su gran abundancia relativa y amplia distribución las familias *Rhodobacteraceae* y el filo Cyanobacteria en el agua y la familia *Streptococcaceae* en el sedimento. En el agua de estas lagunas, la familia

Rhodobacteraceae es cosmopolita y se encuentra a lo largo de todo el gradiente de salinidad. Esta familia tiene una distribución muy amplia y se encuentra principalmente en ambientes marinos (Simon *et al.* 2017) pero también se ha descrito en lagos salinos (Zhong *et al.* 2015). Además, sus miembros poseen una gran versatilidad metabólica (Pujalte *et al.* 2014; Simon *et al.* 2017), cosa que podría explicar su capacidad de adaptación a las diferentes condiciones presentes en las lagunas salinas de interior. Por otra parte, el filo Cyanobacteria es abundante en el agua de las lagunas estudiadas, sobre todo durante los meses cálidos en las lagunas que están alteradas trófica e hidrológicamente. Este tipo de alteración conlleva una reducción de la salinidad, un incremento en la concentración de fósforo y una elongación artificial del hidropериодо (Corrales-González *et al.* 2019), con agua rica en nutrientes en los meses más cálidos del año, cuando las lagunas deberían estar secas de forma natural, lo que lleva a un gran crecimiento de las poblaciones de cianobacterias acuáticas. Además, la gran carga de materia orgánica que presentan las lagunas con esta alteración, especialmente la Laguna de Manjavacas, que recibe agua de una depuradora (Corrales-González *et al.* 2019), explicaría el papel como taxones marcadores de estas lagunas de los géneros *Saprospira* (filo Bacteroidota, familia *Saprospiraceae*) y *Turneriella* (filo Spirochaetota, familia *Leptospiraceae*), puesto que estos microorganismos pueden metabolizar compuestos complejos de carbono (McIlroy y Nielsen, 2014), como ácidos grasos de cadena larga (Zuerner 2015), que posiblemente son muy abundantes en estas lagunas al recibir una elevada carga de materia orgánica de forma artificial. Por otra parte, en el sedimento la familia *Streptococcaceae* muestra una gran abundancia relativa en muchas de las lagunas hiposalinas e hipersalinas temporales. Dichas lagunas se encuentran en la Reserva de la Biosfera de la Mancha Húmeda, uno de los mayores conjuntos de humedales de la Península Ibérica (Corrales-

González *et al.* 2019), y mantienen grandes poblaciones de aves migratorias (Gonçalves *et al.* 2018). Los *Streptococcaceae* podrían provenir de las heces de las aves y acumularse en el sedimento de estas lagunas, tamponando por tanto el efecto de la salinidad en la estructura de las comunidades de sus sedimentos, como se ha podido comprobar en este trabajo. La importancia del efecto de las aves acuáticas en el sedimento de las lagunas salinas endorreicas está muy subestimada, ya que sólo unos pocos estudios han demostrado que las agregaciones de aves acuáticas afectan profundamente a la dinámica de los microorganismos y los nutrientes dichas lagunas (Batanero *et al.* 2017), y debería ser considerada en trabajos futuros en este tipo de ecosistemas.

En lo que respecta a los taxones característicos (*indicator taxa*), su capacidad para discriminar estadísticamente una determinada categoría de salinidad o estado de conservación no depende directamente de su peso en la comunidad de procariotas, ya que algunos taxones característicos tienen una abundancia relativa elevada mientras que la gran mayoría de estos son organismos minoritarios en la comunidad. Este patrón se observa perfectamente en las cianobacterias y las arqueas. Las cianobacterias que actúan como taxones característicos presentan una abundancia relativa muy dispar, siendo mayoritarias en la laguna hipersalina permanente (Salada de Chiprana), donde sólo el género *Synechococcus* representa casi el 14% de las lecturas totales, mientras que en las lagunas con alteración trófica e hidrológica las cianobacterias no son tan abundantes en la comunidad. En lo que respecta a las arqueas, éstas generalmente sí tienen un peso poblacional bajo, pero a su vez son taxones clave para diferenciar entre categorías de salinidad y estados de conservación, especialmente en las comunidades acuáticas de las lagunas estudiadas en este capítulo. De hecho, en este trabajo se muestra que las arqueas, en concreto la clase *Halobacteria*, están más representadas en las comunidades acuáticas de las lagunas salinas bien conservadas, indicando que

podrían ser un biomarcador de buen estado de conservación en ecosistemas salinos de interior. De hecho, esta clase de arqueas está formada por los organismos con los mayores requerimientos de sal y a su vez la mayor capacidad de resistencia a la elevada salinidad del dominio Archaea (Cui y Dyall-Smith 2021). Debido a que las alteraciones que sufren las lagunas salinas de interior estudiadas implican una reducción de su salinidad natural debido a un aporte artificial de agua (Corrales-González *et al.* 2019), podemos asumir que esto afectará negativamente a esta clase de microorganismos que necesitan elevadas cantidades de sal para vivir, y que la reducción en la abundancia de estos organismos en cualquier laguna salina puede indicar una alteración hidrológica de ésta y por lo tanto un estado de conservación mejorable. Por otra parte, las lagunas mesosalinas y las restauradas no presentaron taxones característicos, lo que puede indicar que, a pesar de estar clasificadas dentro de una misma categoría de salinidad o estado de conservación, las comunidades de procariotas de las distintas lagunas de cada uno de estos dos grupos son muy diferentes entre sí y el análisis de taxones característicos no encuentra ningún taxón que sea significativamente más abundante en todas las lagunas mesosalinas o todas las restauradas. En el caso de las lagunas mesosalinas, esto puede ser debido a las grandes diferencias de salinidad que presentan las lagunas que forman este grupo, habiendo algunas que tienen una salinidad más cercana a la de las lagunas hiposalinas, y otras una salinidad más cercana a la de las lagunas hipersalinas. Esto puede provocar que las lagunas mesosalinas con conductividades menores tengan una comunidad de procariotas diferente de las lagunas mesosalinas con mayores conductividades, por lo que no es posible detectar taxones que sean característicos de todas las lagunas mesosalinas. En el caso de las dos lagunas restauradas, su perfil taxonómico es tan diferente que tampoco es posible detectar taxones comunes a ellas dos.

En cuanto a los metabolismos relacionados con el carbono en las lagunas estudiadas, al comparar las tasas metabólicas medidas en trabajos anteriores (Camacho *et al.* 2017; Morant 2022) con las abundancias inferidas de sus correspondientes genes marcadores, observamos una diferencia muy clara entre la producción primaria bruta (GPP) y la respiración aerobia, que presentan una correlación significativa entre sus respectivas tasas metabólicas y los genes marcadores, mientras que los metabolismos relacionados con el metano, en concreto la metanogénesis y la metanotrofia aerobia, no muestran una correlación clara. Respecto a la metanogénesis, dicha falta de correlación puede ser debida a la falta de representación de genomas del género *Methanomassiliicoccus* en la base de genomas que utiliza el PICRUST2 para inferir las abundancias de genes (base de datos basada en la base IMG/M, que recoge genomas microbianos), puesto que en dicha base sólo hay dos genomas de este género. Éste es el único género conocido de la familia *Methanomassiliicoccaceae*, la cual es a su vez la familia de metanógenos mayoritaria en el sedimento de las lagunas salinas estudiadas, y la falta de más genomas correspondientes a especies por descubrir de esta familia tan abundante en las lagunas salinas puede estar relacionada con el generalmente bajo número de copias inferidas de este gen (*mcrA*) y por tanto con la falta de correlación obtenida entre éste y las emisiones de metano. Además, esto también explicaría el bajo número de copias de los genes *mtmB* y *mtbB*, genes marcadores de la metanogénesis metilotrófica, que es la que es capaz de realizar la única especie descrita y cultivada en cultivo puro de la familia *Methanomassiliicoccaceae*, *Methanomassiliicoccus luminyensis* (Dridi *et al.* 2012; Kröninger *et al.* 2017). Esta ruta metanogénica se ha descrito como mayoritaria en ambientes salinos (Zhou *et al.* 2022), puesto que sus sustratos son las metilaminas, compuestos abundantes en los ambientes salinos que permiten la actividad de los metanógenos metilotróficos ya que estos no entran

en competencia con las bacterias sulfatoreductoras, las cuales no utilizan metilaminas (Sorokin y McGenety 2019). Por otra parte, el alto número de copias inferidas de los genes marcadores de la metanogénesis acetoclástica (*ackA*) y de la metanogénesis por reducción del CO₂ (*mch*) en el agua, un ambiente aerobio donde no se puede llevar a cabo la metanogénesis, indica que el uso del gen *mcrA*, ampliamente avalado por la bibliografía, es más adecuado para estudiar la metanogénesis, ya que seguramente los genes *ackA* y *mch* tienen tanta abundancia inferida en el agua porque no son tan específicos como el gen *mcrA* y participan en otros metabolismos que no son la metanogénesis. En cuanto a la metanotrofia aerobia potencial, aunque al tener en cuenta todas las lagunas no mantiene una correlación con las emisiones de metano, en las lagunas alteradas de menor salinidad se observa una mayor relación de las abundancias génicas *pmoA/mcrA*, indicando que en estas lagunas puede haber una mayor actividad de las bacterias metanótrofas debido a un incremento de la metanogénesis por dicha alteración. De hecho, en trabajos previos en estas mismas lagunas se ha demostrado que la alteración antrópica de las lagunas está relacionada con mayores emisiones de metano mientras que la salinidad elevada las reduce (Camacho *et al.* 2017; Morant 2022). La relación de la metanogénesis con la salinidad es compleja, y podría darse el caso de que en las lagunas salinas estudiadas la producción de metilaminas, el sustrato principal de la metanogénesis metilotrófica, sea escasa. Esto conlleva que la producción de metano en estas lagunas podría depender mayoritariamente de la metanogénesis a partir de acetato o CO₂, rutas que se ven activadas en las lagunas menos saladas y en las lagunas que están alteradas debido a una reducción de la salinidad por la entrada de agua poco mineralizada, lo que implica una menor competencia de los metanógenos que utilizan estas dos rutas con las bacterias sulfatoreductoras, puesto que al reducir la salinidad también se disminuye el sulfato que dichas bacterias

necesitan. Además, en las lagunas con alteración trófica e hidrológica, esta reducción de la salinidad por las entradas de agua se puede ver acompañada de un incremento de nutrientes y de sustratos susceptibles de ser utilizados por los metanógenos acetoclásticos o reductores del CO₂, que por tanto aumentan su actividad.

Aparte de sus efectos en la estructura de las comunidades de procariontas y en los metabolismos relacionados con el carbono, la salinidad también es un factor determinante para la organización de las comunidades de procariontas, como se observa en las redes de coocurrencia (Wang *et al.* 2021; Yang *et al.* 2021). En las comunidades de las lagunas salinas estudiadas, tanto las diferentes categorías de salinidad como los diferentes estados de conservación aparecen ZOTUs cosmopolitas, que muestran una gran abundancia, pero a su vez muy poco *degree* (número de conexiones) con el resto de los miembros de las redes. Esto se puede interpretar como que las diferentes categorías de salinidad y los diferentes estados de conservación presentan características ambientales tan diferentes que llevan a la coocurrencia de procariontas muy específicos de cada categoría de salinidad y de cada estado de conservación. Por otra parte, y al contrario que en otros trabajos (Yang *et al.* 2021), en las redes de sedimento los mayores *degrees* se observan en las lagunas menos salinas, y tanto en agua como en sedimento las lagunas conservadas o restauradas presentan un *degree* mayor. Por una parte, esta reducción del número de conexiones entre los miembros de las comunidades a medida que aumenta la salinidad puede reflejar unas comunidades más simples en las lagunas más salinas. Por otra parte, la contaminación de origen humano ejerce un importante efecto en la topología de las redes de coocurrencia (Hu *et al.* 2017) y tiende a simplificarlas (Karimi *et al.* 2017), y puesto que el mayor número de conexiones entre los miembros de las comunidades de las lagunas salinas se ha observado también en las lagunas mejor conservadas, podemos

asumir que las presiones antrópicas han llevado a una simplificación de las interacciones entre los microorganismos de las comunidades de las lagunas salinas de interior alteradas. Recientemente, se está desarrollando la idea de utilizar las redes microbianas como marcadores de la calidad y funcionamiento del ecosistema (Karimi *et al.* 2017), pero previamente se ha de obtener un conocimiento profundo de éstas en los ambientes mejor conservados antes de desarrollar índices o marcadores de estado ecológico basados en ellas, puesto que por ejemplo se podría llegar a pensar que un menor número de conexiones entre los miembros de las comunidades de las lagunas más salinas es una consecuencia de la presión humana cuando en realidad es una característica natural. Aparte de esto, los diferentes grupos taxonómicos en que se agrupan los miembros de las comunidades de procariotas pueden tener un patrón de interacción diferente. En el caso de las lagunas salinas, las cianobacterias y las arqueas siguen un patrón dispar. Así, las cianobacterias tienen una abundancia en la red muy elevada, pero a su vez tienen muy poco *degree*, lo que resulta en poblaciones de cianobacterias muy abundantes, pero poco conectadas con el resto de la comunidad, como se ha observado en otros trabajos en lagos eutróficos (Zhao *et al.* 2016).

La cianobacterias, al ser organismos fotosintéticos, son autosuficientes y no necesitan de ninguna relación de simbiosis con otros microorganismos, y por esto coocurren muy poco con el resto de los miembros de la comunidad. En cuanto a las arqueas, éstas presentan una baja abundancia en la red de coocurrencia, pero a su vez tienen un elevado *degree*. Este hecho remarca la consideración de las arqueas como miembros clave de las comunidades microbianas (Moissl-Eichinger *et al.* 2018), y lleva a que las arqueas de las lagunas salinas de interior tal vez puedan considerarse taxones clave (*keystone taxa*), que son aquellos cuya eliminación supuestamente puede provocar efectos deletéreos muy grandes en la comunidad (Berry y Widder 2014;

Goberna y Verdú 2022). Debido al gran número de conexiones que presentan las arqueas dentro de las redes de coocurrencia, cualquier factor que las afecte podría desencadenar grandes cambios en las interacciones entre los miembros de las comunidades que se verían reflejados en las redes de coocurrencia.

Por otra parte, al considerar la interacción entre las variables ambientales, las tasas de los metabolismos relacionados con el carbono y las comunidades de procariotas se han observado diferentes patrones entre el agua y el sedimento. La estructuración de las comunidades del agua es el resultado de la interacción entre la salinidad, la alteración antrópica y la estacionalidad. La estacionalidad influye profundamente en las tasas metabólicas, ya que los muestreos en los periodos más cálidos de las lagunas alteradas exhiben mayores tasas de producción primaria bruta. Esto concuerda con lo observado en otros trabajos, donde la salinidad y la temperatura se muestran como factores muy importantes en la estructura de las comunidades de fitoplancton (Lawrenz *et al.* 2013; López-Flores *et al.* 2014; Nche-Fambo *et al.* 2015), y remarca el hecho de que cualquier alteración del hidroperiodo o una entrada artificial de nutrientes afecta profundamente la estructura y los metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas de las lagunas salinas de interior.

Además, la alta estacionalidad indica que las comunidades del agua tienen poca estabilidad temporal, probablemente porque los cambios estacionales en las variables ambientales del agua son más acusados que en el sedimento, provocando grandes diferencias estacionales en las comunidades de procariotas acuáticos. Contrariamente, las comunidades del sedimento son más estables a lo largo del tiempo y están más influenciadas por las categorías de salinidad que por el tipo de alteración o la estacionalidad. No obstante, la entrada de microorganismos exógenos a través de las aves acuáticas en las lagunas hipersalinas temporales altera profundamente el efecto de la salinidad

y debería ser considerado como un factor que podría ser de gran importancia en la estructuración de las comunidades de procariotas del sedimento en lagunas salinas de interior pequeñas y con poblaciones importantes de este tipo de aves.

En conclusión, los resultados del tercer capítulo de esta tesis muestran que las comunidades de procariotas de las diferentes categorías de salinidad en las que están divididas las lagunas salinas de interior siguen unos patrones generales en su estructuración y sus metabolismos potenciales del carbono. Cada categoría de salinidad y estado de conservación muestran taxones microbianos característicos. La producción primaria bruta (GPP) y la respiración potencial presentan una correlación significativa con las respectivas tasas metabólicas, mientras que la relación entre las emisiones de metano y los metabolismos potenciales relacionados con este gas es más compleja. Además, se ha demostrado que las alteraciones antrópicas y la estacionalidad tienen un impacto importante tanto en las comunidades de procariotas como en las tasas de GPP, de respiración aerobia y de emisiones de metano de las lagunas.

La complejidad de las interacciones entre estos factores remarca la importancia de combinar estudios moleculares con medidas *in situ* de los principales metabolismos relacionados con el carbono para obtener una buena visión de conjunto de los factores que controlan los flujos de carbono en estos tipos de ecosistemas y poder mejorar la gestión de las lagunas salinas de interior en el escenario actual de cambio climático, potenciando su capacidad de retención de carbono a la vez que manteniendo la biodiversidad de este tipo de zonas húmedas.

7.2. Patrones estructurales y metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas de lagunas del delta del Ebro

En el capítulo 4 se han estudiado los principales factores que afectan a la estructura y los metabolismos potenciales relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas que habitan en el agua y en el sedimento de tres humedales representativos de los principales tipos de zonas húmedas del delta del río Ebro, representantes a su vez de los principales tipos de humedales costeros mediterráneos. Los tres humedales se encontraban a lo largo de un gradiente de salinidad y presentaron diferentes estados tróficos, ambos factores que determinaron las comunidades específicas de cada humedal y la relación entre los diferentes grupos de procariotas involucrados en los principales metabolismos relacionados con el carbono.

Las comunidades de procariotas del agua y del sedimento presentaron patrones, tanto unos similares como otros divergentes. Como en otros ecosistemas enmarcados en un gradiente de salinidad (Henriques *et al.* 2006; Zhong *et al.* 2016), la salinidad fue un factor muy importante en la estructuración de las comunidades. Así, Alfacs y Encanyissada, los humedales más salinos, estaban más relacionados entre sí y compartían más ZOTUs en comparación con Filtre Biològic, el humedal de agua menos salina. Por el contrario, el efecto de la estacionalidad fue diferente en el agua y en el sedimento. El mayor número de ZOTUs presentes de manera repetitiva durante todas las estaciones en el sedimento indica que esta matriz puede tamponar más eficazmente que el agua los cambios estacionales en las variables ambientales que afectan a las comunidades. La mayor estabilidad del sedimento permite la presencia de una comunidad con pocos cambios estacionales, pero también favorece una buena diferenciación entre las comunidades de las diferentes zonas húmedas. Contrariamente, el agua está

más afectada por los cambios temporales, especialmente en Encanyissada. El flujo de agua en este humedal está regulado por una red de canales de riego, lo que provoca grandes variaciones en la salinidad del agua que acaban por producir un solapamiento entre las comunidades de procariotas de este humedal y las de Alfacs, que se encuentra muy influenciado por el agua del mar al estar conectado a él. A su vez, la diferencia en la estabilidad del agua y del sedimento se refleja en los patrones de estructuración de sus comunidades. En el agua, las grandes fluctuaciones en las variables ambientales crean condiciones transitorias que benefician a los taxones que pueden adaptarse rápidamente y acabar siendo muy abundantes durante un corto periodo de tiempo. Este es el caso de las cianobacterias en los humedales con un mayor estado trófico, especialmente en Filtre Biològic, que como su propio nombre indica actúa como filtro recibiendo el agua rica en nutrientes de los arrozales que lo rodean. Esta mayor concentración de nutrientes lleva a la dominancia de las cianobacterias en las comunidades acuáticas de Filtre Biològic y de Encanyissada durante los meses más cálidos. Contrariamente, en el sedimento las fluctuaciones temporales de las variables ambientales son menores, permitiendo el desarrollo de comunidades estables sin grandes abundancias de taxones específicos.

Por otra parte, y como se ha observado en el capítulo anterior de lagunas salinas de interior, en el agua la familia *Rhodobacteraceae* fue abundante a lo largo de todo el gradiente de salinidad. Esta familia manifiesta una gran versatilidad metabólica (Pujalte *et al.* 2014; Simon *et al.* 2017), lo que permite a sus miembros adaptarse y ser abundantes en ambientes con salinidades tan diferentes. A su vez, la salinidad se ha descrito como un factor muy relevante en la distribución de las cianobacterias (Liu *et al.* 2016), lo cual podría explicar la distribución diferencial de cianobacterias que se ha observado en los humedales del delta, siendo el género *Cyanobium* más representativo de

Filtre Biològic y el género *Synechococcus* de los humedales más salinos. En el sedimento, la familia de bacterias sulfatoreductoras (SRB) *Desulfosarcinaceae* (filo Desulfobacterota) fue más abundante en los humedales más salinos, en conjunción con lo observado en otros trabajos, donde las SRB fueron más activas y abundantes en ecosistemas de elevada salinidad (Foti *et al.* 2007). Contrariamente, la familia de bacterias *Anaerolineaceae* (filo Chloroflexi) fue más abundante en los humedales con conductividades medias o bajas. Los miembros de la familia *Anaerolineaceae* pueden establecer relaciones de sintrofia con las arqueas metanógenas (Liang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2018), y por tanto una mayor abundancia relativa de los miembros de esta familia en el sedimento de determinados humedales puede ser indicativo no tanto de la abundancia como de una mayor actividad metanogénica de las arqueas metanógenas en dichas zonas húmedas. Las emisiones de metano en los humedales estudiados en este capítulo son mayores en los que presentan conductividades medias o bajas (Encanyissada y Filtre Biològic) (Morant *et al.* 2020a), indicando que la mayor abundancia de la familia *Anaerolineaceae* en el sedimento de estos humedales podría estar ligada a una mayor producción de metano por parte de las arqueas metanógenas respecto al humedal más salino (Alfacs).

En lo que respecta a los grupos de procariotas implicados en la producción y consumo de metano, un trabajo anterior en los mismos lugares de estudio mostró que la abundancia total de metanógenos fue mayor en Alfacs, seguido de Encanyissada y de Filtre Biològic (Morant *et al.* 2020a). Además, las diferencias en las familias de metanógenos que hemos observado entre los humedales más salinos (Alfacs y Encayissada), que muestran una comunidad de metanógenos parecida, y el humedal de aguas menos mineralizadas (Filtre Biològic), con una comunidad más diferente, estarán asociadas a la salinidad, ya que dicho factor es uno de los más importantes en la estructuración de las

comunidades de arqueas metanógenas (Webster *et al.* 2015). Por otra parte, la familia *Methanomassiliicoccaceae*, que es la más abundante en los humedales estudiados, pertenece al orden *Methanomassiliicoccales*, que actualmente sólo tiene un representante aislado en cultivo puro, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, el cual sólo produce metano a partir de la reducción de metanol o de metilaminas con hidrógeno (Dridi *et al.* 2012; Kröninger *et al.* 2017). La dependencia del hidrógeno que muestra este metanógeno para generar metano contrasta con la gran abundancia de esta familia en Alfacs, el humedal más salado, donde las rutas metanogénicas que dependen del hidrógeno se verán restringidas por la actividad de las SRB, que es mayor en ambientes salinos (Sorokin y McGenety 2019). No obstante, debido a que sólo hay un representante en cultivo puro de esta familia, seguramente a medida que se cultiven más miembros de esta se descubra que tienen otras rutas metanogénicas menos dependientes del hidrógeno, como la metanogénesis metilotrófica sin participación del hidrógeno, que es la ruta metanogénica más relevante en ecosistemas salinos porque no entra en competencia con las SRB (Sorokin y McGenety 2019). En cuanto a las bacterias metanótrofas, la estructuración de sus comunidades presenta el mismo patrón que las arqueas metanógenas, donde el efecto de la salinidad, uno de los factores ambientales que más controlan la distribución de estos microorganismos (Ho *et al.* 2018; Chen *et al.* 2020), se observa en la mayor semejanza de las comunidades de bacterias metanótrofas entre los humedales más salinos (Alfacs y Encanyissada), siendo Filtre Biològic el que presenta la comunidad más diferente.

En cuanto a la relación entre las tasas de producción primaria bruta (GPP) y de respiración medidas y su relación con *gene counts* inferidos de los respectivos genes marcadores, al compararla con el capítulo anterior podemos observar que tanto en las lagunas salinas de interior como en las deltaicas

existe una buena correlación entre las tasas de GPP y *gene counts* del gen *psbA* (marcador de la fotosíntesis oxigénica). No obstante, al contrario que en las lagunas salinas de interior, en los humedales deltaicos no hay una buena correlación entre la respiración y *gene counts* del gen *coxA* (marcador de la respiración aerobia). Esto indica que las relaciones entre el metabolismo real y el potencial pueden variar entre los diferentes tipos de humedales mediterráneos. A su vez, en el agua, la correlación entre la ratio de fotosíntesis y respiración y la ratio de los genes *psbA* y *coxA* no es significativa, debido a que en los meses más cálidos los humedales con un mayor estado trófico ven incrementadas sus tasas de GPP de forma no lineal. Sin embargo, en el sedimento esta correlación sí es significativa. Esto demuestra el profundo efecto que tienen las alteraciones antrópicas en los metabolismos de las comunidades acuáticas (Camacho *et al.* 2017; Morant *et al.* 2020a), mientras que las comunidades del sedimento se ven menos afectadas por dichas alteraciones.

A propósito de las emisiones de metano en los humedales estudiados, éstas son un balance complejo entre la producción y el consumo de este gas. En los ambientes salinos, donde las concentraciones de sulfato son altas, las SRB compiten con las arqueas metanógenas cuyas rutas metanogénicas dependen del hidrógeno, ya que las SRB tienen mayor afinidad por los sustratos metabólicos que necesitan dichas arqueas y porque la sulfatorreducción desasimilatoria rinde más energía que la metanogénesis (Sorokin y McGenety 2019). Los resultados de nuestro trabajo muestran que en las zonas húmedas deltaicas la producción de metano está fuertemente regulada por la salinidad, ya que la competencia entre las SRB y las arqueas metanógenas favorece a un grupo u otro de microorganismos dependiendo de los niveles de salinidad. Así, en Alfacs y Encanyissada las SRB se ven favorecidas por las altas concentraciones de sulfato (que van ligadas a una alta salinidad), por lo que la

producción de metano sería muy baja, mientras que en Filtre Biològic ocurre todo lo contrario. Además, *gene counts* del gen *mcrA* en sedimento se mantuvieron constantes independientemente de la salinidad. Por lo tanto, el potencial de producir metano de los metanógenos sería similar en todos los humedales, independientemente de la estructura de la comunidad de arqueas metanógenas, pero sólo en Filtre Biològic los bajos niveles de salinidad (y por tanto los bajos niveles de sulfato) permitieron una mayor producción de metano. No obstante, esto no se tradujo en una mayor emisión de metano en este humedal, puesto que los resultados de este trabajo muestran el importante papel que tienen las bacterias metanótrofas del agua en el balance final de emisiones de metano. Así, la mayor producción de metano en Filtre Biològic permitiría una gran abundancia relativa y una mayor metanotrofia potencial de las bacterias metanótrofas en el agua de este humedal, por lo cual la mayor parte del metano producido por los metanógenos se consumiría por dichas bacterias, lo que da como resultado unas bajas emisiones de metano a pesar de ser un humedal de agua poco mineralizada. Sin embargo, en Encanyissada, a pesar de que la producción potencial de metano es menor debido a su mayor salinidad, la baja abundancia relativa y la poca metanotrofia potencial de las bacterias metanótrofas acuáticas presentes en este humedal provocaron que el metano producido apenas fuera consumido y que pudiera escapar a la atmósfera. En cambio, en Alfacs la sinergia entre una metanogénesis potencial baja y el consumo por parte de las bacterias metanótrofas acuáticas del poco metano que se ha podido generar producen el patrón de bajas emisiones de este gas que se ha observado en este humedal. Por lo tanto, esta gran interdependencia entre diferentes procesos metabólicos explica también la falta de correlación directa entre las emisiones de metano y *gene counts* del gen *mcrA* en el sedimento de las zonas húmedas estudiadas.

La visión de conjunto de la interacción entre las variables ambientales, los metabolismos potenciales y las comunidades muestra patrones diferentes entre el agua y el sedimento. Las comunidades del agua se ven afectadas por una combinación de factores como la salinidad, el estado trófico y la estacionalidad, mientras que las del sedimento se ven mayormente influenciadas por la salinidad. La menor capacidad de tamponar los cambios en las variables ambientales del agua genera redes de coocurrencia con muchos ZOTUs temporales y muy pocos presentes a lo largo de todas las estaciones. Esto puede explicar la mayor complejidad y compartimentalización de la red de coocurrencia en el agua, ya que valores altos de modularidad se relacionan con una mayor heterogeneidad del hábitat (Olesen *et al.* 2007), debido a que la baja estabilidad del ambiente acuático genera un ambiente heterogéneo que favorece la presencia de comunidades muy temporales de procariotas que responden a unas condiciones ambientales transitorias. En el sedimento, los cambios temporales en las variables ambientales son menos intensos, por lo que se generan comunidades más estables en el tiempo. Por otra parte, en la red de coocurrencia del agua de los humedales deltaicos la mayor abundancia de ZOTUs con gen *psbA* y por tanto con capacidad de hacer fotosíntesis se encuentra en los humedales con mayor estado trófico durante los meses cálidos, que registraron mayores tasas de GPP (Morant *et al.* 2020a), pero en el sedimento este gen se encuentra sólo en Alfacs, lo que sugiere una mayor capacidad de realizar la fotosíntesis en el bentos de los humedales deltaicos con un estado trófico bajo y que explicaría las mayores tasas de GPP descritas en el bentos de este humedal en comparación con los bentos de los humedales de mayor estado trófico (Morant *et al.* 2020a). Los ZOTUs con gen *dsrB*, y por tanto con capacidad de realizar sulfatoreducción desasimilatoria, se encontraron mayoritariamente en el sedimento de los humedales más salinos (Alfacs y Encanyissada), puesto que

sus mayores concentraciones de sulfato permiten una mayor actividad de las SRB compitiendo con la metanogénesis, mientras que los ZOTUs con gen *pmoA*, es decir, con capacidad de realizar la oxidación aerobia de metano, se encontraron sólo en el agua de Filtre Biològic, el humedal con mayor abundancia relativa de bacterias metanótrofas en el agua, y que a su vez presentó bajas emisiones de metano.

En conclusión, los resultados del capítulo 4 de esta tesis muestran la influencia de la salinidad y del estado trófico en la estructura y metabolismos potenciales relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento de tres humedales representativos de los principales tipos de zonas húmedas del delta del río Ebro. La salinidad determina la organización de las comunidades y la metanogénesis en el sedimento. El estado trófico también influencia la estructura de la comunidad y está ligado a mayores tasas de GPP. La complejidad de las interacciones entre la estructura y la función de las comunidades de procariotas de los humedales deltaicos remarca la importancia de los estudios que combinan mediciones metabólicas *in situ* de las tasas de los principales metabolismos relacionados con el carbono, con aproximaciones moleculares, para entender mejor los procesos que determinan el flujo de carbono en estos tipos de ecosistemas.

7.3. Relación entre las diferentes estructuras de las comunidades de procariotas y su asociación con los metabolismos del carbono en lagunas no salinas de interior

En el capítulo 5 se han estudiado la estructura y los metabolismos relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas que habitan en el agua y en el sedimento de lagunas representativas de los humedales no salinos de interior de la región biogeográfica mediterránea. Estas lagunas están clasificadas en diferentes tipos y presentaron distintos estados de

conservación. Se ha comprobado que las características limnológicas de los diferentes tipos de humedal son el factor que más peso tiene en la estructuración y los metabolismos potenciales de la comunidad de procariotas. No obstante, especialmente en el agua, el efecto de la estacionalidad y del estado de conservación de las lagunas también afecta, aunque en menor medida, a la estructura y la función de las comunidades.

Al igual que en otros ecosistemas interiores, como, por ejemplo, las lagunas salinas de interior descritas en el tercer capítulo de esta tesis, las características limnológicas de las diferentes categorías de lagunas determinan la estructura de la comunidad de procariotas, pero al mismo tiempo el impacto antrópico también ejerce una gran influencia. Como se ha visto en el trabajo de Morant (2022), realizado en estas mismas lagunas durante el mismo periodo de muestreo, las lagunas no salinas de interior presentan un gradiente de emisión de metano, desde las lagunas no salinas de aguas alcalinas, con las emisiones de metano más bajas, a las lagunas fluviales y las no salinas de baja alcalinidad, siendo esta última categoría la que mayores emisiones de metano presentó. Estas emisiones tan altas en comparación a otros tipos de zonas húmedas están fuertemente asociadas a la estructura de las comunidades microbianas de estas lagunas, puesto que al contrario que en los humedales estudiados en los otros capítulos, en las lagunas no salinas de interior los grupos de procariotas relacionados con el metabolismo del metano se encuentran entre los más abundantes de la comunidad. Así, en el agua, la familia bacteriana *Beijerinckiaceae* (filo Proteobacteria) mostró una gran abundancia relativa, especialmente en el agua de las lagunas no salinas de baja alcalinidad, donde también ejerce como taxón característico. Esta familia de bacterias contiene miembros que son metanótrofos obligados o facultativos, que en los sistemas estudiados son muy abundantes debido a la alta producción de metano. Por el mismo motivo en el sedimento la familia bacteriana

Anaerolineaceae (filo Chloroflexi), cuyos miembros tienen una relación de sintrofia con las arqueas metanógenas (Liang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2018), fue una de las familias más abundantes en todos los tipos de humedales.

En lo referente a los taxones característicos (*indicator taxa*) de los diferentes estados ecológicos, el hecho de que en las lagunas no salinas de interior el estado ecológico muy bueno no presentara taxones característicos mientras que los demás estados ecológicos sí los tuvieron podría indicar que en las lagunas no salinas de interior la alteración debido al impacto humano tiene un mayor peso que las características limnológicas de cada laguna y homogeneiza las comunidades de procariotas de las diferentes lagunas alteradas, resultando en una comunidad similar, con taxones característicos como las familias bacterianas *Beijerinckiaceae* o *Methylococcaceae* (ambas del filo Proteobacteria), cuyos miembros son metanótrofos. En cambio, en las lagunas no alteradas, las características limnológicas de cada tipo de humedal ejercen una gran influencia en las comunidades de procariotas que las habitan, resultando en comunidades muy divergentes entre las categorías de lagunas, sin taxones comunes a todas ellas que los análisis de taxones característicos puedan detectar.

Dado que las altas salinidades, y por tanto las altas concentraciones de sulfato, inhiben la metanogénesis (Oren 2011, Sorokin y McGenety 2019), los bajos valores de estas variables ambientales en las lagunas no salinas de interior permiten una gran actividad de las arqueas metanógenas y explican las mayores emisiones de metano de las lagunas no salinas de interior respecto a otros tipos de lagunas mediterráneas (Morant 2022). Por otra parte, la gran abundancia relativa de la familia *Methanobacteriaceae* en las lagunas no salinas de baja alcalinidad contrasta con el resto de los tipos de lagunas no salinas de interior e incluso con la tendencia general del resto de tipos de zonas

húmedas mediterráneas analizadas en los anteriores capítulos, donde la familia *Methanomassiliicoccaceae* es en general la familia de metanógenos con mayor abundancia relativa. Por lo tanto, las lagunas no salinas de baja alcalinidad son el tipo de laguna mediterránea con la estructura de la comunidad de metanógenos más diferente de todos los humedales mediterráneos estudiados. La mayor prevalencia de la familia *Methanobacteriaceae* en las lagunas no salinas de baja alcalinidad podría estar relacionada con sus mayores emisiones de metano en comparación a los otros tipos de lagunas no salinas de interior. Los miembros de esta familia realizan la metanogénesis basada en la reducción del CO₂ mediante hidrógeno (Granada *et al.* 2018). Esta dependencia del hidrógeno indica que, en las lagunas no salinas de baja alcalinidad, puede haber una elevada producción de hidrógeno gracias a la degradación de la materia orgánica del sedimento, que se encuentra en cantidades elevadas en este tipo de lagunas (Capítulo 5, Figura 5.6). Esta gran cantidad de materia orgánica probablemente sea aportada por los macrófitos que habitan en ellas, ya que la gran mayoría de las lagunas de este tipo tienen una cobertura de macrófitos mayor del 70% (Morant 2022). Esta mayor producción de hidrógeno podría estar relacionada con una mayor abundancia relativa y actividad de los metanógenos de la familia *Methanobacteriaceae*. Esta mayor actividad metabólica también puede ocurrir en las lagunas con un estado ecológico muy malo, donde esta familia de metanógenos también es muy abundante. A pesar de tener una cantidad de materia orgánica en el sedimento baja, donde estarían los sustratos susceptibles de ser metabolizados por los metanógenos, estas lagunas presentaron mayores emisiones de metano que las que tenían un estado ecológico mejor (Morant 2022). La eutrofización se ha relacionado con un incremento en la metanogénesis y una predominancia de la metanogénesis basada en la reducción del CO₂ mediante hidrógeno, siendo los aportes de

carbono un factor importante en el control de la producción de metano (Yang *et al.* 2020). Como se ha discutido en el capítulo de lagunas salinas de interior, la alteración antrópica puede aportar sustratos metabólicos que normalmente están ausentes o en poca concentración si el estado ecológico fuera óptimo. Este aporte de nutrientes y sustratos en las lagunas alteradas puede incrementar la producción de hidrógeno por parte de los microorganismos y desembocar en una mayor relevancia y actividad metanogénica de la familia *Methanobacteriaceae* en la comunidad de metanógenos de las lagunas no salinas de interior con un estado ecológico muy malo, incrementándose por tanto las emisiones de metano a pesar de los relativamente bajos niveles de materia orgánica en el sedimento de estas lagunas. Por otra parte, los resultados de este capítulo sugieren que en las lagunas estudiadas la comunidad de arqueas metanógenas controla la abundancia de bacterias metanótrofas, que son más abundantes en las lagunas con mayores emisiones de metano, como en las lagunas más alteradas. De hecho, como se ha señalado, en estas lagunas algunas familias de bacterias metanótrofas ejercen de taxón característico. No obstante, a pesar de que en el capítulo de los humedales deltaicos se observó que las bacterias metanótrofas podían reducir las emisiones finales de metano en los humedales con mayor producción de este gas, en las lagunas no salinas de interior estudiadas no ocurre así, probablemente porque la producción de metano es tan grande que las bacterias metanótrofas no son capaces de mitigar su emisión a la atmósfera.

Por otra parte, al igual que en los anteriores capítulos, el nivel de alteración tiene un papel importante en la determinación de las tasas de producción primaria bruta (GPP) de los humedales no salinos de interior estudiados en este capítulo, ya que las lagunas con peores estados ecológicos se asocian a mayores tasas de GPP (Morant 2022). Generalmente estas mayores tasas de GPP se han asociado con mayores relevancias de las cianobacterias acuáticas

en las lagunas alteradas. No obstante, la gran abundancia relativa de cianobacterias en las lagunas no salinas de interior con buen estado ecológico y con menores tasas de GPP indica que no siempre se pueden ligar los resultados taxonómicos con la función metabólica, por lo que las herramientas bioinformáticas como el PICRUS2 pueden ayudar a mejorar el conocimiento de la relación estructura-función de las comunidades de procariontas. De hecho, una abundancia de cianobacterias relativamente elevada en el agua no tiene por qué estar ligada a un mal estado ecológico, ya que la sinergia entre un aporte de nutrientes y temperaturas cálidas puede favorecer su crecimiento, aunque este es más exacerbado en los humedales eutróficos (Ewing *et al.* 2020).

En general, en todos los tipos de humedales estudiados en esta tesis se ha observado una buena relación entre las tasas de GPP y *gene counts* inferidos del gen *psbA*, por lo que la inferencia molecular de este metabolismo arroja unos resultados que se aproximan bastante a las tasas reales. No obstante, en general dicha correlación presenta un ajuste bajo pero significativo. Esto puede ser debido a que la fotosíntesis es llevada a cabo tanto por algas eucariotas como por cianobacterias, pero el PICRUS2 sólo infiere el potencial metabólico de éstas últimas, por lo que no tiene en cuenta a las algas eucariotas, cosa que explicaría el bajo ajuste observado en las correlaciones. Por otra parte, no se ha observado una relación significativa entre las tasas de respiración o de emisión de metano y *gene counts* inferidos por PICRUS2 de los respectivos genes marcadores. La relación entre el metabolismo potencial y el real es compleja, y las tasas metabólicas de respiración y de emisión de metano que se han medido son un balance entre distintos procesos llevados a cabo por grupos de microorganismos diferentes que pueden dificultar encontrar una relación entre dichas tasas y su inferencia mediante flujos de trabajo (*pipelines*) bioinformáticos. En concreto, al igual que pasa con la

relación de las tasas de GPP y *gene counts* del gen *psbA*, el PICRUST2 sólo puede inferir la respiración potencial de las comunidades de procariontas, y puede no estar considerando el resto de los organismos que pueden estar respirando activamente y contribuyendo a las tasas de respiración medidas. En cuanto a las emisiones de metano, dependen tanto de la acción de las arqueas metanógenas y de su posible inhibición por competencia con otros microorganismos, como de la actividad de las bacterias metanótrofas, por lo que vincular unas emisiones de metano que son un balance entre su producción y consumo con los respectivos metabolismos potenciales puede arrojar unas correlaciones con un ajuste bajo o inexistente. No obstante, sí que se han obtenido correlaciones positivas significativas, y con un ajuste alto, entre las abundancias de los metanótrofos y los metanógenos y entre la abundancia de los metanótrofos y las emisiones de metano. Por tanto, para obtener una buena visión global de la relación entre la estructura de las comunidades y los metabolismos del carbono, es necesaria una combinación de análisis de estructura de la comunidad y de potencial metabólico, puesto que ambos tipos de aproximaciones son complementarias y arrojan mejores resultados al combinarlas que de forma individual.

En un intento de esclarecer las complejas relaciones dentro de la comunidad microbiana, el estudio de redes de coocurrencia y los parámetros asociados a ellas ha resultado de gran utilidad. En la red de coocurrencia de sedimento, el gran número de ZOTUs cosmopolitas presentes en todos los tipos de lagunas contrasta con las redes de coocurrencia de los otros tipos de lagunas mediterráneas estudiados en los anteriores capítulos, donde el número de estos ZOTUs era muy bajo, por lo que las redes de cada tipo laguna estaban muy diferenciadas entre sí. No obstante, la gran cantidad de estos ZOTUs en la red de sedimento de las lagunas no salinas de interior indica una baja diferenciación de las redes de cada tipo, sugiriendo que las comunidades del

sedimento de las lagunas no salinas de interior tienen un alto grado de homogeneidad en comparación a los otros tipos de humedales mediterráneos. En contraposición, la red de coocurrencia de las comunidades del agua tiene un comportamiento parecido a las redes de coocurrencia del agua de los otros tipos de humedales mediterráneos estudiados, ya que estaba más afectada por la estacionalidad, y a su vez mostraba una mayor complejidad y compartimentalización que la del sedimento.

El efecto de la estacionalidad en las redes de coocurrencia se ha observado en otros trabajos (Liu *et al.* 2020, Wang *et al.* 2021), como también una mayor complejidad de la red del agua que la del sedimento (Yang *et al.* 2021). Esto puede deberse a que los procariotas acuáticos son más sensibles a los factores ambientales que los del sedimento porque las condiciones del agua son más fluctuantes (Wei *et al.* 2016), y esta fluctuación puede generar un hábitat más heterogéneo que se reflejaría en la mayor modularidad de la red del agua (Olesen *et al.* 2007). Esta diferencia en la estabilidad entre agua y sedimento explicaría por qué las comunidades de procariotas acuáticos están influenciadas por una combinación de estacionalidad, estado ecológico y tipo de humedal, mientras que las comunidades del sedimento se ven afectadas mayoritariamente por este último factor.

Por lo que respecta al rol topológico de los nodos de las redes, aquellos clasificados como conectores o como *module hubs*, que son claves para la estructura de la red (Olesen *et al.* 2007), mostraron una baja abundancia, indicando la gran importancia de los taxones raros para mantener la funcionalidad y la estabilidad de la comunidad (Gong *et al.* 2022). Al mismo tiempo, en las redes analizadas algunos *module hubs*, organismos clave en la organización del módulo de la red al que pertenecen, tienen un papel relevante en los diferentes metabolismos implicados en el ciclo del carbono. Como las

capacidades metabólicas de los organismos clave de las comunidades sustentan la estabilidad de la comunidad general (Xun *et al.* 2021), cualquier cambio que afecte a estos *module hubs* podría suponer un gran impacto en la estructura de las redes y en el balance de carbono de las lagunas estudiadas.

En conclusión, este capítulo ha determinado los factores que afectan a la estructura y a los metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas de lagunas representativas de humedales no salinos de interior mediterráneos. La alcalinidad, el pH y el carbonato determinan la estructura de dichas comunidades, que a su vez está influenciada por el estado ecológico de las lagunas, que también afecta a la comunidad de arqueas metanógenas y a las tasas de emisión de metano. La complejidad de estudiar la relación entre estructura y función de la comunidad de procariotas remarca la necesidad de combinar métodos moleculares con medidas *in situ* de los principales metabolismos del carbono para entender los balances de carbono y los flujos de gases de efecto invernadero carbonados (C-GEI) en los ecosistemas no salinos y así poder mejorar su gestión con una perspectiva climática, minimizando los metabolismos que emiten carbono y favoreciendo los que lo fijan a la vez que se mantiene la biodiversidad de este tipo de zonas húmedas.

7.4. Efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en la actividad de las arqueas metanógenas y las emisiones de metano asociadas en diferentes humedales mediterráneos

En este capítulo se ha estudiado el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en la expresión génica de las arqueas metanógenas del sedimento de 16 lagunas representativas de diferentes tipos de humedales mediterráneos. Se ha comprobado que el aumento de la temperatura promueve una mayor expresión génica del gen *mcrA*, que codifica para una enzima implicada en el último paso de la metanogénesis, y se ha relacionado este aumento de la

expresión génica con el incremento de las emisiones de metano con la temperatura. Además, se ha observado que el incremento de la temperatura favorece una mayor actividad de las arqueas metanógenas respecto a unos de sus competidores, las bacterias sulfatoreductoras (SRB).

En los tres primeros capítulos de esta tesis, se ha observado cómo las características ecológicas de los humedales influyen notablemente en la estructura y el metabolismo potencial de las comunidades de procariotas. En este capítulo, se ha determinado que las lagunas no salinas de interior, que presentan tasas altas de emisiones de metano (Morant 2022), son las que a su vez tienen en general mayor expresión del gen *mcrA*, debido a la cantidad de materia orgánica que presentan en el sedimento (Capítulo 5, Figura 5.6) y a los bajos niveles de conductividad (y por tanto de sulfato), que reducen la competencia de los metanógenos con las SRB. No obstante, las características limnológicas particulares de cada laguna matizan este patrón general de los humedales no salinos de interior. Así, el Galacho de El Burgo de Ebro, a pesar de que presenta una cantidad importante de materia orgánica en el sedimento, en general es un humedal que se encuentra seco y sólo se inunda ocasionalmente debido a crecidas del río Ebro (Morant 2022). La adaptación a un sedimento casi permanentemente seco y con elevada conductividad produce que sus comunidades de metanógenos tengan una actividad muy baja, lo que explica las bajas cantidades detectadas de transcritos y por tanto las bajas emisiones de metano. El Ullal de Baldoví y la Laguna de Alcaparrosa son humedales alcalinos, y a pesar de que también poseen cantidades relevantes de materia orgánica en el sedimento, debe haber una serie de factores ambientales que frenan la actividad de sus metanógenos. Por ejemplo, estas dos lagunas presentan conductividades relativamente altas (y por tanto mayores concentraciones de sulfato) (Tabla 6.1), por lo que la baja actividad de sus metanógenos podría deberse a la competencia con las bacterias

sulfatoreductoras (SRB), las cuales se ven favorecidas por dichas cantidades de sulfato relativamente elevadas. Por otra parte, en el caso de las lagunas costeras, las altas salinidades (y por tanto las altas concentraciones de sulfato) en humedales como Encanyissada o las Salinas del Cabo de Gata explican la baja actividad de sus comunidades de metanógenos, como ya se ha discutido en los dos primeros capítulos de esta tesis. Un caso especial es la desembocadura del río Bullent, cuya cantidad de materia orgánica en el sedimento es muy baja, lo que causa a su vez una baja actividad de las arqueas metanógenas.

Aunque el incremento de las cantidades de transcritos del gen *mcrA* con la temperatura es común a casi todas las categorías de humedales mediterráneos analizadas, cada una de ellas sigue un patrón característico de cambios en la cantidad de transcritos. Como se ha determinado a lo largo de los capítulos anteriores de esta tesis, la gran mayoría de tipos de lagunas presentan comunidades de metanógenos específicas, que se pueden diferenciar entre ellas bien por la abundancia relativa total de los metanógenos o bien por la clasificación taxonómica de los taxones más abundantes. La abundancia de las diferentes familias de metanógenos puede variar con la temperatura, habiendo taxones que dominan a bajas temperaturas mientras que otros son más abundantes a temperaturas más altas (Fu *et al.* 2015). Además, un incremento de la temperatura puede promover un cambio en la ruta metanogénica dominante (Fu *et al.* 2015). La mayor o menor abundancia relativa de cada grupo de metanógenos en los humedales estudiados podría explicar los diferentes patrones observados de incremento de transcritos del gen *mcrA*, de forma que en determinadas categorías de humedales puede haber metanógenos adaptados a temperaturas más elevadas mientras que en otras puede haber metanógenos adaptados tanto a temperaturas medias como altas. Además, este incremento de temperatura puede haber provocado un cambio

en la ruta metanogénica dominante. Teniendo en cuenta que en las redes de coocurrencia de las lagunas fluviales estudiadas en el capítulo de lagunas no salinas de interior los metanógenos actúan como *module hubs*, es decir, actúan como nexo de conexión con el resto de los microorganismos que forman parte de su módulo, un aumento de la temperatura en estos ecosistemas que afecte a la dominancia relativa de las rutas metanogénicas puede provocar un efecto muy importante en la estructura y los metabolismos relacionados con el carbono de las comunidades de procariotas de las lagunas fluviales, ya que las capacidades metabólicas de los organismos claves de las comunidades controlan la estabilidad de la comunidad general (Xun *et al.* 2021).

Un caso particular es el de las lagunas salinas de interior, donde el número de transcritos del gen *mcrA* era tan bajo en todas las temperaturas estudiadas que no se pudo cuantificar por qPCR, excepto en la laguna de Caballo Alba, que de todas ellas es la menos salina, ya que es una laguna bicarbonatado-sódica. Esto mismo sucedió con las lagunas costeras con salinidades más elevadas, como Encanyissada o las salinas de Cabo de Gata. En las lagunas salinas de interior y en lagunas deltaicas, el incremento en la salinidad se relacionó con un decrecimiento de las emisiones de metano (Camacho *et al.* 2017; Morant 2022). Teniendo en cuenta el bajo número de transcritos de gen *mcrA* observados en las lagunas más salinas, podemos concluir que las bajas emisiones de metano que se observan en las lagunas mediterráneas con salinidades elevadas, tanto de interior como costeras, son debidas a una baja producción de metano por parte de las arqueas metanógenas y no tanto a su consumo por parte de las bacterias metanótrofas. Por otra parte, en los ambientes salinos la metanogénesis metilotrófica es la ruta metanogénica mayoritaria (Zhou *et al.* 2022), debido a la presencia de metilaminas, compuestos abundantes en estos ambientes que permiten la actividad de los metanógenos metilotróficos ya que no entran en competencia con las bacterias

sulfatoredutoras (SRB), las cuales no utilizan metilaminas (Sorokin y McGenety 2019). No obstante, en el capítulo de las lagunas salinas de interior ya se discutió que tal vez la presencia de metilaminas en las lagunas salinas estudiadas sea baja, por lo que la producción de metano podría depender en gran parte de la metanogénesis acetoclástica y la basada en la reducción del CO₂, las cuales se ven inhibidas a altas salinidades (Oren 2011). La baja cantidad de transcritos del gen *mcrA* en las lagunas con mayores salinidades parece apoyar esto último. A pesar de que la cantidad de transcritos de *mcrA* en estas lagunas es muy baja, sí que se detectan transcritos del gen que codifica para el 16S rRNA de metanógenos, a veces en cantidades comparables a lagunas de tipos menos salinos. Esto permite suponer que en las lagunas salinas las arqueas metanógenas están activas pero no son capaces de realizar metanogénesis. Por lo tanto, los metanógenos que habitan en estas lagunas deben obtener energía por medio de otros metabolismos que no implican a la metanogénesis o bien porque mantienen relaciones simbióticas con otros microorganismos. De hecho, se ha especulado que teóricamente, los metanógenos podrían vivir conservando la energía mediante reacciones catalizadas por la luz, ya que pueden sintetizar moléculas fotoactivas que se podrían acoplar a un transporte transmembrana de iones (Buan 2018). Por otra parte, las relaciones conocidas de sintrofia de las arqueas metanógenas con otros microorganismos implican producción de metano (Saha *et al.* 2020), por lo que tal vez en los ecosistemas salinos se producen relaciones de sintrofia aún no estudiadas que permiten que las arqueas metanógenas estén activas sin necesidad de producir metano.

La correlación positiva entre las emisiones de metano y la cantidad de transcritos del gen *mcrA* y del gen que codifica para el 16S rRNA de metanógenos indica que el aumento de las emisiones de metano con la temperatura puede ser debido o bien a un aumento de la abundancia de las

arqueas metanógenas o bien debido a un aumento de la expresión del gen *mcrA*. No obstante, la falta de correlación entre la cantidad de transcritos del gen 16S de metanógenos con la temperatura y el aumento de la ratio *mcrA*/16S de metanógenos con la temperatura indica que dicho aumento de las emisiones de metano se debe a un incremento de la expresión génica del gen *mcrA* y por tanto de la producción de metano por parte de los metanógenos. El objetivo de este capítulo era evaluar la respuesta rápida de las arqueas metanógenas a un incremento de temperatura, por lo que el tiempo de incubación de las muestras de sedimento a diferentes temperaturas fue corto. Así, probablemente no pasó el tiempo suficiente para que se pudiese dar un aumento significativo de la abundancia de arqueas metanógenas. No obstante, en experimentos donde se ha analizado el efecto de un incremento de la temperatura a largo plazo en las comunidades de metanógenos y en las emisiones de metano sí se observó que las temperaturas altas promovieron un aumento de la abundancia de metanógenos, lo que a su vez se relacionó con una mayor producción de metano (Zhu *et al.* 2020).

En cuanto a la relación entre la cantidad de transcritos del gen *mcrA* determinada por qPCR y *gene counts* obtenidos mediante PICRUSt2, hemos determinado que la inferencia de *gene counts* mediante el cDNA es más semejante con la actividad real de los metanógenos y está más relacionada con las emisiones de metano que la inferencia de *gene counts* mediante el ADN. Esta divergencia de resultados entre las dos inferencias puede ser debida a que el PICRUSt2 basado en el cDNA sólo tiene en cuenta a los microorganismos que están activos y por tanto con una cantidad apreciable de transcritos del gen *mcrA*, mientras que el PICRUSt2 basado en el DNA tiene en cuenta sólo las copias del gen *mcrA* que se encuentran en el cromosoma, y que son pocas en comparación a la cantidad de sus respectivos transcritos. Por lo tanto, el PICRUSt2 basado en el DNA está más relacionado con el potencial

metabólico de las comunidades de procariotas, mientras que el PICRUST2 basado en el cDNA es más indicativo de las tasas metabólicas reales. Debido a esto, y a la buena correlación con los resultados de la qPCR, en la gran mayoría de categorías de humedales mediterráneos se pueden utilizar *gene counts* inferidos mediante PICRUST2 basado en el cDNA como un buen indicador de la actividad metanogénica de las arqueas metanógenas sin necesidad de realizar qPCR. No obstante, los *gene counts* del gen *mcrA* obtenidos mediante el PICRUST2 basado en el ADN también mostraron una correlación positiva significativa con las emisiones de metano, por lo que esta herramienta bioinformática es de gran utilidad para indagar en el potencial metabólico de las comunidades de procariotas también a partir de las muestras de ADN y no sólo de cDNA.

Respecto a la relación de competencia entre las arqueas metanógenas y las bacterias sulfatoreductoras (SRB), en ambientes salinos las SRB son mejores competidoras que las arqueas metanógenas que realizan la metanogénesis acetoclástica o la basada en la reducción del CO₂ (Sorokin y McGenety 2019). No obstante, los resultados de este capítulo indican que un incremento de la temperatura invierte esta relación de competencia, favoreciendo la actividad potencial de las arqueas metanógenas respecto a la de las SRB. Por lo tanto, en ambientes salinos como los descritos en los capítulos de lagunas salinas de interior y de lagunas deltaicas, el incremento de la temperatura que indican las predicciones sobre el cambio climático (IPCC 2014; MedECC 2020) puede disminuir la inhibición de la metanogénesis por parte de las SRB y resultar en un incremento relevante de las emisiones de metano de estos humedales, donde de forma natural son bajas (Camacho *et al.* 2017; Morant *et al.* 2020a). Además, teniendo en cuenta que en los ecosistemas salinos que se han estudiado en esta tesis la cantidad de materia orgánica en el sedimento es elevada, la menor competencia de las SRB con las arqueas metanógenas a

temperaturas elevadas puede hacer que los sustratos metabólicos que utilizan las SRB y que forman parte de dicha materia orgánica pasen a ser utilizados por las arqueas metanógenas, por lo que probablemente las emisiones de metano de estos ambientes ricos en materia orgánica tengan un aumento exponencial con el incremento de la temperatura, como ya se ha demostrado en las lagunas salinas de interior (Camacho *et al.* 2017). Por otra parte, nuestros resultados apuntan a que, en las lagunas no salinas de interior, donde las emisiones de metano son de forma natural elevadas (Morant 2022), un incremento de la temperatura favorece aún más a las arqueas metanógenas frente a las SRB, por lo que en un escenario de cambio climático, con un aumento generalizado de las temperaturas, las emisiones de metano en este tipo de ecosistemas pueden aumentar de forma muy relevante y afectar de forma notable a sus balances de carbono. Además, como se ha observado en el capítulo de las lagunas no salinas de interior, en las lagunas de baja alcalinidad las SRB tienen un papel muy relevante en las redes de coocurrencia de procariotas del sedimento, ya que actúan como *module hubs*. Los metabolismos de los organismos clave de las comunidades sustentan la estabilidad de la comunidad general (Xun *et al.* 2021). Así, si como se ha observado, un aumento de la temperatura perjudica a las SRB, el incremento de temperaturas que se espera debido al cambio climático (IPCC 2014; MedECC 2020) puede afectar de forma importante a estos microorganismos, lo que podría alterar profundamente la estructura y función de la comunidad de procariotas, afectando en última instancia al balance de carbono de este tipo de ecosistemas.

En conclusión, en el capítulo 6 se ha estimado el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en las emisiones de metano y en la expresión génica de las arqueas metanógenas presentes en el sedimento de 16 lagunas representativas de varias categorías de humedales mediterráneos. Se ha

observado un aumento de las emisiones de metano a medida que se incrementa la temperatura, lo cual se ha relacionado con una mayor expresión génica de las arqueas metanógenas. Además, se ha determinado que hay una correlación significativa entre la inferencia metabólica de los microorganismos activos y la expresión génica analizada mediante qPCR, y se ha observado que el incremento de la temperatura favorece la actividad potencial de las arqueas metanógenas frente a la de las SRB. Los resultados de este capítulo permiten inferir el efecto que tendrá el cambio climático en las emisiones de metano y en la actividad de los microorganismos asociados a éstas en los humedales mediterráneos, y pueden ayudar a diseñar medidas de gestión de dichos humedales con una perspectiva climática.

7.5. Patrones estructurales de las comunidades de procariotas y su relación con los metabolismos del carbono en humedales mediterráneos

A lo largo de esta tesis, hemos demostrado cómo las características limnológicas que definen los diferentes tipos de lagunas determinan la estructura y los metabolismos del carbono de las comunidades de procariotas que habitan en dichas zonas húmedas. Al comparar las grandes categorías de humedales mediterráneos estudiadas en esta tesis entre sí (Figura 7.1), volvemos a comprobar que, tanto en agua como en sedimento, los diferentes gradientes ambientales condicionaron la estructura de las comunidades de procariotas, y que la clasificación de los humedales en diferentes tipos se vio reflejada en sus comunidades microbianas.

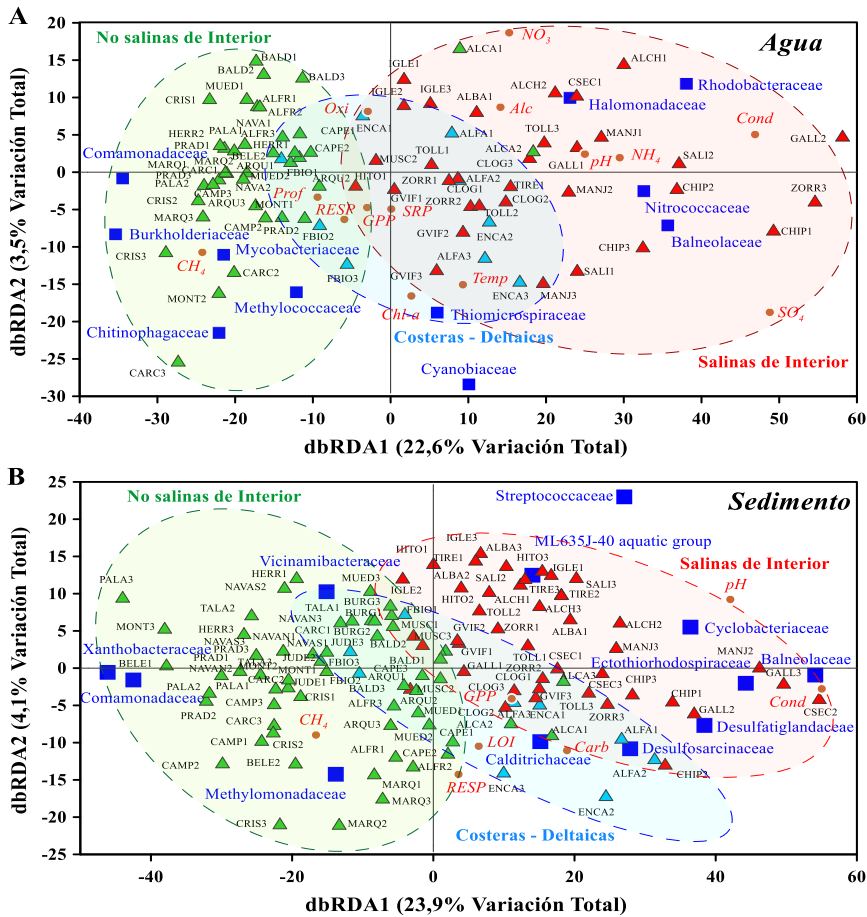


Figura 7.1 dbRDA mostrando la ordenación de las comunidades de procariotas del agua (A) y del sedimento (B) de las tres categorías de humedales estudiadas en base a las variables ambientales. Los códigos de las lagunas están descritos en el apartado de lugares de estudio del Capítulo 2. Los colores de los símbolos que representan a las lagunas indican las categorías de humedales a las que pertenecen: lagunas salinas de interior (Rojo), lagunas deltaicas (Azul) y lagunas no salinas de interior (Verde). Los números adyacentes a los códigos de las lagunas indican la estación: 1 (otoño-invierno), 2 (primavera) y 3 (verano). Las familias de procariotas con mayor capacidad de discriminación se han marcado con cuadrados de color azul oscuro. Variables ambientales: Chl_a (clorofila-*a*), Alc (alcalinidad), LOI (materia orgánica), NH₄ (amonio), Oxi (oxígeno), Temp (temperatura), SRP (ortofosfato reactivo soluble), Cond (conductividad), NO₃ (nitrato), SO₄ (sulfato), Prof (profundidad), pH y Carb (carbonato). Tasas metabólicas: GPP (producción primaria bruta), Resp (respiración aerobia), CH₄ (emisiones de metano).

Las comunidades de procariotas de las tres grandes categorías de humedales estudiadas mostraron diferencias significativas entre cada una de ellas, tanto en agua (ANOSIM, R: 0,69, $p < 0,01$) como en sedimento (ANOSIM, R: 0,619, $p < 0,01$), siendo la fuerza del factor categoría de humedal (R en el ANOSIM, a un R más alto mayor es el efecto del factor) similar en ambas matrices. El gradiente de salinidad se reveló como la variable más importante para diferenciar la estructura de las comunidades de procariotas de los humedales mediterráneos (Figura 7.1), reafirmando la importancia de la salinidad en la determinación de la composición de las comunidades microbianas (Rath *et al.* 2019). Así, tanto en el agua como en el sedimento, las comunidades de las lagunas no salinas de interior fueron las más diferentes de las tres grandes categorías de humedales estudiadas, ya que mostraron el R (ANOSIM) más elevado en las comparaciones por pares, sobre todo con las lagunas salinas de interior (Tabla 7.1).

Tabla 7.1 Resultados de la comparación por pares (ANOSIM) de las diferencias estadísticas en la estructura de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento entre las diferentes categorías de humedal estudiadas.

| | | R | p |
|------------------|----------------------|----------|----------|
| Agua | Deltaicas-Salinas | 0,467 | < 0,01 |
| | Deltaicas-No salinas | 0,650 | < 0,01 |
| | Salinas-No salinas | 0,745 | < 0,01 |
| Sedimento | Deltaicas-Salinas | 0,339 | < 0,01 |
| | Deltaicas-No salinas | 0,582 | < 0,01 |
| | Salinas-No salinas | 0,660 | < 0,01 |

Además, se ratifica que la salinidad influyó negativamente en las tasas de los metabolismos del carbono, especialmente en las emisiones de metano (Figura 7.1), registrándose las tasas más bajas de producción primaria bruta (GPP), respiración aerobia y metanogénesis en las lagunas salinas de interior (Morant 2022). No obstante, los resultados de los diferentes capítulos de esta tesis han

mostrado que las comunidades del agua y del sedimento también mostraron patrones específicos (Figura 7.1). Así, la sinergia entre la estacionalidad y el estado trófico elevado fue relevante en las comunidades del agua, ya que durante la estación más cálida se registraron las mayores tasas de GPP (asociadas a mayores concentraciones de clorofila), de respiración y de emisiones de metano, especialmente en los humedales no salinos de interior. En las comunidades del sedimento, la estacionalidad o el estado trófico no fueron tan relevantes como en el agua, siendo la salinidad el principal factor que afectó a su estructura y metabolismos del carbono, especialmente a las emisiones de metano, que fueron mayores en los humedales no salinos de interior.

Tabla 7.2 Resultados de similitud de la comunidad de procariotas, para agua y sedimento, de cada categoría de humedal obtenidos mediante un análisis SIMPER a nivel de familia.

| | Salinas | Deltaicas | No salinas |
|------------------|----------------|------------------|-------------------|
| Agua | 41,32 | 47,96 | 48,79 |
| Sedimento | 44,43 | 57,81 | 53,25 |

Cada gran categoría de humedal mostró unas comunidades de procariotas específicas determinadas por las variables ambientales, que además se pueden relacionar con las tasas de los metabolismos del carbono (Figura 7.1). En el agua, las lagunas salinas de interior y, dentro de las deltaicas, las que mostraron conductividades más altas, se asociaron con una mayor relevancia de familias halófilas como *Halomonadaceae*, y de otras familias como *Rhodobacteraceae* o *Balneolaceae*. Por otra parte, las lagunas no salinas de interior se asociaron con familias como *Burkholderiaceae* o *Comamonadaceae*, pero también fueron relevantes la familia bacteriana de metanótrofos *Methylococcaceae*, relacionada con los altos flujos de metano de las lagunas no salinas de interior. Además, durante la estación más cálida,

los humedales con mayor estado trófico se relacionaron con mayores abundancias de la familia de cianobacterias *Cyanobiaceae*, que a su vez se relaciona con las mayores tasas de GPP medidas en estos humedales. En el sedimento, las lagunas salinas de interior y, dentro de las deltaicas, las que mostraron conductividades más altas, se relacionaron con mayores abundancias de bacterias sulfatoreductoras (SRB), sobre todo de las familias *Desulfosarcinaceae* y *Desulfatiglandaceae*, cuya mayor relevancia en este tipo de humedales puede explicar las bajas emisiones de metano medidas en ellos debido a la competencia de las SRB con las arqueas metanógenas. Además, la familia *Streptococcaceae* también es relevante en los humedales salinos de interior, probablemente debido a las grandes cantidades de aves acuáticas que habitan en estas lagunas, las cuales pueden afectar de forma notable a la dinámica de los microorganismos y de los nutrientes de este tipo de ecosistemas (Batanero *et al.* 2017). En las lagunas no salinas de interior fueron relevantes las bacterias metanótrofas, especialmente la familia *Methylomonadaceae*, que se asocia a las mayores emisiones de metano medidas en estas lagunas. Por otra parte, como se ha discutido a lo largo de esta tesis, los diferentes tipos de humedales que conforman las lagunas salinas de interior, las deltaicas y las no salinas de interior, también presentaron diferencias en la estructura de sus comunidades de procariontas y en los metabolismos del carbono asociados, debido a la influencia de las variables ambientales y del estado de conservación de las lagunas. A causa de esto, las lagunas salinas de interior, las deltaicas y las no salinas de interior no son homogéneas y no presentan una similitud muy elevada (Tabla 7.2, análisis SIMPER, mediante el que se puede obtener la similitud entre las diferentes muestras de una misma agrupación, en este caso la categoría de humedal), ya que, como hemos observado, aunque estas tres grandes categorías de lagunas presentan taxones específicos, a su vez los tipos de lagunas que forman cada

una de estas tres grandes categorías de humedales también presentan taxones marcadores, que se han descrito y discutido en los respectivos capítulos de esta tesis.

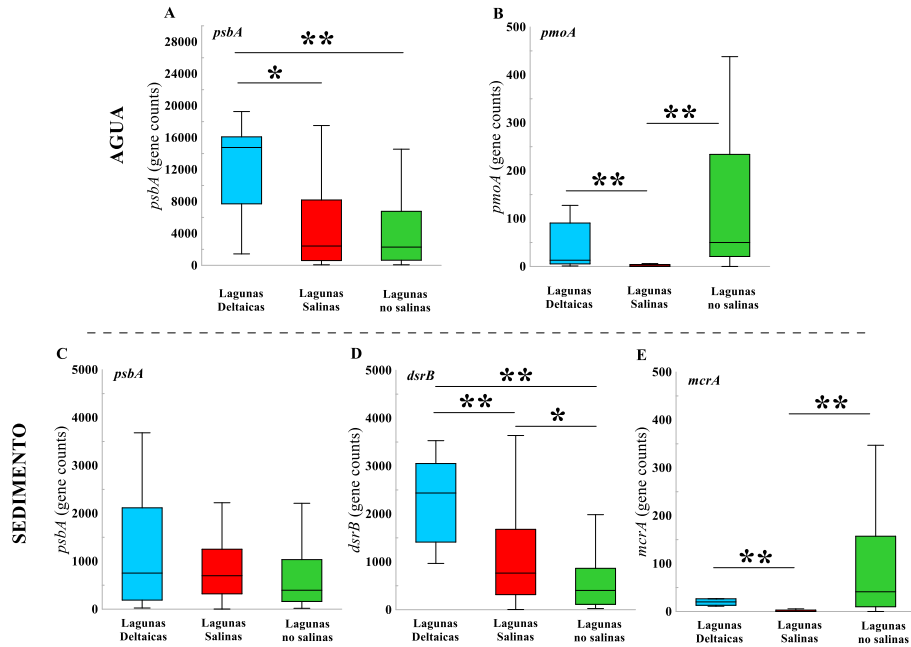


Figura 7.2. Diagramas de caja mostrando la distribución, en el agua y en el sedimento de cada categoría de humedal, *gene counts* inferidos mediante PICRUSt2 para los genes marcadores de los diferentes metabolismos asociados con el carbono. A y C) *gene counts* del gen *psbA* (fotosíntesis). Notar la diferencia en la escala del eje de las ordenadas entre los dos gráficos. B) *gene counts* del gen *pmoA* (metanotrofia aerobia). D) *gene counts* del gen *dsrB* (sulfatorreducción desasimilatoria). E) *gene counts* del gen *mcrA* (metanogénesis). En estos gráficos no se han representado los *outliers*, los cuales sí se han tenido en cuenta en los análisis estadísticos. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$.

Los cambios estructurales que generan las diferentes condiciones ambientales que caracterizan a los humedales estudiados en sus comunidades de procariontas comportan diferencias en los metabolismos potenciales que dichas comunidades pueden llevar a cabo (Figura 7.2). El potencial de realizar la fotosíntesis fue mayor en el agua que en el sedimento. Teniendo en cuenta que en los diferentes tipos de lagunas estudiados en esta tesis siempre se ha

encontrado una correlación significativa entre *gene counts* del gen *psbA* y las tasas de producción primaria bruta (GPP), el mayor potencial de GPP en el agua podría explicar que el compartimento planctónico de los humedales estudiados muestre mayores tasas de GPP que el bentónico (Morant 2022). Además, este potencial fotosintético fue mayor en el agua de las lagunas deltaicas que en el resto de los humedales, debido seguramente al alto grado de eutrofización de las lagunas de Encanyissada y Filtre Biològic.

Por otra parte, se ha discutido anteriormente que la salinidad influye negativamente en las emisiones de metano, lo que explica que en el agua de las lagunas salinas de interior fue donde se registró un menor potencial de metanotrofia aerobia, ya que la baja producción de metano en estos humedales no puede sustentar tasas altas de metanotrofia. A su vez, la relación negativa de la salinidad con las emisiones de metano se aprecia claramente en el patrón de potencial de metanogénesis de las lagunas estudiadas, siendo las lagunas salinas de interior las que menos *gene counts* del gen *mcrA* presentaron y las no salinas de interior las que mayor potencial de metanogénesis tuvieron.

En esta tesis no se han podido relacionar directamente las emisiones de metano con el potencial de metanogénesis. Esto puede ser debido a que dichas emisiones no son una producción directa de metano, sino que son un balance entre los metabolismos que producen el metano y los que lo consumen o reducen su producción, como la sulfatoreducción desasimilatoria. De hecho, el potencial de sulfatoreducción desasimilatoria fue mayor en las lagunas deltaicas y en las salinas de interior respecto a las lagunas no salinas de interior, donde alcanza su valor más bajo, coincidiendo con el mayor potencial de metanogénesis y a su vez las mayores emisiones de metano que presentan este tipo de humedales.

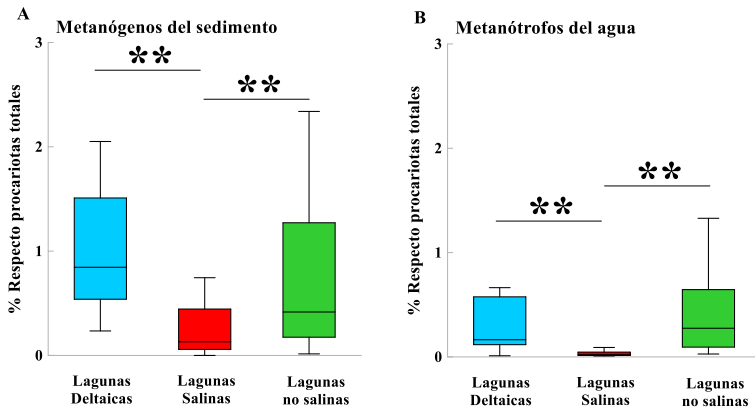


Figura 7.3. Diagramas de caja que muestran la abundancia relativa de las arqueas metanógenas del sedimento (A) y de las bacterias metanótrofas del agua (B) en cada categoría de humedal. En estos gráficos no se han representado los *outliers*, los cuales sí se han tenido en cuenta en los análisis estadísticos. **: $p < 0,01$.

El patrón de potencial de metanogénesis observado se ve reflejado en la abundancia relativa de las arqueas metanógenas del sedimento y las bacterias metanótrofas del agua (Figura 7.3). Así, las lagunas salinas de interior son las que presentan una menor abundancia relativa de estos dos grupos de microorganismos. Generalmente, en esta tesis no se ha podido relacionar la abundancia relativa de estos procariotas con las emisiones de metano, sobre todo respecto a las arqueas metanógenas. Esto puede ser debido a varios factores. Como se ha señalado anteriormente, en esta tesis no se ha medido una producción directa de metano, sino las emisiones de este gas, que son un balance entre varios metabolismos. Por tanto, puede haber un desacople entre estas emisiones de metano y la abundancia relativa de las arqueas. Por otra parte, como se ha demostrado en el capítulo de expresión génica, las emisiones de metano de los humedales estudiados están muy relacionadas con la actividad de las arqueas metanógenas, en concreto con la expresión del gen *mcrA*. Así, una mayor abundancia relativa de metanógenos no tiene por qué traducirse en una mayor emisión de metano porque muchos de estos

metanógenos pueden estar muertos o bien en un estado durmiente. Esta misma explicación también puede aplicarse a la falta de correlación de los *gene counts* del gen *mcrA* con las emisiones de metano, ya que como se ha observado en el capítulo de expresión génica, la inferencia del potencial de metanogénesis a partir de secuencias de ADN no tiene en cuenta la actividad real de los metanógenos, mientras que la inferencia a partir de las secuencias de cDNA sí que está más relacionada con la actividad real de los metanógenos y presenta una correlación positiva y con un ajuste alto con las emisiones de metano.

En conclusión, las diferentes categorías de humedales mediterráneos estudiadas presentan grandes diferencias entre sí a nivel microbiológico, de metabolismos reales y de metabolismos potenciales. Por lo tanto, para mejorar las predicciones del papel de los humedales mediterráneos en el cambio climático y de los posibles efectos adversos que este cambio provoque en dichos humedales, es necesario entender que los humedales mediterráneos no son homogéneos y que tendrán respuestas y patrones diferentes en función de la categoría de humedal en la que estén clasificados y de su estado de conservación.

Conclusiones

Capítulo 8. Conclusiones

1. Cada tipo de humedal estudiado mostró unas características ecológicas diferenciales que determinaron la estructura y los metabolismos relacionados con el carbono de sus comunidades de procariotas. La salinidad fue la variable ambiental más importante en la estructuración y en los metabolismos potenciales de las comunidades de procariotas del agua y del sedimento de los humedales mediterráneos, así como en las tasas metabólicas asociadas. Otras variables ambientales, como la alcalinidad en el agua o el pH y el carbonato en el sedimento, también se relacionaron con cambios en la estructuración de las comunidades.

2. La estructura y función de las comunidades acuáticas de procariotas se vieron influenciadas por una sinergia entre el tipo de humedal, su estado de conservación, y la estacionalidad. Las comunidades del sedimento fueron más estables y se vieron menos afectadas por el estado de conservación del humedal y por la estacionalidad, siendo el tipo de humedal el factor de mayor peso en la determinación de su estructura y función.

3. Las tasas de producción primaria bruta mostraron una correlación positiva significativa con el número de copias inferidas por PICRUSt2 del gen marcador de este metabolismo (*psbA*). En general, no se ha podido determinar una correlación significativa entre las tasas de respiración aerobia y las de emisión de metano con el número de copias inferidas mediante PICRUSt2 de los respectivos genes marcadores, debido a que estas tasas son el resultado de un balance entre distintos metabolismos llevados a cabo por microorganismos diferentes, lo que dificulta obtener una correlación significativa entre dichas tasas y el potencial metabólico inferido mediante un flujo de trabajo bioinformático.

4. Las interacciones entre los miembros de las comunidades de procariotas del agua mostraron una mayor complejidad y grado de compartimentalización que las de los sedimentos. Ambas comunidades presentaron taxones que desempeñan un papel clave en la organización de las interacciones entre sus miembros. Algunos de estos taxones mostraron genes asociados con los metabolismos relacionados con el carbono, por lo que los procesos que afecten a dichos taxones pueden acarrear grandes cambios en la estructura de las comunidades microbianas y repercutir en el balance global de carbono de los humedales.

5. En las lagunas salinas de interior, la mayoría de los diferentes tipos de lagunas, clasificadas en función de su salinidad, y también la mayoría de sus estados de conservación, mostraron taxones característicos. La abundancia relativa de las arqueas metanógenas tendió a incrementarse a lo largo del gradiente de salinidad, y no mostró cambios entre los diferentes estados de conservación. A pesar del aumento de la abundancia relativa de las arqueas metanógenas con la salinidad, esto no se relacionó con mayores tasas de emisiones de metano debido a la poca actividad metanogénica que presentaron dada su competencia con las bacterias sulfatoreductoras, que se ven favorecidas en ambientes salinos por la alta concentración de sulfato que estos presentan. La abundancia relativa de las bacterias metanótrofas fue mayor en las lagunas menos salinas, y no presentó cambios entre los diferentes estados de conservación. La mayor abundancia relativa de las bacterias metanótrofas en las lagunas menos salinas apoya el hecho que las arqueas metanógenas están menos activas a altas salinidades. No se encontraron correlaciones significativas entre las emisiones de metano con las copias inferidas mediante PICRUSt2 de los genes marcadores de metanogénesis (*mcrA*) y de metanotrofia (*pmoA*).

6. En las lagunas salinas de interior, las arqueas mostraron un papel relevante en la organización de las interacciones entre los procariotas, y fueron marcadores de un buen estado de conservación. La salinidad, junto a la estacionalidad y el estado de conservación, fueron los factores más importantes en la estructuración de las comunidades del agua. Las comunidades del sedimento no se vieron apenas afectadas por la estacionalidad o el estado de conservación, pero sí por la salinidad y por la presencia de aves acuáticas.

7. Los tres humedales deltaicos mostraron taxones característicos específicamente más abundantes en cada uno de ellos, y la similitud entre los humedales en base a la estructura de sus comunidades estuvo influenciada por la salinidad que estos presentaron. Las tasas de producción primaria bruta fueron las únicas que mostraron una correlación positiva significativa con las copias inferidas mediante PICRUST2 para su gen marcador (*psbA*).

8. En los humedales deltaicos, las arqueas metanógenas mostraron una abundancia relativa más elevada en el humedal más salino, mientras que las bacterias metanótrofas del agua mostraron la abundancia relativa más baja en el humedal con mayores emisiones de metano. Las emisiones de metano en los humedales deltaicos fueron el resultado de un balance complejo que dependió de la competencia de las arqueas metanógenas con las bacterias sulfatoreductoras, que estuvo regulada por la salinidad, y de la abundancia relativa y la actividad de las bacterias metanótrofas del agua.

9. Las características ecológicas y los patrones de las tasas metabólicas de los diferentes humedales deltaicos se vieron reflejadas en el número y en las interacciones de los procariotas que presentaron genes que participan en los metabolismos relacionados con el carbono. En estos tipos de humedales, la interacción entre la salinidad, la estacionalidad y el estado trófico determinó

la estructura de las comunidades de procariontes del agua, mientras que las del sedimento se vieron determinadas mayormente por la salinidad.

10. Los diferentes tipos de lagunas no salinas de interior y la mayoría de los estados ecológicos mostraron taxones característicos, estando algunos de estos relacionados con el metabolismo del metano. Las lagunas no salinas de baja alcalinidad y las que presentaron estados ecológicos muy malos mostraron una comunidad de arqueas metanógenas diferentes respecto a la de los otros tipos y estados ecológicos, lo que se relacionó con las mayores emisiones de metano observadas en ellas. Las bacterias metanótrofas del agua y del sedimento mostraron la mayor abundancia relativa en las lagunas no salinas de baja alcalinidad y en las que presentaron estados ecológicos muy malos, puesto que la mayor producción de metano en estas lagunas permitió mantener una elevada abundancia de bacterias metanótrofas.

11. En las lagunas no salinas de interior, las únicas tasas metabólicas que mostraron una correlación positiva significativa con las copias inferidas de su gen marcador (*psbA*) mediante PICRUSt2 fueron las de la producción primaria bruta. Las emisiones de metano presentaron una correlación positiva significativa con la abundancia relativa de las bacterias metanótrofas del agua y con la abundancia de las bacterias metanótrofas del sedimento, lo que refuerza la idea que la mayor producción de metano en estas lagunas permite mantener una abundancia relativa de bacterias metanótrofas elevada.

12. En las lagunas no salinas de interior, los taxones de procariontes relacionados con los metabolismos del carbono mostraron un papel relevante en la organización de las interacciones entre los miembros de las comunidades de procariontes. La alcalinidad, la estacionalidad y el estado ecológico determinaron la estructura de las comunidades de procariontes del agua,

mientras que en el sedimento el carbonato y el pH fueron las variables más importantes en la estructuración de las comunidades.

13. Se realizaron experimentos para determinar el efecto a corto plazo de un incremento de la temperatura en las emisiones de metano y en la expresión génica de las arqueas metanógenas del sedimento de diferentes lagunas representativas de los grandes tipos de humedales mediterráneos. El incremento de la temperatura provocó un aumento de las emisiones de metano ligado a la observación de un aumento de la transcripción del gen *mcrA* de las arqueas metanógenas. La no detección de transcritos de este gen en las lagunas más salinas demostró que las bajas emisiones de metano en los humedales salinos se deben a una baja producción de este gas por parte de las arqueas metanógenas y no a una alta tasa de consumo del metano por parte de las bacterias metanótrofas.

14. El incremento de la temperatura invierte la relación de competencia entre las arqueas metanógenas y las bacterias sulfatoreductoras, promoviendo una mayor actividad de las arqueas metanógenas a medida que aumenta la temperatura. Las bacterias sulfatoreductoras tienen un papel relevante en la organización de las interacciones entre los procariotas de las lagunas no salinas de interior. El incremento de la temperatura debido al cambio climático puede perjudicar a las bacterias sulfatoreductoras y afectar a la estructura de las comunidades de procariotas y en última instancia a los balances de carbono de este tipo de ecosistemas, favoreciendo a los metanógenos y con ello el incremento de las emisiones de metano.

15. Los diferentes tipos de humedales mediterráneos muestran comunidades específicas de procariotas, así como patrones concretos de metabolismos potenciales y de tasas metabólicas. Por lo tanto, para mejorar las predicciones de los efectos que tendrá el cambio climático en los humedales mediterráneos

y el papel de estos en los flujos de carbono, es necesario entender que dichos humedales no son homogéneos y que tendrán diferentes respuestas a nivel microbiológico y de metabolismo global en función del tipo de humedal al que pertenecen y de su estado de conservación.

Referencias

Referencias

[APHA] American Public Health Association. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: APHA.

[BOE] Boletín Oficial del Estado. (2015). Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. BOE núm. 219, de 12 de septiembre de 2015 (BOE-A-2015-9806).

[IPCC] Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva (CH): IPCC; 169 p.

[MedECC] Mediterranean Experts on Climate and Environmental Change. (2020). *Climate and Environmental Change in the Mediterranean Basin – Current situation and Risks for the Future. First Mediterranean Assessment Report Union for the Mediterranean, Plan Bleu*. Marseille (FR): UNEP/MAP; 632 p.

Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46.

Andreote, F. D., Jiménez, D. J., Chaves, D., Dias, A. C. F., Luvizotto, D. M., Dini-Andreote, F., *et al.* (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PloS One*, 7(6), e38600.

Batanero, G. L., León-Palmero, E., Li, L., Green, A. J., Rendón-Martos, M., Suttle, C. A., & Reche, I. (2017). Flamingos and drought as drivers of nutrients and microbial dynamics in a saline lake. *Scientific Reports*, 7(1), 12173.

Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., *et al.* (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 447-460.

Berg, J. S., Ahmerkamp, S., Pjevac, P., Hausmann, B., Milucka, J., & Kuypers, M. M. (2022). How low can they go? Aerobic respiration by microorganisms under apparent anoxia. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(3), fuac006.

Berry, D., & Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 5, 219.

Bridgham, S. D., Cadillo-Quiroz, H., Keller, J. K., & Zhuang, Q. (2013). Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology*, 19(5), 1325-1346.

Britton, R. H., & Crivelli, A. J. (1993). Wetlands of southern Europe and North Africa: mediterranean wetlands. *Wetlands of the world: Inventory, ecology and management Volume I: Africa, Australia, Canada and Greenland, Mediterranean, Mexico, Papua New Guinea, South Asia, Tropical South America, United States*, 129-194.

Buan, N. R. (2018). Methanogens: pushing the boundaries of biology. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2(4), 629-646.

Caliz, J., Montes-Borrego, M., Triado-Margarit, X., Metsis, M., Landa, B. B., & Casamayor, E. O. (2015). Influence of edaphic, climatic, and agronomic factors on the composition and abundance of nitrifying microorganisms in the rhizosphere of commercial olive crops. *PLoS One*, 10(5), e0125787.

Camacho, A., Picazo, A., Rochera, C., Santamans, A. C., Morant, D., Miralles-Lorenzo, J., & Castillo-Escriva, A. (2017). Methane emissions in Spanish saline lakes: Current rates, temperature and salinity responses, and evolution under different climate change scenarios. *Water*, 9(9), 659.

Chen, S., Wang, P., Liu, H., Xie, W., Wan, X. S., Kao, S. J., *et al.* (2020). Population dynamics of methanogens and methanotrophs along the salinity gradient in Pearl River Estuary: implications for methane metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1331-1346.

Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., *et al.* (2014). *Carbon and other biogeochemical cycles*. In *Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 465-570). Cambridge University Press.

Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117-143.

Compte-Port, S., Borrego, C. M., Moussard, H., Jeanbille, M., Restrepo-Ortiz, C. X., de Diego, A., *et al.* (2018). Metal contaminations impact archaeal community composition, abundance and function in remote alpine lakes. *Environmental Microbiology*, 20(7), 2422-2437.

Corrales-González, M., Rochera, C., Picazo, A., & Camacho, A. (2019). Effect of wastewater management on phosphorus content and sedimentary fractionation in Mediterranean saline lakes. *Science of the Total Environment*, 668, 350-361.

Cui, H. L., & Dyall-Smith, M. L. (2021). Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments. *Marine Life Science & Technology*, 3, 243-251.

- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., *et al.* (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688.
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_8), 1902-1907.
- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67(3), 345-366.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996-998.
- Edgar, R. C. (2017). Accuracy of microbial community diversity estimated by closed- and open-reference OTUs. *PeerJ*, 5, e3889.
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 219-232.
- Ewing, H. A., Weathers, K. C., Cottingham, K. L., Leavitt, P. R., Greer, M. L., Carey, C. C., *et al.* (2020). “New” cyanobacterial blooms are not new: two centuries of lake production are related to ice cover and land use. *Ecosphere*, 11(6), e03170.
- Faust, K., Sathirapongsasuti, J. F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J., & Huttenhower, C. (2012). Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Computational Biology*, 8(7), e1002606.
- Faust, K., & Raes, J. (2016). CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000Research*, 5, 1519.
- Florindo, C., Ferreira, R., Borges, V., Spellerberg, B., Gomes, J. P., & Borrego, M. J. (2012). Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Microbiological Methods*, 90(3), 220-227.
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., *et al.* (2007). Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7), 2093-2100.
- Fu, L., Song, T., & Lu, Y. (2015). Snapshot of methanogen sensitivity to temperature in Zoige wetland from Tibetan plateau. *Frontiers in Microbiology*, 6, 131.

- Gionchetta, G., Oliva, F., Menéndez, M., Lopez Laseras, P., & Romani, A. M. (2019). Key role of streambed moisture and flash storms for microbial resistance and resilience to long-term drought. *Freshwater Biology*, 64(2), 306-322.
- Gionchetta, G., Oliva, F., Romani, A. M., & Bañeras, L. (2020). Hydrological variations shape diversity and functional responses of streambed microbes. *Science of The Total Environment*, 714, 136838.
- Goberna, M., & Verdú, M. (2022). Cautionary notes on the use of co-occurrence networks in soil ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 166, 108534.
- Golterman HL. *The chemistry of phosphate and nitrogen compounds in sediments*. Springer Science and Business Media, 2007.
- Gonçalves, M. S. S., Gil-Delgado, J. A., Gosálvez, R. U., López-Iborra, G. M., Ponz, A., & Velasco, Á. (2018). Seasonal differences in drivers of species richness of waders in inland wetlands of La Mancha Húmeda Biosphere Reserve. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(6), 1414-1423.
- Gong, X., Chen, Z., Deng, Y., Zhao, D., Gao, P., Zhang, L., et al. (2022). Contrasting archaeal and bacterial community assembly processes and the importance of rare taxa along a depth gradient in shallow coastal sediments. *Science of the Total Environment*, 852, 158411.
- Granada, C. E., Hasan, C., Marder, M., Konrad, O., Vargas, L. K., Passaglia, L. M., et al. (2018). Biogas from slaughterhouse wastewater anaerobic digestion is driven by the archaeal family Methanobacteriaceae and bacterial families Porphyromonadaceae and Tissierellaceae. *Renewable Energy*, 118, 840-846.
- Guo, B., Zhang, L., Sun, H., Gao, M., Yu, N., Zhang, Q., et al. (2022). Microbial co-occurrence network topological properties link with reactor parameters and reveal importance of low-abundance genera. *npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 3.
- Hammer, U. T. (1986). *Saline lake ecosystems of the world* (Vol. 59). Springer Science & Business Media.
- He, H., Zhen, Y., Mi, T., Fu, L., & Yu, Z. (2018). Ammonia-oxidizing archaea and bacteria differentially contribute to ammonia oxidation in sediments from adjacent waters of Rushan Bay, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 116.
- Hedges, J. I. (1992). Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Marine Chemistry*, 39(1-3), 67-93.
- Heiri, O., Lotter, A. F., & Lemcke, G. (2001). Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology*, 25, 101-110.

- Henriques, I. S., Alves, A., Tacão, M., Almeida, A., Cunha, Â., & Correia, A. (2006). Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68(1-2), 139-148.
- Ho, A., Mo, Y., Lee, H. J., Sauheitl, L., Jia, Z., & Horn, M. A. (2018). Effect of salt stress on aerobic methane oxidation and associated methanotrophs; a microcosm study of a natural community from a non-saline environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 125, 210-214.
- Hu, A., Ju, F., Hou, L., Li, J., Yang, X., Wang, H., et al. (2017). Strong impact of anthropogenic contamination on the co-occurrence patterns of a riverine microbial community. *Environmental Microbiology*, 19(12), 4993-5009.
- Ju, F., & Zhang, T. (2015). 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4119-4129.
- Karimi, B., Maron, P. A., Chemidlin-Prevost Boure, N., Bernard, N., Gilbert, D., & Ranjard, L. (2017). Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 265-281.
- Kessler, A. J., Chen, Y. J., Waite, D. W., Hutchinson, T., Koh, S., Popa, M. E., et al. (2019). Bacterial fermentation and respiration processes are uncoupled in anoxic permeable sediments. *Nature Microbiology*, 4(6), 1014-1023.
- Khan, M. W., Bohannan, B. J., Nüsslein, K., Tiedje, J. M., Tringe, S. G., Parlade, E., et al. (2019). Deforestation impacts network co-occurrence patterns of microbial communities in Amazon soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(2), fyy230.
- Kolb, S., Knief, C., Dunfield, P. F., & Conrad, R. (2005). Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1150-1161.
- Kröninger, L., Gottschling, J., & Deppenmeier, U. (2017). Growth characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea*, 2017.
- Lawrenz, E., Smith, E. M., & Richardson, T. L. (2013). Spectral irradiance, phytoplankton community composition and primary productivity in a salt marsh estuary, North Inlet, South Carolina, USA. *Estuaries and Coasts*, 36, 347-364.
- Legendre, P., & Anderson, M. J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69(1), 1-24.

- Liang, B., Wang, L. Y., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *Amb Express*, 5, 1-13.
- Liu, X., Hou, W., Dong, H., Wang, S., Jiang, H., Wu, G., *et al.* (2016). Distribution and diversity of cyanobacteria and eukaryotic algae in Qinghai–Tibetan Lakes. *Geomicrobiology Journal*, 33(10), 860-869.
- Liu, J., Zhu, S., Liu, X., Yao, P., Ge, T., & Zhang, X. H. (2020). Spatiotemporal dynamics of the archaeal community in coastal sediments: assembly process and co-occurrence relationship. *The ISME Journal*, 14(6), 1463-1478.
- Llirós, M., García–Armenis, T., Darchambeau, F., Morana, C., Triadó–Margarit, X., Inceoğlu, Ö., *et al.* (2015). Pelagic photoferrotrophy and iron cycling in a modern ferruginous basin. *Scientific Reports*, 5(1), 13803.
- Lopes, C. T., Franz, M., Kazi, F., Donaldson, S. L., Morris, Q., & Bader, G. D. (2010). Cytoscape Web: an interactive web-based network browser. *Bioinformatics*, 26(18), 2347-2348.
- López-Flores, R., Quintana, X. D., Romani, A. M., Bañeras, L., Ruiz-Rueda, O., Compte, J., *et al.* (2014). A compositional analysis approach to phytoplankton composition in coastal Mediterranean wetlands: Influence of salinity and nutrient availability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 136, 72-81.
- McIlroy, S. J., & Nielsen, P. H. (2014). The family *Saprosiraceae*. In *The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea* (pp. 863-889). Springer Science+ Business Media.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., & Visscher, P. T. (2004). Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. *Biogeochemistry*, 8, 317-424.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., & Schmitz, R. A. (2018). Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends in Microbiology*, 26(1), 70-85.
- Morant, D., Picazo, A., Rochera, C., Santamans, A. C., Miralles-Lorenzo, J., Camacho-Santamans, A., *et al.* (2020a). Carbon metabolic rates and GHG emissions in different wetland types of the Ebro Delta. *PloS One*, 15(4), e0231713.
- Morant, D., Picazo, A., Rochera, C., Santamans, A. C., Miralles-Lorenzo, J., & Camacho, A. (2020b). Influence of the conservation status on carbon balances of semiarid coastal Mediterranean wetlands. *Inland Waters*, 10(4), 453-467.

- Morant, D. (2022). *The role of Mediterranean wetlands in climate regulation and greenhouse gases exchanges: from carbon biogeochemistry to European water and nature Directives* [Tesis de Doctorado, Universitat de València]. <https://roderic.uv.es/handle/10550/83880>.
- Nche-Fambo, F. A., Scharler, U. M., & Tirok, K. (2015). Resilience of estuarine phytoplankton and their temporal variability along salinity gradients during drought and hypersalinity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 158, 40-52.
- Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L., & Jordano, P. (2007). The modularity of pollination networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19891-19896.
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1908-1923.
- Picazo, A., Rochera, C., Vicente, E., Miracle, M. R., & Camacho, A. (2013). Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: a critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake. *Limnetica*, 32(1), 139-158.
- Picazo, A., Rochera, C., Villaescusa, J. A., Miralles-Lorenzo, J., Velázquez, D., Quesada, A., & Camacho, A. (2019). Bacterioplankton community composition along environmental gradients in lakes from Byers peninsula (Maritime Antarctica) as determined by next-generation sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10, 908.
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27(2), 313-338.
- Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahal, D. R., & Macián, M. C. (2014). The Family *Rhodobacteraceae*. Springer.
- Rath, K. M., Fierer, N., Murphy, D. V., & Rousk, J. (2019). Linking bacterial community composition to soil salinity along environmental gradients. *The ISME Journal*, 13(3), 836-846.
- Rayment, G. E., & Higginson, F. R. (1992). *Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods*. Inkata Press Pty Ltd.
- Roy, A., Sar, P., Sarkar, J., Dutta, A., Sarkar, P., Gupta, A., et al. (2018). Petroleum hydrocarbon rich oil refinery sludge of North-East India harbours anaerobic, fermentative, sulfate-reducing, syntrophic and methanogenic microbial populations. *BMC Microbiology*, 18(1), 1-22.

- Saha, S., Basak, B., Hwang, J. H., Salama, E. S., Chatterjee, P. K., & Jeon, B. H. (2020). Microbial symbiosis: a network towards biomethanation. *Trends in Microbiology*, 28(12), 968-984.
- Sander, J., Nowaczyk, M., Buchta, J., Dau, H., Vass, I., Deák, Z., *et al.* (2010). Functional characterization and quantification of the alternative PsbA copies in *Thermosynechococcus elongatus* and their role in photoprotection. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 29851-29856.
- Sang, S., Zhang, X., Dai, H., Hu, B. X., Ou, H., & Sun, L. (2018). Diversity and predictive metabolic pathways of the prokaryotic microbial community along a groundwater salinity gradient of the Pearl River Delta, China. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12, 1-18.
- Sica, Y. V., Quintana, R. D., Radeloff, V. C., & Gavier-Pizarro, G. I. (2016). Wetland loss due to land use change in the Lower Paraná River Delta, Argentina. *Science of the Total Environment*, 568, 967-978.
- Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J. P., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., *et al.* (2017). Phylogenomics of Rhodobacteraceae reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *The ISME Journal*, 11(6), 1483-1499.
- Somerfield, P. J., Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2021). Analysis of similarities (ANOSIM) for 2-way layouts using a generalised ANOSIM statistic, with comparative notes on Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). *Austral Ecology*, 46(6), 911-926.
- Sorokin, D. Y., & McGenety, T. (2019). Methanogens and Methanogenesis in Hypersaline Environments. In *Biogenesis of Hydrocarbons* (pp. 1-24). Springer.
- Thines, M., Aoki, T., Crous, P. W., Hyde, K. D., Lücking, R., Malosso, E., *et al.* (2020). Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *IMA Fungus*, 11(1), 1-5.
- Timmers, P. H., Welte, C. U., Koehorst, J. J., Plugge, C. M., Jetten, M. S., & Stams, A. J. (2017). Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. *Archaea*, 2017.
- Valero-Garcés, B. L., Navas, A., Machin, J., Stevenson, T., & Davis, B. (2000). Responses of a saline lake ecosystem in a semiarid region to irrigation and climate variability: the history of Salada Chiprana, Central Ebro Basin, Spain. *Ambio*, 344-350.

- Vignerón, A., Lovejoy, C., Cruaud, P., Kalenitchenko, D., Culley, A., & Vincent, W. F. (2019). Contrasting winter versus summer microbial communities and metabolic functions in a permafrost thaw lake. *Frontiers in Microbiology*, 1656.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Wang, G., Li, Q., Gao, X., & Wang, X. C. (2018). Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: Performance and associated mechanisms. *Bioresource Technology*, 250, 812-820.
- Wang, H., Chen, F., Zhang, C., Wang, M., & Kan, J. (2021). Estuarine gradients dictate spatiotemporal variations of microbiome networks in the Chesapeake Bay. *Environmental Microbiome*, 16(1), 1-18.
- Watanabe, T., Kimura, M., & Asakawa, S. (2009). Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 276-285.
- Webster, G., O'Sullivan, L. A., Meng, Y., Williams, A. S., Sass, A. M., Watkins, A. J., et al. (2015). Archaeal community diversity and abundance changes along a natural salinity gradient in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(2), 1-18.
- Wei, G., Li, M., Li, F., Li, H., & Gao, Z. (2016). Distinct distribution patterns of prokaryotes between sediment and water in the Yellow River estuary. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9683-9697.
- Wilkins, D., Lu, X. Y., Shen, Z., Chen, J., & Lee, P. K. (2015). Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal 16S rRNA genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 604-613.
- Xun, W., Liu, Y., Li, W., Ren, Y., Xiong, W., Xu, Z., et al. (2021). Specialized metabolic functions of keystone taxa sustain soil microbiome stability. *Microbiome*, 9, 1-15.
- Yang, Y., Chen, J., Tong, T., Xie, S., & Liu, Y. (2020). Influences of eutrophication on methanogenesis pathways and methanogenic microbial community structures in freshwater lakes. *Environmental Pollution*, 260, 114106.
- Yang, J., Jiang, H., Sun, X., Huang, J., Han, M., & Wang, B. (2021). Distinct co-occurrence patterns of prokaryotic community between the waters and sediments in lakes with different salinity. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), fiae234.

Zhao, D., Shen, F., Zeng, J., Huang, R., Yu, Z., & Wu, Q. L. (2016). Network analysis reveals seasonal variation of co-occurrence correlations between Cyanobacteria and other bacterioplankton. *Science of the Total Environment*, 573, 817-825.

Zheng, Y., Zhang, L. M., Zheng, Y. M., Di, H., & He, J. Z. (2008). Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 8, 406-414.

Zhong, Z. P., Liu, Y., Wang, F., Zhou, Y. G., Liu, H. C., & Liu, Z. P. (2015). *Lacimonas salitolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from surface water of a saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_12), 4550-4556.

Zhong, Z. P., Liu, Y., Miao, L. L., Wang, F., Chu, L. M., Wang, J. L., & Liu, Z. P. (2016). Prokaryotic community structure driven by salinity and ionic concentrations in plateau lakes of the Tibetan Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1846-1858.

Zhou, J., Theroux, S. M., Bueno de Mesquita, C. P., Hartman, W. H., Tian, Y., & Tringe, S. G. (2022). Microbial drivers of methane emissions from unrestored industrial salt ponds. *The ISME Journal*, 16(1), 284-295.

Zhu, Y., Purdy, K. J., Eyice, Ö., Shen, L., Harpenslager, S. F., Yvon-Durocher, G., *et al.* (2020). Disproportionate increase in freshwater methane emissions induced by experimental warming. *Nature Climate Change*, 10(7), 685-690.

Zuerner, R. L. (2015). *Leptospira*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-19.

Anexo

Tabla 1. Variables ambientales promedio del agua de todos los humedales considerados en esta tesis. Se han utilizado los datos correspondientes a los ciclos hidrológicos 2016-17 y 2017-18. SD: Desviación estándar. Cond: Conductividad. Chl-*a*: Clorofila-*a*. SST: Sólidos Suspendidos Totales. LOI: Materia Orgánica. DOC: Carbono Orgánico Disuelto. Alc: Alcalinidad. SRP: Ortofosfato Reactivo Soluble.

| Humedal | Cond (mS/cm) | SD | Chl- <i>a</i> (µg/L) | SD | pH | SD | SST (mg/L) | SD | LOI (mg/L) | SD | |
|------------------------|-----------------|-------|-------------------------|-------|-------|------|---------------|--------|---------------|-------|-------|
| No salinas de interior | ALCA | 3,4 | 0,8 | 1,0 | 1,1 | 8,3 | 1,1 | 24,9 | 9,6 | 7,0 | 3,9 |
| | BALD | 2,9 | 0,2 | 6,3 | 5,3 | 7,5 | 0,6 | 4,8 | 2,2 | 2,3 | 1,2 |
| | CAPE | 2,5 | 0,2 | 1,6 | 1,6 | 7,8 | 0,2 | 18,8 | 3,1 | 5,6 | 1,1 |
| | ALFR | 2,7 | 0,1 | 3,7 | 2,8 | 7,5 | 0,1 | 63,3 | 45,6 | 10,6 | 7,7 |
| | ARQU | 0,5 | 0,1 | 1,2 | 1,3 | 8,0 | 0,2 | 10,3 | 8,0 | 1,4 | 1,0 |
| | HERR | 0,6 | 0,4 | 1,6 | 1,9 | 7,6 | 0,4 | 7,8 | 8,2 | 5,1 | 4,6 |
| | MARQ | 0,4 | 0,1 | 0,8 | 0,5 | 7,9 | 0,3 | 2,5 | 1,2 | 1,4 | 0,8 |
| | MUED | 1,1 | 0,4 | 1,4 | 1,0 | 7,8 | 0,4 | 16,5 | 17,3 | 10,9 | 10,5 |
| | BELE | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,9 | 1,1 | 47,6 | 63,2 | 37,1 | 48,8 |
| | CAMP | 0,2 | 0,2 | 5,1 | 5,0 | 6,7 | 1,3 | 10,6 | 15,5 | 8,7 | 13,3 |
| | CARC | 0,3 | 0,1 | 111,5 | 99,6 | 7,2 | 0,6 | 60,0 | 29,3 | 36,3 | 24,7 |
| | CRIS | 0,3 | 0,1 | 3,8 | 3,3 | 7,3 | 0,4 | 8,0 | 5,8 | 5,5 | 5,2 |
| | MONT | 0,2 | 0,1 | 113,3 | 162,5 | 7,4 | 1,4 | 75,2 | 63,1 | 50,9 | 48,4 |
| | NAVA | 0,3 | 0,2 | 1,7 | 2,2 | 8,1 | 0,3 | 7,8 | 4,7 | 3,0 | 1,7 |
| | PALA | 0,2 | 0,2 | 13,2 | 8,2 | 7,0 | 0,9 | 133,0 | 56,1 | 45,2 | 9,7 |
| PRAD | 0,3 | 0,4 | 7,5 | 8,7 | 7,2 | 0,8 | 25,2 | 21,7 | 20,7 | 20,2 | |
| Salinas de interior | ALBA | 3,7 | 1,5 | 0,6 | 0,8 | 10,0 | 0,5 | 12,3 | 14,0 | 6,0 | 7,4 |
| | IGLE | 5,8 | 4,9 | 16,3 | 26,0 | 9,2 | 0,6 | 53,0 | 71,4 | 20,0 | 26,5 |
| | GVIF | 9,9 | 2,5 | 2,5 | 2,8 | 8,4 | 0,4 | 12,9 | 7,3 | 5,4 | 3,4 |
| | HITO | 8,6 | 4,4 | 15,7 | 20,9 | 8,1 | 0,1 | 60,9 | 42,9 | 26,4 | 20,3 |
| | MUSC | 4,0 | 3,0 | 0,7 | 0,9 | 7,5 | 0,1 | 8,9 | 5,4 | 4,8 | 0,1 |
| | CLOG | 35,7 | 20,6 | 1,8 | 2,1 | 8,1 | 0,3 | 49,9 | 57,3 | 13,4 | 13,9 |
| | CSEC | 38,7 | 29,2 | 9,8 | 16,7 | 8,9 | | 76,7 | 60,4 | 15,3 | 10,6 |
| | MANJ | 35,3 | 32,3 | 24,1 | 23,8 | 8,5 | 0,4 | 226,5 | 316,7 | 93,7 | 123,3 |
| | TOLL | 29,0 | 23,0 | 0,3 | 0,2 | 8,4 | 0,7 | 22,9 | 12,4 | 4,2 | 3,1 |
| | ZORR | 35,2 | 51,8 | 3,8 | 4,5 | 8,1 | 0,8 | 172,8 | 173,5 | 31,4 | 31,3 |
| | ALCH | 53,0 | 53,3 | 10,9 | 12,2 | 8,1 | 0,5 | 286,2 | 417,8 | 102,0 | 132,7 |
| | GALL | 123,8 | 155,4 | 14,8 | 14,1 | 8,0 | 1,1 | 629,2 | 1079,6 | 202,0 | 343,9 |
| | SALI | 90,9 | 75,3 | 40,1 | 28,9 | 8,4 | 0,4 | 638,5 | 686,1 | 190,6 | 184,8 |
| TIRE | 93,3 | 99,2 | 6,9 | 4,0 | 8,3 | 0,3 | 1199,8 | 2601,0 | 298,1 | 619,2 | |
| CHIP | 87,0 | 50,7 | 3,3 | 3,3 | 8,3 | 0,3 | 197,8 | 355,4 | 61,4 | 110,7 | |
| Deltaicas | ALFA | 56,6 | 16,7 | 5,0 | 2,5 | 8,1 | 0,3 | 70,3 | 20,5 | 19,0 | 5,2 |
| | ENCA | 31,3 | 21,2 | 22,5 | 20,8 | 8,0 | 0,2 | 61,4 | 40,5 | 22,3 | 16,1 |
| | FBIO | 2,0 | 0,5 | 19,6 | 8,8 | 7,9 | 0,3 | 29,9 | 10,6 | 8,6 | 3,1 |

Tabla 1. (continuación).

| | Humedal | DOC (mg/L) | SD | Alc (meq/L) | SD | SRP (μ M) | SD | NO3 (μ M) | SD | NH4 (μ M) | SD |
|-------------------------------|---------|---------------|-------|----------------|------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| No salinas de interior | ALCA | 17,1 | 10,2 | 1,8 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 129,2 | 231,9 | 7,6 | 11,9 |
| | BALD | 0,6 | 0,4 | 5,6 | 1,4 | 0,3 | 0,3 | 715,3 | 51,3 | 1,5 | 1,6 |
| | CAPE | 20,3 | 8,3 | 4,3 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 22,2 | 10,3 | 2,7 | 1,7 |
| | ALFR | 2,6 | 2,9 | 6,6 | 0,6 | 0,6 | 0,4 | 229,3 | 47,5 | 6,9 | 7,6 |
| | ARQU | 1,7 | 0,4 | 6,4 | 2,0 | 0,8 | 1,5 | 12,5 | 13,2 | 1,4 | 0,2 |
| | HERR | 23,7 | 2,2 | 3,6 | 2,5 | 1,5 | 1,6 | 33,9 | 14,7 | 1,9 | 0,3 |
| | MARQ | 1,7 | 0,4 | 5,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 5,9 | 4,0 | 1,3 | 0,1 |
| | MUED | 17,9 | 11,5 | 7,8 | 0,5 | 2,4 | | 78,1 | 90,0 | 7,1 | 6,8 |
| | BELE | 52,3 | 29,0 | 0,9 | 0,3 | 1,1 | 0,9 | 31,4 | 24,4 | 29,4 | 39,6 |
| | CAMP | 14,5 | 4,8 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,2 | 119,0 | 209,1 | 19,4 | 38,5 |
| | CARC | 18,7 | 5,5 | 1,4 | 0,8 | 1,1 | 0,5 | 98,9 | 178,5 | 2,7 | 2,5 |
| | CRIS | 12,9 | 3,2 | 1,3 | 0,6 | 1,0 | 1,4 | 29,8 | 7,6 | 1,7 | 0,7 |
| | MONT | 24,0 | 5,4 | 0,9 | 0,6 | 6,3 | 9,7 | 197,5 | 258,7 | 3,4 | 3,0 |
| | NAVA | 4,3 | 4,2 | 2,3 | 1,0 | 0,3 | 0,1 | 4,2 | 1,9 | 0,9 | 0,1 |
| | PALA | 25,8 | 12,6 | 0,5 | 0,3 | 4,9 | 5,6 | 53,5 | 69,9 | 3,5 | 2,7 |
| | PRAD | 25,6 | 10,6 | 0,9 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 35,0 | 21,6 | 4,1 | 5,7 |
| Salinas de interior | ALBA | 34,2 | 18,4 | 26,4 | 16,6 | 2,1 | 0,6 | 47,8 | 12,8 | 8,7 | 7,3 |
| | IGLE | 59,4 | 33,9 | 35,6 | 12,0 | 3,2 | 2,2 | 138,1 | 102,9 | 16,0 | 11,6 |
| | GVIF | 19,8 | 7,5 | 3,0 | 0,7 | 0,6 | 1,0 | 52,3 | 31,2 | 12,7 | 10,1 |
| | HITO | 13,0 | 8,3 | 1,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 14,9 | 11,5 | 8,7 | 5,9 |
| | MUSC | 24,0 | 0,8 | 6,2 | | 1,0 | 0,5 | 29,4 | 16,3 | 9,5 | 0,1 |
| | CLOG | 64,8 | 66,5 | 4,8 | 2,0 | 0,3 | 0,3 | 184,3 | 151,3 | 19,4 | 12,0 |
| | CSEC | 21,7 | 24,9 | 6,3 | 2,0 | 1,0 | 1,5 | 88,4 | 53,1 | 96,3 | 121,1 |
| | MANJ | 71,7 | 58,1 | 10,9 | 7,9 | 2,7 | 4,2 | 219,1 | 245,0 | 24,6 | 22,4 |
| | TOLL | 17,0 | 6,8 | 1,7 | 0,8 | 0,2 | 0,1 | 54,7 | 32,5 | 10,0 | 5,8 |
| | ZORR | 63,7 | 85,5 | 4,8 | 4,9 | 0,5 | 0,5 | 183,1 | 257,7 | 17,0 | 22,5 |
| | ALCH | 56,1 | 87,3 | 6,5 | 6,4 | 0,3 | 0,2 | 98,2 | 72,0 | 35,4 | 22,4 |
| | GALL | 158,4 | 159,7 | 8,1 | 5,2 | 0,6 | 0,6 | 499,4 | 444,5 | 105,6 | 123,1 |
| | SALI | 59,3 | 21,1 | 7,6 | 4,3 | 4,4 | 10,2 | 107,6 | 58,9 | 43,1 | 60,9 |
| | TIRE | 47,4 | 52,2 | 9,2 | 11,5 | 4,1 | 5,8 | 65,3 | 42,9 | 25,4 | 20,3 |
| CHIP | 99,9 | 34,5 | 17,1 | 7,4 | 0,6 | 0,5 | 440,0 | 175,8 | 83,3 | 48,1 | |
| Deltaicas | ALFA | 6,1 | 3,5 | 4,0 | 1,8 | 0,3 | 0,3 | 33,7 | 6,1 | 13,3 | 4,7 |
| | ENCA | 6,8 | 2,3 | 4,2 | 2,0 | 0,2 | 0,3 | 26,6 | 8,1 | 19,4 | 12,2 |
| | FBIO | 8,0 | 3,0 | 4,2 | 0,9 | 0,2 | 0,3 | 9,5 | 2,6 | 7,8 | 6,5 |

Tabla 2. Variables ambientales del agua de las lagunas salinas de interior consideradas en esta tesis. LOI: Materia Orgánica. DOC: Carbono Orgánico Disuelto. SRP: Ortofosfato Reactivo Soluble. *: la Laguna de Tírez presentó valores bajos de conductividad porque en el momento del muestreo se encontraba al principio de la fase de llenado.

| Tipo | Laguna | Estación | Profundidad (cm) | Oxígeno (mg·L ⁻¹) | T° (°C) | Conductividad (mS·cm ⁻¹) | pH | Clorofila- <i>a</i> (µg·L ⁻¹) |
|-------------------------|--------|----------------|------------------|-------------------------------|---------|--------------------------------------|-----|---|
| Bicarbonatado-sódicas | ALBA | Otoño-Invierno | 4 | 10,7 | 9,8 | 5,4 | 9,5 | 1,6 |
| | IGLE | Otoño-Invierno | 50 | 17,0 | 5,3 | 8,8 | 9,5 | 45,3 |
| | IGLE | Primavera | 50 | 12,4 | 20,2 | 2,3 | 9,6 | 4,2 |
| | IGLE | Verano | 40 | 14,5 | 26,0 | 13,1 | 9,7 | 19,8 |
| Hiposalinas | GVIF | Otoño-Invierno | 73 | 9,4 | 8,5 | 9,4 | 8,6 | 1,9 |
| | GVIF | Primavera | 103 | 9,2 | 19,2 | 9,2 | 9,1 | 1,7 |
| | GVIF | Verano | 106 | 4,9 | 23,1 | 10,3 | 7,7 | 2,6 |
| | HITO | Otoño-Invierno | 5 | 10,9 | 6,0 | 8,6 | 8,2 | 30,4 |
| | MUSC | Primavera | 8 | 8,1 | 11,6 | 6,2 | 7,4 | 0,2 |
| Mesosalinas | CLOG | Otoño-Invierno | 90 | 6,9 | 5,5 | 30,9 | 8,2 | 1,0 |
| | CLOG | Primavera | 40 | 5,4 | 12,9 | 28,7 | 8,0 | 1,1 |
| | CLOG | Verano | 7 | 9,6 | 29,6 | 27,0 | 8,6 | 7,8 |
| | CSEC | Otoño-Invierno | 10 | 8,8 | 5,5 | 38,7 | 8,2 | 29,1 |
| | MANJ | Otoño-Invierno | 20 | 7,7 | 4,0 | 68,0 | 8,8 | 49,8 |
| | MANJ | Primavera | 4 | 6,6 | 16,2 | 36,7 | 8,4 | 9,5 |
| | MANJ | Verano | 20 | 6,9 | 23,7 | 23,9 | 7,8 | 8,4 |
| | TOLL | Otoño-Invierno | 30 | 9,7 | 16,8 | 35,0 | 7,0 | 0,4 |
| | TOLL | Primavera | 20 | 7,8 | 26,2 | 13,8 | 8,8 | 0,5 |
| | TOLL | Verano | 30 | 8,6 | 13,5 | 68,9 | 8,9 | 0,6 |
| | ZORR | Otoño-Invierno | 15 | 12,5 | 16,5 | 32,8 | 7,0 | 7,8 |
| | ZORR | Primavera | 15 | 10,0 | 19,4 | 12,5 | 8,6 | 12,8 |
| | ZORR | Verano | 15 | 8,2 | 32,9 | 138,9 | 9,2 | 2,7 |
| Hipersalinas temporales | ALCH | Otoño-Invierno | 2 | 7,0 | 6,3 | 190,0 | 8,4 | 7,6 |
| | ALCH | Primavera | 31 | 6,8 | 15,8 | 206,0 | 6,9 | 39,4 |
| | GALL | Otoño-Invierno | 5 | 8,6 | 12,7 | 44,4 | 7,5 | 23,6 |
| | GALL | Primavera | 5 | 5,8 | 25,9 | 350,0 | 7,0 | 29,9 |
| | SALI | Otoño-Invierno | 3 | 7,6 | 16,0 | 37,0 | 8,4 | 73,4 |
| | SALI | Primavera | 2 | 8,4 | 10,4 | 91,5 | 7,8 | 54,5 |
| | TIRE | Otoño-Invierno | 10 | 9,5 | 10,0 | 19,6 | 8,8 | 4,6 |
| Hipersalina permanente | CHIP | Otoño-Invierno | 40 | 16,8 | 24,5 | 158,7 | 8,2 | 9,6 |
| | CHIP | Primavera | 40 | 13,7 | 23,4 | 80,0 | 8,2 | 1,0 |
| | CHIP | Verano | 30 | 11,1 | 29,1 | 46,6 | 7,8 | 3,4 |

Tabla 2. (continuación).

| Tipo | Laguna | Estación | LOI (mg·L ⁻¹) | DOC (mM) | Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | SRP (μM) | NO ₃ (μM) | NH ₄ (μM) | SO ₄ (g·L ⁻¹) |
|--------------------------|--------|----------------|------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Bicarbonato- sódicas | ALBA | Otoño-Invierno | 14,5 | 4,6 | 38,1 | 2,5 | 47,8 | 8,7 | 1,4 |
| | IGLE | Otoño-Invierno | 9,2 | 8,8 | 40,3 | 6,5 | 263,0 | 19,8 | 1,4 |
| | IGLE | Primavera | 19,1 | 5,1 | 43,9 | 3,8 | 136,9 | 34,6 | 0,9 |
| | IGLE | Verano | 65,9 | 6,4 | 40,4 | 3,3 | 216,9 | 11,4 | 2,0 |
| Hiposalinias | GVIF | Otoño-Invierno | 4,5 | 1,4 | 2,5 | 0,3 | 39,9 | 28,8 | 5,7 |
| | GVIF | Primavera | 4,2 | 1,4 | 2,8 | 0,0 | 24,9 | 7,1 | 5,7 |
| | GVIF | Verano | 4,7 | 1,4 | 2,7 | 0,9 | 35,6 | 28,2 | 5,7 |
| | HITO | Otoño-Invierno | 12,0 | 0,6 | 1,6 | 0,2 | 6,8 | 4,5 | 1,4 |
| | MUSC | Primavera | 4,9 | 2,0 | 6,2 | 1,3 | 40,9 | 9,6 | 2,4 |
| Mesosalinias | CLOG | Otoño-Invierno | 8,1 | 2,5 | 3,8 | 0,0 | 84,3 | 4,3 | 8,4 |
| | CLOG | Primavera | 7,7 | 3,2 | 4,1 | 0,5 | 100,6 | 18,2 | 9,0 |
| | CLOG | Verano | 34,0 | 15,3 | 3,4 | 0,2 | 273,8 | 37,2 | 6,5 |
| | CSEC | Otoño-Invierno | 22,8 | 4,1 | 7,7 | 0,1 | 111,4 | 182,0 | 5,3 |
| | MANJ | Otoño-Invierno | 401,4 | 6,8 | 9,7 | 1,1 | 398,1 | 14,1 | 12,4 |
| | MANJ | Primavera | 120,6 | 5,8 | 13,1 | 0,5 | 180,4 | 23,7 | 12,4 |
| | MANJ | Verano | 17,6 | 4,5 | 6,2 | 6,2 | 83,2 | 17,2 | 12,4 |
| | TOLL | Otoño-Invierno | 4,4 | 1,7 | 2,1 | 0,2 | 72,0 | 17,5 | 4,5 |
| | TOLL | Primavera | 1,1 | 0,7 | 2,5 | 0,0 | 31,4 | 9,1 | 4,0 |
| | TOLL | Verano | 6,7 | 2,3 | 2,1 | 0,2 | 106,1 | 9,4 | 6,8 |
| | ZORR | Otoño-Invierno | 75,7 | 5,2 | 4,6 | 0,1 | 176,9 | 6,8 | 10,1 |
| | ZORR | Primavera | 10,6 | 1,9 | 4,6 | 0,1 | 69,5 | 8,3 | 5,9 |
| | ZORR | Verano | 65,9 | 19,5 | 14,1 | 1,4 | 698,4 | 62,4 | 41,1 |
| Hipersalinias temporales | ALCH | Otoño-Invierno | 101,9 | 3,9 | 6,3 | 0,1 | 77,6 | 33,8 | 4,4 |
| | ALCH | Primavera | 502,5 | 27,8 | 19,2 | 0,3 | 294,2 | 39,2 | 4,4 |
| | GALL | Otoño-Invierno | 49,1 | 4,8 | 5,2 | 0,3 | 161,5 | 274,5 | 8,9 |
| | GALL | Primavera | 716,9 | 30,5 | 14,1 | 0,3 | 1003,0 | 119,5 | 38,2 |
| | SALI | Otoño-Invierno | 73,9 | 4,7 | 4,9 | 0,2 | 70,6 | 27,6 | 12,9 |
| | SALI | Primavera | 378,7 | 7,9 | 14,4 | 4,9 | 221,2 | 233,9 | 12,9 |
| | TIRE | Otoño-Invierno | 140,7 | 3,1 | 4,6 | 0,7 | 68,4 | 12,5 | 9,1 |
| Hipersalina permanente | CHIP | Otoño-Invierno | 284,3 | 13,4 | 31,7 | 0,1 | 759,9 | 42,5 | 68,2 |
| | CHIP | Primavera | 4,0 | 5,8 | 13,2 | 0,1 | 443,0 | 136,5 | 35,6 |
| | CHIP | Verano | 52,1 | 6,8 | 13,9 | 0,2 | 283,0 | 145,5 | 33,2 |

Tabla 3. Variables ambientales del sedimento de las lagunas salinas de interior consideradas en esta tesis. LOI: Materia Orgánica.

| Tipo | Laguna | Estación | Conductividad (mS·cm ⁻¹) | pH | LOI (%peso seco) | Carbonato (%peso seco) |
|-------------------------|--------|----------------|--------------------------------------|------|------------------|------------------------|
| Bicarbonatado-sódicas | ALBA | Otoño-Invierno | 7,9 | 9,7 | 14,7 | 12,9 |
| | ALBA | Primavera | 9,9 | 8,8 | 5,6 | 13,6 |
| | ALBA | Verano | 9,7 | 9,8 | 5,7 | 13,4 |
| | IGLE | Otoño-Invierno | 11,0 | 9,7 | 7,2 | 7,5 |
| | IGLE | Primavera | 4,4 | 8,2 | 5,7 | 8,1 |
| | IGLE | Verano | 9,4 | 9,5 | 6,8 | 7,4 |
| Hiposalinas | GVIF | Otoño-Invierno | 24,2 | 7,1 | 14,0 | 4,4 |
| | GVIF | Primavera | 23,1 | 7,1 | 8,5 | 5,4 |
| | GVIF | Verano | 25,4 | 7,2 | 15,0 | 6,4 |
| | HITO | Otoño-Invierno | 10,0 | 7,9 | 15,8 | 1,4 |
| | HITO | Primavera | 36,0 | 8,2 | 18,4 | 2,5 |
| | HITO | Verano | 43,4 | 8,9 | 13,4 | 3,3 |
| | MUSC | Otoño-Invierno | 3,6 | 8,2 | 8,2 | 23,0 |
| | MUSC | Primavera | 5,4 | 7,2 | 3,8 | 23,5 |
| | MUSC | Verano | 9,7 | 7,8 | 7,5 | 21,4 |
| Mesosalinas | CLOG | Otoño-Invierno | 16,8 | 8,3 | 7,7 | 20,6 |
| | CLOG | Primavera | 17,6 | 7,9 | 5,9 | 23,0 |
| | CLOG | Verano | 26,3 | 8,0 | 8,2 | 21,5 |
| | CSEC | Otoño-Invierno | 49,9 | 8,2 | 11,3 | 17,5 |
| | CSEC | Primavera | 315,6 | 8,1 | 11,0 | 17,2 |
| | CSEC | Verano | 87,4 | 8,2 | 12,7 | 17,7 |
| | MANJ | Primavera | 194,9 | 8,6 | 22,1 | 5,6 |
| | MANJ | Verano | 42,7 | 8,5 | 17,3 | 6,1 |
| | TOLL | Otoño-Invierno | 21,3 | 8,6 | 5,5 | 29,1 |
| | TOLL | Primavera | 7,2 | 8,6 | 4,6 | 21,8 |
| | TOLL | Verano | 26,3 | 8,8 | 3,6 | 34,3 |
| | ZORR | Otoño-Invierno | 18,0 | 8,7 | 12,8 | 16,9 |
| | ZORR | Primavera | 34,5 | 8,1 | 4,1 | 28,4 |
| ZORR | Verano | 51,0 | 8,2 | 12,6 | 16,2 | |
| Hipersalinas temporales | ALCH | Otoño-Invierno | 23,7 | 9,1 | 21,3 | 3,7 |
| | ALCH | Primavera | 70,7 | 9,1 | 20,2 | 6,2 |
| | ALCH | Verano | 41,2 | 8,7 | 13,1 | 8,7 |
| | GALL | Otoño-Invierno | 32,1 | 7,1 | 27,3 | 6,9 |
| | GALL | Primavera | 144,4 | 7,7 | 31,8 | 6,3 |
| | GALL | Verano | 256,8 | 8,3 | 25,1 | 9,1 |
| | SALI | Otoño-Invierno | 27,2 | 8,6 | 15,6 | 2,6 |
| | SALI | Primavera | 38,9 | 8,7 | 17,0 | 2,8 |
| | SALI | Verano | 74,0 | 8,6 | 10,7 | 3,1 |
| | TIRE | Otoño-Invierno | 22,3 | 8,5 | 15,2 | 0,5 |
| | TIRE | Primavera | 51,5 | 8,7 | 14,9 | 3,0 |
| TIRE | Verano | 68,6 | 8,4 | 9,6 | 5,4 | |
| Hipersalina permanente | CHIP | Otoño-Invierno | 88,3 | 8,3 | 29,5 | 2,5 |
| | CHIP | Primavera | 44,9 | 7,5 | 24,1 | 6,4 |
| | CHIP | Verano | 58,8 | 7,4 | 14,4 | 7,2 |

Tabla 4. Variables ambientales del agua de las lagunas deltaicas consideradas en esta tesis. TSS: Sólidos Suspendedos Totales. LOI: Materia Orgánica. SRP: ortofosfato reactivo soluble. 1: Invierno. 2: Primavera. 3: Verano.

| | ALFA1 | ALFA2 | ALFA3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Profundidad (cm) | 100 | 100 | 100 |
| Oxígeno (mg·L ⁻¹) | 10,6 | 9,9 | 1,9 |
| Temperatura (°C) | 8,1 | 12,3 | 27,9 |
| Conductividad (mS·cm ⁻¹) | 62,8 | 34,5 | 62,8 |
| pH | 8,2 | 8,3 | 7,7 |
| Clorofila-a (µg·L ⁻¹) | 2 | 4 | 7,7 |
| TSS (mg·L ⁻¹) | 64,7 | 79,8 | 78,8 |
| LOI (%) | 25,9 | 29,5 | 29,2 |
| Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | 3,2 | 3,2 | 4,2 |
| SRP (µM) | 0 | 0,94 | 1,88 |
| Nitrato (µM) | 40,9 | 41,5 | 39,4 |
| Amonio (µM) | 7,6 | 14,9 | 12,7 |
| Sulfato (g·L ⁻¹) | 3,3 | 4 | 3 |

| | ENCA1 | ENCA2 | ENCA3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Profundidad (cm) | 20 | 20 | 15 |
| Oxígeno (mg·L ⁻¹) | 10,9 | 5,2 | 2,9 |
| Temperatura (°C) | 4,3 | 15 | 29,2 |
| Conductividad (mS·cm ⁻¹) | 10,7 | 50,7 | 35 |
| pH | 8 | 8 | 7,9 |
| Clorofila-a (µg·L ⁻¹) | 5,4 | 34,6 | 60,3 |
| TSS (mg·L ⁻¹) | 39,5 | 137,9 | 78,6 |
| LOI (%) | 29,7 | 27,7 | 38,4 |
| Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | 3,8 | 3,8 | 3,9 |
| SRP (µM) | 0,07 | 0,98 | 1,89 |
| Nitrato (µM) | 29,8 | 37,8 | 35,1 |
| Amonio (µM) | 39,5 | 11,6 | 9,4 |
| Sulfato (g·L ⁻¹) | 1,5 | 3,3 | 2,2 |

| | FBIO1 | FBIO2 | FBIO3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| Profundidad (cm) | 50 | 50 | 50 |
| Oxígeno (mg·L ⁻¹) | 11,6 | 6,4 | 4,4 |
| Temperatura (°C) | 5,4 | 14,8 | 28,7 |
| Conductividad (mS·cm ⁻¹) | 2,2 | 2,4 | 1,7 |
| pH | 8,2 | 7,7 | 7,4 |
| Clorofila-a (µg·L ⁻¹) | 25,6 | 23,7 | 36,3 |
| TSS (mg·L ⁻¹) | 18,1 | 36,4 | 42,8 |
| LOI (%) | 40,7 | 26,2 | 28,5 |
| Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | 3,8 | 3,4 | 4 |
| SRP (µM) | 0,01 | 0,33 | 0,65 |
| Nitrato (µM) | 9,2 | 0 | 10,8 |
| Amonio (µM) | 12,4 | 2,1 | 1,9 |
| Sulfato (g·L ⁻¹) | 0,3 | 0,1 | 0,1 |

Tabla 5. Variables ambientales del sedimento de las lagunas deltaicas consideradas en esta tesis. LOI: Materia Orgánica. 1: Invierno. 2: Primavera. 3: Verano.

| | ALFA1 | ALFA2 | ALFA3 |
|--|-------|-------|-------|
| Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 35,2 | 65,7 | 36,4 |
| pH | 8,3 | 7,9 | 7,7 |
| LOI (% peso seco) | 13,9 | 45,9 | 20,6 |
| Carbonato (% peso seco) | 20,3 | 15,9 | 10,4 |

| | ENCA1 | ENCA2 | ENCA3 |
|--|-------|-------|-------|
| Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 19,0 | 54,6 | 35,0 |
| pH | 7,9 | 7,6 | 7,3 |
| LOI (% peso seco) | 15,9 | 32,9 | 28,8 |
| Carbonato (% peso seco) | 21,1 | 15,5 | 14,9 |

| | FBIO1 | FBIO2 | FBIO3 |
|--|-------|-------|-------|
| Conductividad ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 0,9 | 1,8 | 2,3 |
| pH | 8,1 | 7,2 | 7,3 |
| LOI (% peso seco) | 4,1 | 3,5 | 3,2 |
| Carbonato (% peso seco) | 15,8 | 15,5 | 15,9 |

Tabla 6. Variables ambientales del agua de las lagunas no salinas de interior consideradas en esta tesis. LOI: Materia Orgánica. DOC: *Dissolved Organic Carbon*. SRP: ortofosfato reactivo soluble. *: Los valores de conductividad de ALCA fueron más elevados de lo usual al ser el muy seco el ciclo hidrológico durante el que se hicieron los muestreos.

| Tipo | Laguna | Estación | Profundidad (cm) | Oxígeno (mg·L ⁻¹) | T ^a (°C) | Conductividad (mS·cm ⁻¹) | pH | Clorofila-a (µg·L ⁻¹) |
|------------------|-----------|----------------|------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------|------|-----------------------------------|
| Alcalinas | ALCA | Otoño-Invierno | 20 | 13,9 | 18,2 | 30,0 | 8,9 | 2,9 |
| | ALCA | Primavera | 20 | 11,7 | 19,0 | 18,7 | 10,0 | 0,9 |
| | BALD | Otoño-Invierno | 50 | 4,7 | 20,0 | 2,7 | 7,1 | 0,3 |
| | BALD | Primavera | 50 | 7,0 | 20,0 | 3,0 | 6,9 | 12,6 |
| | BALD | Verano | 50 | 4,6 | 20,0 | 2,9 | 7,2 | 11,5 |
| | CAPE | Otoño-Invierno | 40 | 12,1 | 9,6 | 2,3 | 7,9 | 3,3 |
| | CAPE | Primavera | 40 | 13,1 | 18,5 | 2,7 | 8,0 | 0,1 |
| | Fluviales | ALFR | Otoño-Invierno | 50 | 12,5 | 18,2 | 2,9 | 7,5 |
| ALFR | | Primavera | 50 | 13,5 | 23,2 | 2,6 | 7,5 | 1,6 |
| ALFR | | Verano | 50 | 10,2 | 29,1 | 2,5 | 7,6 | 2,0 |
| ARQU | | Otoño-Invierno | 35 | 8,0 | 14,9 | 0,5 | 8,1 | 0,6 |
| ARQU | | Primavera | 35 | 8,2 | 18,0 | 0,4 | 8,1 | 0,6 |
| ARQU | | Verano | 35 | 8,8 | 22,7 | 0,5 | 7,6 | 3,3 |
| HERR | | Otoño-Invierno | 5 | 7,1 | 3,9 | 0,3 | 7,9 | 4,4 |
| HERR | | Primavera | 10 | 3,4 | 8,9 | 0,6 | 7,0 | 0,4 |
| MARQ | | Otoño-Invierno | 20 | 9,5 | 7,8 | 0,2 | 7,9 | 0,6 |
| MARQ | | Primavera | 20 | 8,5 | 12,9 | 0,4 | 8,1 | 1,0 |
| MARQ | | Verano | 20 | 7,3 | 18,0 | 0,4 | 7,3 | 1,5 |
| MUED | | Otoño-Invierno | 55 | 7,0 | 9,0 | 1,3 | 7,5 | 1,6 |
| MUED | | Primavera | 55 | 11,4 | 22,3 | 1,4 | 8,2 | 0,3 |
| Baja alcalinidad | | BELE | Primavera | 15 | 8,4 | 23,2 | 0,1 | 6,1 |
| | CAMP | Otoño-Invierno | 100 | 3,1 | 9,3 | 0,1 | 6,7 | 4,3 |
| | CAMP | Primavera | 55 | 6,2 | 17,6 | 0,3 | 8,6 | 7,0 |
| | CAMP | Verano | 5 | 4,6 | 19,3 | 0,1 | 6,1 | 13,9 |
| | CARC | Otoño-Invierno | 50 | 10,0 | 3,5 | 0,3 | 7,5 | 51,0 |
| | CARC | Primavera | 50 | 7,6 | 23,5 | 0,3 | 6,2 | 152,5 |
| | CARC | Verano | 28 | 15,1 | 30,0 | 0,2 | 7,3 | 297,5 |
| | CRIS | Otoño-Invierno | 40 | 10,3 | 1,7 | 0,2 | 7,4 | 2,0 |
| | CRIS | Primavera | 40 | 3,7 | 12,4 | 0,3 | 6,8 | 0,1 |
| | CRIS | Verano | 40 | 2,2 | 20,8 | 0,3 | 7,3 | 6,2 |
| | MONT | Otoño-Invierno | 30 | 18,8 | 5,0 | 0,2 | 9,3 | 348,9 |
| | MONT | Primavera | 30 | 9,9 | 26,8 | 0,3 | 6,1 | 93,5 |
| | NAVA | Otoño-Invierno | 22 | 8,0 | 5,0 | 0,1 | 8,3 | 1,0 |
| | NAVA | Primavera | 15 | 13,1 | 26,2 | 0,4 | 8,2 | 0,1 |
| | PALA | Otoño-Invierno | 20 | 13,2 | 9,7 | 0,5 | 6,8 | 8,8 |
| | PALA | Primavera | 10 | 12,7 | 31,2 | 0,2 | 6,3 | 8,1 |
| | PRAD | Otoño-Invierno | 26 | 6,5 | 8,9 | 0,2 | 6,8 | 4,4 |
| | PRAD | Primavera | 26 | 3,2 | 14,9 | 0,1 | 8,1 | 22,7 |
| PRAD | Verano | 5 | 3,1 | 16,9 | 0,2 | 6,4 | 3,8 | |

Tabla 6. (continuación).

| Tipo | Laguna | Estación | LOI (mg·L ⁻¹) | DOC (mM) | Alcalinidad (meq·L ⁻¹) | SRP (μM) | NO ₃ (μM) | NH ₄ (μM) | SO ₄ (g·L ⁻¹) |
|-----------|------------------|----------------|------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Alcalinas | ALCA | Otoño-Invierno | 9,8 | 2,9 | 1,5 | 0,4 | 543,0 | 28,4 | 3,3 |
| | ALCA | Primavera | 0,9 | 1,5 | 1,3 | 0,4 | 52,3 | 6,2 | 3,5 |
| | BALD | Otoño-Invierno | 1,5 | 0,0 | 5,5 | 0,2 | 643,0 | 0,2 | 0,1 |
| | BALD | Primavera | 4,5 | 0,1 | 4,8 | 0,1 | 695,3 | 1,2 | 0,3 |
| | BALD | Verano | 3,0 | 0,1 | 4,7 | 0,2 | 715,3 | 1,0 | 0,2 |
| | CAPE | Otoño-Invierno | 6,9 | 2,5 | 6,4 | 0,0 | 21,2 | 4,7 | 1,2 |
| | CAPE | Primavera | 5,1 | 1,5 | 1,2 | 0,1 | 32,9 | 1,6 | 1,4 |
| Fluviales | ALFR | Otoño-Invierno | 11,5 | 0,1 | 7,5 | 0,4 | 271,4 | 4,8 | 0,4 |
| | ALFR | Primavera | 23,9 | 0,1 | 6,5 | 1,3 | 236,3 | 2,1 | 0,4 |
| | ALFR | Verano | 8,3 | 0,7 | 7,0 | 0,3 | 142,1 | 4,0 | 0,4 |
| | ARQU | Otoño-Invierno | 0,7 | 0,1 | 5,6 | 0,0 | 3,7 | 1,2 | <0,1 |
| | ARQU | Primavera | 1,2 | 0,1 | 5,6 | 3,9 | 4,6 | 1,4 | <0,1 |
| | ARQU | Verano | 0,7 | 0,1 | 5,3 | 0,5 | 2,8 | 1,4 | <0,1 |
| | HERR | Otoño-Invierno | 11,1 | 1,9 | 7,0 | 3,8 | 22,5 | 2,1 | 0,1 |
| | HERR | Primavera | 6,3 | 2,2 | 4,2 | 0,1 | 47,7 | 1,7 | <0,1 |
| | MARQ | Otoño-Invierno | 2,5 | 0,1 | 5,3 | 0,0 | 2,5 | 1,2 | <0,1 |
| | MARQ | Primavera | 0,8 | 0,2 | 5,4 | 0,2 | 2,5 | 1,1 | <0,1 |
| | MARQ | Verano | 2,1 | 0,1 | 5,0 | 0,8 | 8,9 | 1,4 | <0,1 |
| | MUED | Otoño-Invierno | 2,2 | 0,8 | 8,2 | 2,4 | 181,8 | 3,4 | <0,1 |
| | MUED | Primavera | 22,5 | 2,6 | 7,4 | 2,4 | 32,0 | 2,9 | <0,1 |
| | Baja alcalinidad | BELE | Primavera | 71,6 | 6,1 | 1,1 | 1,7 | 14,2 | 57,4 |
| CAMP | | Otoño-Invierno | 9,2 | 0,7 | 1,1 | 0,1 | 1,2 | 14,3 | <0,1 |
| CAMP | | Primavera | 3,8 | 0,9 | 1,3 | 0,6 | 10,2 | 1,1 | <0,1 |
| CAMP | | Verano | 35,2 | 1,5 | 0,3 | 0,5 | 32,6 | 1,3 | <0,1 |
| CARC | | Otoño-Invierno | 9,9 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 23,1 | 7,0 | <0,1 |
| CARC | | Primavera | 54,3 | 1,8 | 2,7 | 0,6 | 28,9 | 1,1 | <0,1 |
| CARC | | Verano | 52,0 | 1,5 | 1,3 | 1,5 | 19,1 | 1,2 | <0,1 |
| CRIS | | Otoño-Invierno | 6,2 | 0,8 | 1,1 | 0,1 | 25,5 | 2,8 | <0,1 |
| CRIS | | Primavera | 1,6 | 1,1 | 1,6 | 0,9 | 28,0 | 1,7 | <0,1 |
| CRIS | | Verano | 15,8 | 1,4 | 1,6 | 0,3 | 39,7 | 1,8 | <0,1 |
| MONT | | Otoño-Invierno | 65,2 | 2,1 | 1,5 | 0,2 | 67,4 | 1,0 | <0,1 |
| MONT | | Primavera | 112,6 | 2,6 | 1,1 | 20,8 | 116,3 | 7,1 | <0,1 |
| NAVA | | Otoño-Invierno | 1,8 | 0,1 | 1,2 | 0,3 | 4,0 | 0,9 | <0,1 |
| NAVA | | Primavera | 4,9 | 0,2 | 3,2 | 0,4 | 2,5 | 0,8 | <0,1 |
| PALA | | Otoño-Invierno | 43,6 | 0,9 | 0,2 | 0,2 | 10,5 | 6,5 | <0,1 |
| PALA | | Primavera | 36,3 | 2,6 | 0,7 | 3,4 | 134,1 | 2,2 | <0,1 |
| PRAD | | Otoño-Invierno | 53,5 | 1,3 | 1,1 | 0,0 | 34,5 | 12,7 | <0,1 |
| PRAD | | Primavera | 17,6 | 1,4 | 1,0 | 0,3 | 29,8 | 1,1 | <0,1 |
| PRAD | Verano | 23,1 | 2,6 | 1,1 | 0,4 | 71,4 | 1,3 | <0,1 | |

Tabla 7. Variables ambientales del sedimento de las lagunas no salinas de interior consideradas en esta tesis. LOI: Materia Orgánica. *: Los valores de conductividad de ALCA fueron más elevados de lo usual al ser el muy seco el ciclo hidrológico durante el que se hicieron los muestreos.

| Tipo | Laguna | Estación | Conductividad (mS·cm ⁻¹) | pH | LOI (% peso seco) | Carbonato (% peso seco) | |
|-----------|------------------|----------------|--------------------------------------|-----|-------------------|-------------------------|-----|
| Alcalinas | ALCA | Otoño-Invierno | 38,6 | 7,9 | 18,6 | 34,3 | |
| | ALCA | Primavera | 14,8 | 7,5 | 11,7 | 19,0 | |
| | ALCA | Verano | 68,3 | 7,8 | 18,7 | 17,3 | |
| | BALD | Otoño-Invierno | 2,4 | 7,7 | 20,8 | 10,2 | |
| | BALD | Primavera | 2,0 | 7,2 | 16,8 | 13,6 | |
| | BALD | Verano | 1,9 | 7,4 | 22,5 | 10,9 | |
| | JUDE | Otoño-Invierno | 0,2 | 7,1 | 11,7 | 21,8 | |
| | JUDE | Primavera | 0,2 | 7,1 | 17,5 | 21,0 | |
| | JUDE | Verano | 0,1 | 8,3 | 10,8 | 21,4 | |
| | CAPE | Otoño-Invierno | 5,2 | 7,2 | 13,3 | 31,3 | |
| | CAPE | Primavera | 3,6 | 7,1 | 14,1 | 30,3 | |
| | CAPE | Verano | 3,5 | 7,7 | 14,5 | 30,7 | |
| Fluviales | ALFR | Otoño-Invierno | 2,2 | 7,3 | 13,3 | 20,6 | |
| | ALFR | Primavera | 1,7 | 7,1 | 3,5 | 16,3 | |
| | ALFR | Verano | 1,1 | 7,6 | 5,2 | 15,7 | |
| | ARQU | Otoño-Invierno | 0,7 | 8,1 | 5,8 | 37,6 | |
| | ARQU | Primavera | 1,5 | 8,2 | 4,0 | 39,1 | |
| | ARQU | Verano | 0,7 | 7,7 | 4,0 | 39,3 | |
| | BURG | Otoño-Invierno | 7,3 | 7,6 | 16,1 | 9,4 | |
| | BURG | Primavera | 11,8 | 7,1 | 9,4 | 8,1 | |
| | BURG | Verano | 5,8 | 7,8 | 15,8 | 8,5 | |
| | HERR | Otoño-Invierno | 0,6 | 7,2 | 9,0 | 0,8 | |
| | HERR | Primavera | 0,9 | 6,3 | 20,7 | 0,6 | |
| | HERR | Verano | 1,1 | 6,7 | 18,8 | 0,7 | |
| | MARQ | Otoño-Invierno | 0,4 | 7,2 | 76,6 | 6,3 | |
| | MARQ | Primavera | 0,5 | 6,1 | 84,4 | 3,6 | |
| | MARQ | Verano | 2,2 | 7,0 | 76,5 | 7,8 | |
| | MUED | Otoño-Invierno | 1,0 | 7,9 | 6,0 | 16,7 | |
| | MUED | Primavera | 1,7 | 7,2 | 12,3 | 11,8 | |
| | MUED | Verano | 2,9 | 8,1 | 8,2 | 13,2 | |
| | Baja Alcalinidad | BELE | Otoño-Invierno | 0,1 | 5,0 | 29,6 | 2,3 |
| | | BELE | Primavera | 0,1 | 5,0 | 11,7 | 2,4 |
| BELE | | Verano | 0,5 | 6,1 | 29,4 | 3,0 | |
| CAMP | | Otoño-Invierno | 0,1 | 5,8 | 73,9 | 1,0 | |
| CAMP | | Primavera | 0,3 | 5,1 | 20,9 | 1,7 | |
| CAMP | | Verano | 0,8 | 5,8 | 24,9 | 0,7 | |
| CARC | | Otoño-Invierno | 0,3 | 7,3 | 3,7 | 0,8 | |
| CARC | | Primavera | 0,4 | 6,1 | 3,4 | 1,1 | |
| CARC | | Verano | 0,8 | 6,7 | 4,5 | 0,7 | |
| CRIS | | Otoño-Invierno | 0,3 | 6,3 | 25,2 | 1,0 | |
| CRIS | | Primavera | 0,9 | 5,9 | 48,1 | 0,9 | |
| CRIS | | Verano | 2,0 | 6,2 | 68,4 | 1,5 | |
| MONT | | Otoño-Invierno | 0,1 | 6,6 | 3,0 | 2,5 | |
| MONT | | Primavera | 0,7 | 6,0 | 4,8 | 3,0 | |
| MONT | | Verano | 0,2 | 5,2 | 9,0 | 2,8 | |
| NAVAN | | Otoño-Invierno | 0,8 | 7,1 | 13,9 | 3,0 | |
| NAVAN | | Primavera | 1,0 | 6,1 | 7,3 | 4,3 | |
| NAVAN | | Verano | 1,0 | 7,6 | 42,8 | 2,9 | |
| NAVAS | | Otoño-Invierno | 0,3 | 7,1 | 67,1 | 2,2 | |
| NAVAS | | Primavera | 0,3 | 7,0 | 9,5 | 4,3 | |
| NAVAS | | Verano | 0,9 | 7,0 | 8,9 | 4,4 | |
| PALA | | Otoño-Invierno | 0,1 | 5,6 | 8,3 | 1,5 | |
| PALA | | Primavera | 0,2 | 5,1 | 7,4 | 1,4 | |
| PALA | | Verano | 0,2 | 4,9 | 4,0 | 0,7 | |
| PRAD | | Otoño-Invierno | 0,2 | 6,0 | 26,2 | 2,6 | |
| PRAD | | Primavera | 0,5 | 4,9 | 11,4 | 1,5 | |
| PRAD | | Verano | 0,6 | 5,5 | 16,5 | 1,1 | |
| TALA | | Otoño-Invierno | 3,4 | 7,8 | 17,8 | 4,2 | |
| TALA | | Primavera | 0,4 | 6,1 | 3,2 | 0,6 | |
| TALA | | Verano | 1,5 | 6,7 | 2,5 | 0,5 | |

Programa de doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



ICBiBE

Institut Universitari Cavanilles
de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

Javier Miralles Lorenzo

Tesis doctoral 2023

