

# EL METANO, UN GAS QUE CONTRIBUYE AL CAMBIO CLIMÁTICO, EN EL ESTUARIO DEL RÍO PALMONES

*Sonia Moreno Corrales* / Dep. Ecología y Geología, Fac. de Ciencias, Universidad de Málaga

*F. Xavier Niell Castanera* / Dep. Ecología y Geología, Fac. de Ciencias, Universidad de Málaga

## RESUMEN

El gas metano, que contribuye significativamente al cambio climático, ha aumentado considerablemente en el último siglo. Los sedimentos marinos aportan entre un 1-10% de la emisión total a la atmósfera. En este trabajo se estudia la capacidad de producción de metano en el sedimento del estuario del río Palmones. Los datos revelan que en la actualidad el estuario no contribuye al incremento atmosférico del metano. La ausencia de producción de metano in situ se debe a que temperatura del sedimento es demasiado baja, a la alta concentración de sulfato y salinidad en el sedimento, y a la competencia entre bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras por un mismo sustrato que se encuentra en concentraciones limitantes en el estuario. Si la temperatura del sedimento alcanzara un máximo de 35°C y la concentración de sustrato no fuera limitante, la competencia entre ambos grupos de bacterias sería mínima. En estas condiciones el estuario podría contribuir al cambio climático, produciendo 6 nmol de metano ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Aún así, la capacidad de producción de metano del estuario sería hasta ocho veces inferior a la del río, ya el contenido de sulfato suponen un porcentaje máximo de inhibición de la producción casi del 90%.

**Palabras claves:** estuario del río Palmones, producción de metano, cambio climático

## INTRODUCCIÓN

El metano (CH<sub>4</sub>), constituyente minoritario de la atmósfera, juega un papel importante como gas de efecto invernadero. Se considera el tercer gas de efecto invernadero en importancia después del CO<sub>2</sub> y compuestos CFC<sub>s</sub> (Lelieveld J., *et al.*, 1993; Milich, 1999), contribuyendo aproximadamente al 15% del calentamiento global (Christiansen *and* Cox, 1995). Se produce en ambiente anóxicos durante el proceso de descomposición de la materia orgánica (metanogénesis) por bacterias metanogénicas que pertenecen al reino *Euarchaeota* del dominio *Archaea* (Woese *et al.*, 1990). Estas bacterias se encuentran en ambientes muy diversos como el tracto gastrointestinal de animales e insectos (Zinder, 1993), zonas de humedales, plantaciones de arroz, sedimentos dulceacuícolas y marinos, y marismas, entre otros (Balch *et al.*, 1979; Oremland, 1988; Peters *and* Conrad, 1995; Whitman *et al.*, 1991).

Su concentración en la atmósfera aumenta mucho más rápido que el CO<sub>2</sub> y que otros gases (Cicerone *and* Oremland, 1988). Este aumento, a una tasa del 1% al año, ha hecho que la comunidad científica se centre en identificar y cuantificar las fuentes de emisión y sumideros que son responsables de este aumento global. La mayoría de los artículos científicos consideran que los humedales constituyen la principal fuente de emisión natural a la atmósfera, contribuyendo con una emisión anual de 100-200 Tg, el 30% de la emisión total de metano a la atmósfera.

En la actualidad, los ecosistemas marinos juegan un papel relativamente modesto en el incremento global de metano; se estima que su contribución es tan sólo del 1-10% de la emisión total (Cicerone *and* Oremland, 1988; Bange *et al.*, 1994). Los estuarios son responsables del 7-10% de la emisión total de los océanos, a pesar de representar sólo el 0.4% del área total oceánica (Bange *et al.*, 1994; Upstill-Goddard *et al.*, 2000; Middelburg *et al.*, 2001). El sedimento intermareal y la marisma se revelan como las zonas del estuario donde la actividad puede ser más intensa por los aportes de materia orgánica de las raíces de plantas a profundidades anóxicas (Kelly *et al.*, 1995; Van der Nat *and* Middelburg, 2000).

La producción de metano en sedimentos marinos depende de varios factores tanto de las propiedades fisicoquímicas del sedimento (pH, Eh, concentración O<sub>2</sub>, salinidad, concentración de sulfato, etc.) como de la disponibilidad de sustrato, y la actividad de otros organismos que habitan el sedimento, como es el caso de las bacterias sulfatorreductoras. La actividad metanogénica aumenta con la temperatura, pero se reduce en sedimentos con altas concentraciones de sulfato. En realidad el sulfato no ejerce un efecto inhibitorio sobre las bacterias metanogénicas si no que las bacterias sulfatorreductoras compiten más eficientemente por el mismo sustrato, el hidrógeno y el acetato, en sedimentos con alto contenido en sulfato (Abram *and* Nedwell 1978a,b).

En este trabajo se estudia la producción de metano a varias temperaturas y se evalúan los principales factores que regulan su producción en el estuario del río Palmones (temperatura, disponibilidad de sustrato en el sedimento, competencia entre bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas, y contenido del sedimento en sulfato). El objetivo final es analizar las aportaciones de metano del estuario a la atmósfera y su posible contribución al calentamiento global.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estuario del río Palmones, se localiza en el sur de la península Ibérica (bahía de Algeciras) al final de una pequeña cuenca de 3,75 km<sup>2</sup> de área. Se trata de un sistema eutrófico, poco profundo con movimientos de marea con una amplitud máxima de 2m en los que emerge diariamente una gran superficie de sedimento, y con un rango de salinidad que varía entre 29 y 35 u.s. Toda la cuenca está bajo la influencia de una importante actividad antropogénica que contribuye a la progresiva eutrofización que está teniendo lugar en el estuario desde la última década hasta nuestros días (Clavero *et al.*, 1997). Este hecho conduce a un continuo incremento de la carga de nutrientes tanto en el sedimento como en el agua (Niell *et al.*, 1996; Clavero *et al.*, 1999a,b). Entre las múltiples intervenciones humanas cabe destacar la construcción de la presa de CELUPAL junto al puente de la N-340, que marca el límite del estuario.

El intermareal es la zona del estuario junto al caño que está directamente influenciada por la marea, quedando el sedimento expuesto diariamente a la atmósfera durante la pleamar. Destaca una zona baja de sedimento desnudo, la más próxima al caño, seguida de otra zona en la que las plantas superiores están ausentes pero hay una clara zonación de algas entre las que destacan *Ulva* sp. (*U. olivascens* and *U. dangeardii*), *Rhizoclonium riparium*, y *Enteromorpha* sp. (*E. intestinalis* y *E. prolifera*).

### Muestreo y método analítico

Se eligieron dos zonas de muestreo: una en el estuario (E), en la zona de sedimento desnudo del intermareal, y otra en el río (R), a 3 Km del punto anterior (figura 1). Las muestras del estuario se tomaron en marea baja. En ambos casos se cogieron pequeños cilindros de PVC (7 cm de diámetro y 20 cm de longitud) que se mantienen en el laboratorio a 15°C con un fotoperíodo de 12h luz/oscuridad. Parte de estas muestras se utilizaron para realizar los experimentos de producción de metano y parte para analizar el contenido de materia orgánica, carbono, nitrógeno y azufre total particulado en el sedimento, siempre considerando una única sección de 8 cm de profundidad, atendiendo al máximo bacteriano encontrado en el estuario a 6 cm en estudios anteriores por Clavero *et al.* (1999), y a la actividad máxima de las bacterias metanogénicas en sedimentos marinos a 10 cm (Oremland *et al.* 1982, King *et al.*, 1983, Heyer *et al.*, 1990).

#### *Medidas en el sedimento*

El contenido de materia orgánica se midió como porcentaje de pérdida de peso por ignición a 550°C durante 3h utilizando sedimento que ha sido previamente secado a 60°C.

El carbono, nitrógeno y azufre total particulado del sedimento se determinó con un autoanalizador elemental según el método propuesto por Kristensen and Andersen (1987).



Figura1.- Mapa de la zona de estudio y estaciones de muestreo: sedimento del río y del estuario.

*Producción de metano en el sedimento: efecto de la temperatura, de un inhibidor de las bacterias sulfatorreductoras (molibdato), de un sustrato de las bacterias metanogénicas (acetato), y del contenido del sedimento en sulfato en la tasa de producción de metano*

Se realizaron distintas incubaciones de una mezcla homogénea de sedimento-agua para estudiar: 1) el efecto de la temperatura en la tasa de producción en el sedimento del estuario, 2) la interacción entre las bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas, y la disponibilidad de sustrato in situ en la tasa de producción de metano en el sedimento del estuario y del río según la temperatura de máxima actividad (35°C), y 3) el grado de inhibición de la tasa de producción por efecto del contenido del sedimento en sulfato.

Se introdujeron tres muestras de sedimento de cada zona en una cámara de anaerobiosis bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> que garantiza la ausencia de oxígeno. Las muestras se homogenizaron manualmente y se mezclaron con agua de mar artificial libre de oxígeno (burbujeada previamente con N<sub>2</sub>) en el caso del sedimento del

estuario y en agua bidestilada libre de oxígeno para sedimento del río, en una proporción de 50% peso/volumen. De cada una de las muestras se introducen 30 ml en unos viales de 50 ml previamente burbujeados con N<sub>2</sub> para crear un ambiente anaeróbico, quedando un volumen de aire de 20 ml. Antes de cerrar los viales herméticamente con septos de goma se añaden los distintos tratamientos que se detallan más abajo. Todas las muestras se incuban en agitación y oscuridad durante 72 h a temperatura constante. Finalmente se determina la concentración de metano por su acumulación en el aire de los viales de incubación. Cada 24 h se toman muestras de 1ml del aire acumulado en los viales con una jeringa especial para gases y se analiza con el cromatógrafo de gases HP 6890 (columna propak Q y detector de ionización de llama, FID).

El efecto de la temperatura en el estuario se estudió incubando sedimento de la zona desnuda del intermareal a 15, 25, 30 y 35°C, en presencia de: 1) un inhibidor de las bacterias sulfatorreductoras (20 mM de molibdato sódico, I), 2) un sustrato de las bacterias metanogénicas (20 mM de acetato sódico, S), y 3) una mezcla del inhibidor de las bacterias sulfatorreductoras y del sustrato de las metanogénicas (20 mM molibdato sódico + 20 mM acetato sódico, IS).

Una vez determinada la temperatura óptima de producción de metano se estudió la interacción entre las bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas, y la disponibilidad de sustrato in situ en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario y del río. Este objetivo se llevó a cabo incubando sedimento del estuario y del río a 35°C siguiendo los mismos tratamientos que en el caso anterior. Por último, se estudió el efecto de la concentración de sulfato incubando sedimento del río a 35°C a distintas concentraciones de sulfato sódico: 0.1, 5, 25, 50 y 100 mM).

En todos los casos se realizó un control (C) sin añadir ningún tipo de sustancia al sedimento.

### **Análisis estadístico**

La tasa de producción de metano se calculó usando un análisis de regresión lineal. Se empleó la prueba estadística t-Student ( $P < 0.05$ ) para comprobar los casos en los que la tasa de producción era distinta de cero. Ésta se expresó como nmol de metano por ml de sedimento y hora.

El efecto de los tratamientos (C, I, S y IS), la temperatura (15, 25, 30 y 35°C) y la disponibilidad de sulfato en la tasa de producción de metano se estudió con un análisis de la varianza (ANOVA) según se describe en Sokal y Rohlf (1995) con un nivel de significación del 5%.

## RESULTADOS

### Características del sedimento

El contenido de material orgánica y de azufre total particulado, y la relación C:N del sedimento se muestra en la tabla 1. No se aprecian grandes diferencias entre los dos sedimento, al menos en cuanto al contenido orgánico y la relación C:N se refiere. El contenido orgánico es ligeramente mayor en el estuario que en el río ( $7.6\% \pm 0.04$  y  $5.6\% \pm 0.03$ , respectivamente), y un poco más fácil de degradar, como indica el menor valor de la relación C:N del estuario ( $12.73 \pm 2.05$  y  $13.89 \pm 3.19$ , respectivamente). En ambos casos la materia orgánica del sedimento no llega a considerarse refractaria, al no superar el máximo valor de la relación C:N establecido por Richards (1987) en 20. La gran diferencia radica en el contenido de azufre total particulado del sedimento, llegando a ser 70 veces superior en el estuario.

	% MO	Relación C:N	S (mg g <sub>PS</sub> <sup>-1</sup> )
Estuario	7,6±0,04	12,73±2,05	14,74±4,39
Río	5,59±0,03	13,89±3,19	0,21±0,05

Tabla 1.- Contenido orgánico, relación C:N y azufre total particulado en sedimento del estuario y del río.

### Resultados experimentales

#### *Efecto de la temperatura en la tasa de producción de metano*

En la figura 2 se muestra el efecto de la temperatura en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario con distintos tratamientos (C, control; I, inhibidor de bacterias sulfatorreductoras; S, sustrato de bacterias metanogénicas; I+S, inhibidor de bacterias sulfatorreductoras + sustrato de bacterias metanogénicas). De las temperaturas ensayas (15, 25, 30 y 35°C), a 35°C se obtuvo la máxima producción de metano,  $6 \text{ nmol ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Por debajo de esta temperatura la capacidad de producción de metano es muy baja, casi nula, sin que haya diferencias estadísticamente significativas entre ellas (ANOVA,  $P < 0.05$ ); tan sólo cuando se incuba el sedimento con el inhibidor de bacterias sulfatorreductoras o con la mezcla de inhibidor y sustrato se produce metano, sin llegar a superar  $1 \text{ nmol ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

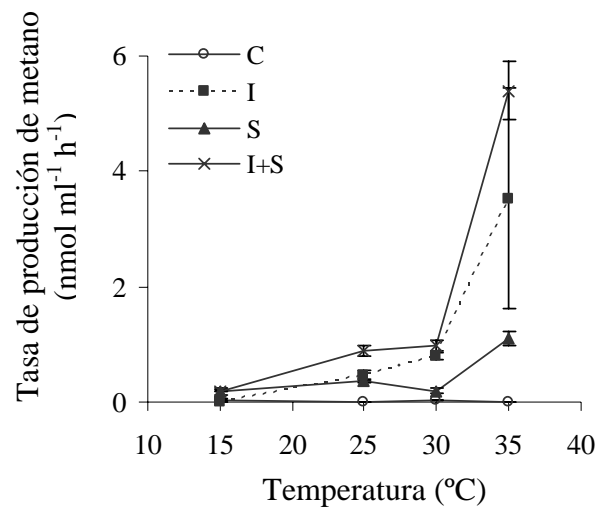


Figura 2.- Efecto de la temperatura en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario (C, control; I, inhibidor de bacterias sulfatorreductoras; S, sustrato de bacterias metanogénicas; I+S, inhibidor de bacterias sulfatorreductoras + sustrato de bacterias metanogénicas).

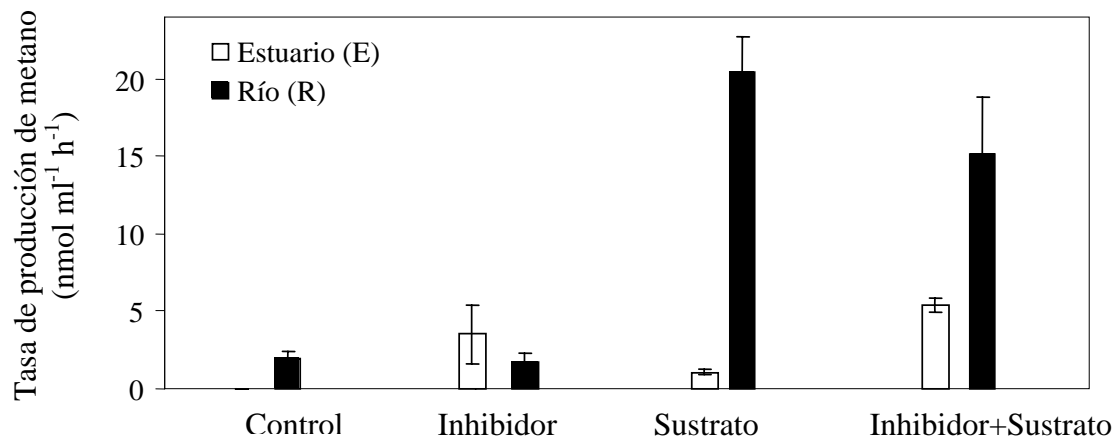


Figura 3.- Efecto de un inhibidor de bacterias sulfatorreductoras y de un sustrato de bacterias metanogénicas en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario y del río a 35°C (E, sedimento del estuario; R, sedimento del río).

*Efecto de un inhibidor de bacterias sulfatorreductoras y de un sustrato de bacterias metanogénicas en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario y del río a 35°C*

El efecto del inhibidor y del sustrato en la tasa de producción de metano en sedimento del estuario y del río a 35°C se muestra en la Figura 3. En general, la tasa de producción de metano fue mayor en el sedimento de río ( $1.94 \pm 0.46$ - $20.49 \pm 2.28$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) que en del estuario ( $0$ - $5.4 \pm 0.5$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), llegando a ser hasta 4 veces superior. Los tratamientos incrementaron la tasa de producción en la mayoría de los casos. En el río la presencia del inhibidor de bacterias sulfatorreductoras no tuvo ningún efecto ( $1.76 \pm 0.54$  en el control y  $1.94 \pm 0.46$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$  con el inhibidor), en cambio, la adición de sustrato aumentó la producción 10 veces. En el estuario no se observó producción en ausencia de tratamiento (control); pero si cuando se añade inhibidor o sustrato. En presencia del inhibidor se obtuvo una producción de  $3.53 \pm 1.91$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ , y con el sustrato algo menor,  $1.09 \pm 0.12$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

*Efecto de concentración de sulfato del sedimento en la tasa de producción de metano*

La figura 4 muestra la producción de metano en sedimento de río frente a concentraciones crecientes de sulfato sódico (0, 0.1, 5, 25, 50 y 100 mM). La tasa de producción en el río, sin adición de sulfato, es de  $23.56 \pm 11.46$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ . La capacidad de producción disminuye hasta 8 veces al aumentar el contenido de sulfato ( $2.99 \pm 0.68$   $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). La figura 5 muestra que a concentraciones muy bajas de sulfato la producción sufre una fuerte inhibición, llegando a inhibirse un 20% tan sólo con la adición de 0.1 mM y más del 50% con la adición de 5 mM de sulfato sódico. A partir de 50 mM la inhibición es casi del 90%.

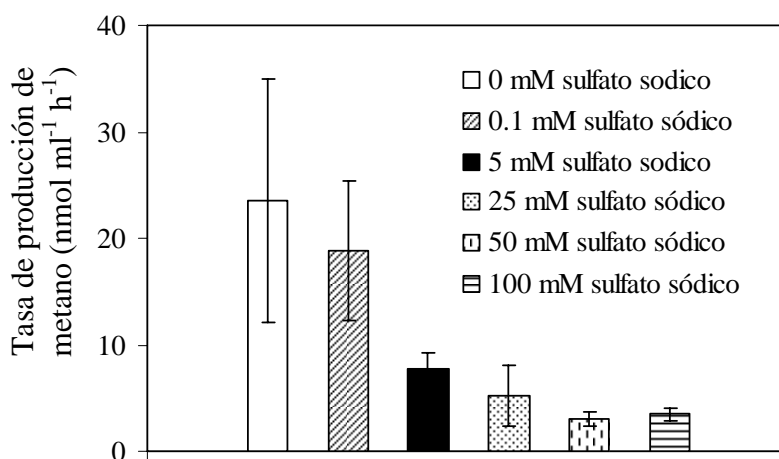


Figura 4.- Efecto del sulfato en la tasa de producción de metano en el sedimento.



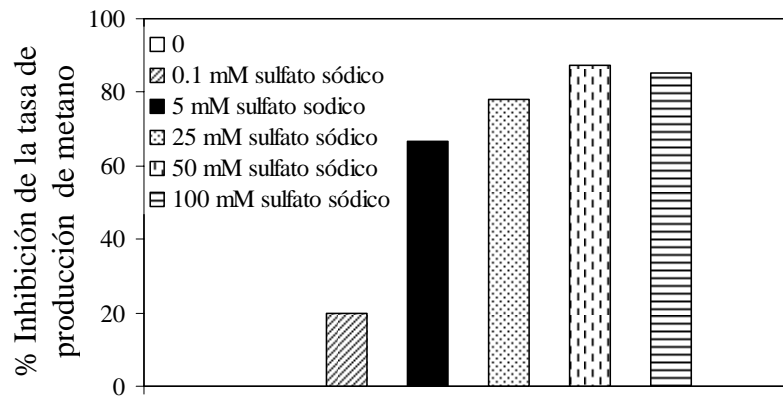


Figura 5.- Porcentaje de inhibición de la tasa de producción de metano en presencia de concentraciones crecientes de sulfato sódico.

## DISCUSIÓN

La formación de metano depende de varios factores entre los que cabe destacar la temperatura del sedimento (Wagner *and* Pfeiffer, 1997; Van der Nat *et al.*, 1998). En este trabajo ha quedado claro que por debajo de 35°C el sedimento del estuario no es capaz de producir metano. Estos resultados están en consonancia con las observaciones realizadas por Le Mer *and* Roger (2001), quienes establecen un rango óptimo entre 30 y 40°C, a pesar de que la formación biológica puede tener lugar en un rango mucho más amplio, entre 9 y 110°C (Stetter, 1992; Huber *et al.*, 1994). La razón de este hecho radica en que a bajas temperaturas disminuye la actividad de bacterias metanogénicas, así como de otros grupos bacterianos que intervienen en este proceso.

En el sedimento del estuario Palmones, la producción de metano fue un orden de magnitud inferior al sedimento del río. La formación de metano se reduce por competencia con otra vía de descomposición de materia orgánica como es la sulfatorreducción (Oremland, 1988). En ambientes marinos, donde la disponibilidad de sulfato es alta, las bacterias sulfatorreductoras compiten más eficientemente que las metanogénicas por los mismos sustratos, acetato y H<sub>2</sub> (Piker *et al.*, 1998; Capone *and* Kiene, 1988), de ahí que varios autores hayan observado que la emisión de metano en zonas marinas sea hasta dos órdenes de magnitud inferior a zonas de agua dulce (Middelburg *et al.*, 1996; Barlett *et al.*, 1987).

En el río Palmones no hay competencia entre bacterias sulfatorreductoras y metanogénicas, así lo indica la ausencia de respuesta en la formación de metano en sedimento del río incubado con un inhibidor de bacterias sulfatorreductoras y el bajo contenido del sedimento en sulfato que caracteriza a los sedimentos fluviales. En cambio, el río podría producir más metano si la concentración de sustrato en estos sedimentos no fuera limitante como muestra el aumento de actividad en las incubaciones con concentración de sustrato saturante.

En el estuario, por el contrario, existe competencia entre ambas rutas metabólicas. El alto contenido del sedimento en sulfato y el poco sustrato disponible, hace que las bacterias sulfatorreductoras sean más eficientes que las metanogénicas; de modo que el poco sustrato que hay en el sedimento es utilizado preferentemente por las bacterias sulfatorreductoras. Por tanto, el contenido del sedimento en sulfato se revela como un factor clave en la formación de metano en el estuario de Palmones. Según las concentraciones medidas en el estuario, entre 2 y 65 mM, la producción de metano sufriría una inhibición superior al 50% comparado con la capacidad de producción del sedimento del río.

Nuestros resultados muestran que el estuario del río Palmones casi no hay producción de metano. Probablemente la temperatura del sedimento del estuario no supere los 35°C más que unos pocos días al año, lo que implica que el estuario en la actualidad no es un lugar idóneo para la formación de metano y que no contribuye a su incremento atmosférico ni al calentamiento global. Ahora bien, si las condiciones cambiasen, no sólo que hubiera un incremento de la temperatura, sino un aumento de la disponibilidad de sustrato, el estuario se revelaría como una importante fuente de producción de metano. Aunque no hay que olvidar, que debido al alto contenido de sulfato en el sedimento, su papel sería modesto comparado con sedimentos dulceacuícolas. La siguiente cuestión que habría que plantearse es cuánto de este metano que se produce llegaría realmente a la atmósfera o por el contrario sería oxidado en el propio sedimento durante su ascenso hacia la superficie.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- ABRAM J.W. y D.B. Nedwell: "Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen". *Archives of Microbiology*, 117, (1978a), pp. 89-92.
- ABRAM J.W. y D.B. Nedwell: "Hydrogen as a substrate for methanogenesis and sulphate reduction in anaerobic salt marsh sediment", *Archives of Microbiology*, 117, (1978b), pp. 93-97.
- BALCH W.E. y otros: "Methanogens: reevaluation of a unique biological group", *Microbiological Reviews*, 43, (1979), pp. 246-273.
- BANGE H.W. y otros: "Methane in the Baltic and North Seas and a reassessment of the marine emissions of methane", *Global Biogeochemical Cycles*, 8, (1994), pp. 465-480.
- BARTLETT K.B. y otros: "Methane emissions along a salt marsh salinity gradient", *Biogeochemistry*, 4, (1987), pp. 183-202.
- CHRISTIANSEN T.R. y P. Cox: "Response of methane emission from arctic tundra to climatic change: results from a model stimulation", *Tellus, Series B*, 47(B), (1995), pp. 301-309.
- CICERONE R.J. y R.S. Oremland: "Biogeochemical aspects of atmospheric methane", *Global Biogeochemical Cycles*, 2, (1988), pp. 299-327.
- CLAVERO V. y otros: "The influence of tidal regimen on phosphate accumulation in a shallow small estuary (Palmones River, Southern Spain)", *Science Marine*, 6, (1997), pp. 59-65.
- HEYER J. y otros: "Methanogenesis in different parts of a brackish water ecosystem", *Limnologica*, 20, (1990), pp. 135-139.
- HUBBER H. y otros: "Search of hypermophilic microorganisms in fluids obtained from the KTB pump test", *Science Drilling*, 4, (1994), pp. 127-129.

- KELLY C.A. y otros: "Methane dynamics across a tidally flooded riverbank margin", *Limnology and Oceanography*, 40, (1995), pp. 1112-1129.
- KING G.M. y otros: "Metabolism of acetate, methanol and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine", *Applied and Environmental Microbiology*, 45, (1983), pp. 1848-1853.
- LE MER J. y P. Roger: "Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review", *European Journal of Soil Biology*, 37, (2001), pp. 25-50.
- LELIEVELD J. y otros: "Climate effects of atmospheric methane", *Chemosphere*, 26, (1993), pp. 739-768.
- MIDDELBURG J.J. y otros: "Organic matter mineralization in intertidal sediments along an estuarine gradient", *Marine Ecology Progress Series*, 132, (1996), pp. 157-168.
- MIDDELBURG J.J. y otros: "Methane distribution in European tidal estuaries", *Biogeochemistry*, 59, (2002), pp. 95-119.
- MILICH L.: "The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused?" *Global Environmental Change*, 9, (1999), pp. 179-201.
- NIELL F.X., y otros: "Spanish Atlantic coasts", in Schramm W. and Nienhuis P.H. (eds) *Marine benthic vegetation*. Springer-Verlag, Berlin, (1996) pp. 265-281.
- OREMLAND R.S. y otros: "Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments", *Nature*, 296, (1982), pp. 143-145.
- OREMLAND R.S.: "Biochemistry of methanogenic bacteria", in Zehnder A.J.B. (ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley, New York, (1988), pp. 641-707.
- PALOMO L., y otros: "Influence of macrophytes on sediment phosphorus accumulation in a eutrophic estuary (Palmones River, Southern Spain)", *Aquatic Botanic*, 80, (2004), pp. 103-113.
- PETERS V. y R. Conrad: "Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soil", *Applied and Environmental Microbiology*, 61, (1995), pp. 1673-1676.
- RICHARDS B.N.: *The microbiology of terrestrial ecosystems*. Logman, New York, (1987).
- SOKAL R.R. y F.J. Rohlf: *Biometry*. Freeman WH and CO, New York, (1995).
- STETTER K.O.: "Life at upper temperature border", in Tran Thanh Van J.K., Mounlou J.C., Schneider C., McKay C. (eds) *Frontiers of Life. Colloque Interdisciplinaire comite national de la recherche scientifique*, Gif-sur-Yvette, France, (1992), pp. 195-219.
- UPSTILL-GODDARD R.C., y otros: "Methane in the southern North Sea: low-salinity inputs, estuarine removal and atmospheric flux", *Global Biogeochemical Cycles*, 14, (2000), pp. 1205-1217.
- VAN DER NAT F.J.W.A y J.J. Middelburg: "Methane emissions from tidal freshwater marshes", *Biogeochemistry*, 49, (2000), pp. 103-121.
- WAGNER D. y E.M. Pfeiffer: "Two temperature optima of methane production in a typical soil of the Elbe river marshland", *FEMS Microbiology Ecology*, 22, (2), (1997), pp. 145-153.
- WHITMAN W.B. y otros: "The methanogenic bacteria", in Balows A, Tuper HG, Dworkin M, HARDER W, SCHLEIFER LH (eds) *The Procarotes*. Springer-Verlag, New York, (1991)
- WOESE C.R. y otros: "Towards to a natural system of organisms. Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucaria*", *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 87, (1990), pp. 44576-44579.
- ZINDER S.H.: "Physiological ecology of methanogens", in Ferry JG (ed) *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York, (1993).