



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA.**

**“Caracterización del ciclo del metano en lagos por espectrometría laser”**

**TESIS**

Que presenta

**OSCAR ALEJANDRO GERARDO NIETO**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directores del proyecto: **Dr. Frédéric Thalasso**

**Dr. Luc Dendooven**

**Ciudad de México**

**DICIEMBRE, 2018**

## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, bajo la codirección del doctor Frédéric Thalasso (CINVESTAV-IPN) y el doctor Luc Dendooven (CINVESTAV-IPN), y la asesoría de los doctores Ricardo Aguilar López (CINVESTAV-IPN), Luis Bernardo Flores Cotera (CINVESTAV-IPN), Mariano Gutiérrez Rojas (UAM-I) y Andrés Mansilla Muños (UMAG).

Durante la realización de este proyecto, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (485051/277238).

**Gracias a mi querida madre.**

# Contenido

Resumen .....	IV
Abstract.....	V
1 Introducción.....	1
1.1 Metano .....	1
1.2 Ciclo del metano en lagos .....	2
1.2.1 Metanogénesis .....	3
1.2.2 Metanotrofia .....	3
1.2.3 Procesos relacionados con el ciclo del CH <sub>4</sub> .....	3
1.2.4 Mecanismos de emisión de CH <sub>4</sub> .....	4
2 Antecedentes.....	6
2.1 Antecedentes directos .....	8
3 Justificación.....	9
4 Objetivos.....	10
4.1 General.....	10
4.2 Objetivos específicos .....	10
5 Material y métodos .....	11
5.1 Descripción de los sitios de estudio.....	11
6 Resultados.....	13
6.1 Medición continua del flux difusivo y ebullitivo de CH <sub>4</sub> en ecosistemas acuáticos con el método de cámara dinámica abierta.....	13
6.1.1 Resumen .....	13
6.1.2 Introducción .....	13
6.1.3 Materiales y métodos .....	16
6.1.4 Resultados y discusión .....	21
6.2 Reporte inicial sobre la dinámica de emisión de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en ecosistemas de agua dulce subantárticos: Estudio estacional de un lago y un reservorio.....	34
6.2.1 Resumen .....	34
6.2.2 Introducción .....	35
6.2.3 Material y métodos.....	36
6.2.4 Resultados y discusión .....	42

6.2.5 Conclusiones .....	58
6.3 Oxidación aerobia de metano en ecosistemas de agua dulce.....	60
6.3.1 Resumen.....	60
6.3.2 Introducción .....	61
6.3.3 Materiales y métodos .....	63
6.3.4 Resultados y discusión .....	67
6.3.5 Conclusiones .....	76
7 Referencias .....	77
Apéndice 1 .....	90
Diagrama de flujo y ecuaciones de balance de masa.....	90
Caracterización de burbujas.....	92
Procesamiento de datos.....	94
Apéndice 2.....	96

## Figuras

Figura 1. Ciclo del metano ( $\text{CH}_4$ ) en lagos.....	2
Figura 2. Componentes principales del ciclo del $\text{CH}_4$ .....	11
Figura 3. Diseño conceptual de la ODC para la medición continua de fluxes. ....	17
Figura 4. Correlación entre el flux difusivo de $\text{CH}_4$ medido con CDC y ODC .....	22
Figura 5. Correlación entre el volumen de $\text{CH}_4$ inyectado como burbujas artificiales y el volumen calculado por la ODC. ....	23
Figura 6. Concentración de $\text{CH}_4$ ( $C_D$ ) observada durante la inyección de 3 burbujas de 2mL ( $\text{CH}_4/\text{CO}_2$ ; 60/40 % vol.) con intervalos de 60, 30, 20, 10 y 5 s. ....	24
Figura 7. Ejemplo de la medición continua por la ODC en el LG. ....	25
Figura 8. Distribución del tamaño de burbuja de $\text{CH}_4$ equivalente ( $\varnothing_{B,\text{CH}_4}$ ).....	27
Figura 9. Porcentaje del flux difusivo y ebulitivo observado en el LG.....	28
Figura 10. Ejemplo de la medición continua por la ODC en el LG. ....	30
Figura 11. Diámetro mínimo de burbuja que puede ser detectado y caracterizado en función del porcentaje de $\text{CH}_4$ y $\text{CO}_2$ que contiene cada burbuja por el método de ODC.....	31
Figura 12. Mapa batimetrico del Lago Hambre y Lago Lynch. ....	44
Figura 13 Transecto de los perfiles de temperatura del Lago Hambre y del Lago Lynch. ..	45
Figura 14 Transecto de los perfiles de DO del Lago Hambre y del Lago Lynch. ....	46
Figura 15 Transecto de los perfiles de $C_{\text{CH}_4}$ del Lago Hambre y del Lago Lynch.....	47
Figura 16 Transecto de los perfiles de $C_{\text{CO}_2}$ del Lago Hambre y del Lago Lynch.....	49
Figura 17 Fluxes de $\text{CH}_4$ del Lago Hambre y del Lago Lynch. ....	51
Figura 18 Fluxes de $\text{CO}_2$ del Lago Hambre y del Lago Lynch. ....	53
Figura 19. Valores de metanotrofia reportados en la literatura con los cinco métodos identificados.. ....	68
Figura 20. Concentración de DO y $C_{\text{CH}_4}$ por encima de la oxiclina.....	71
Figura 21. Comportamiento de la $C_{\text{CH}_4}$ en ensayos de MO en condiciones <i>in situ</i> y potenciales. ....	72
Figura 22. Distribución de $R_{\text{MOR}}$ en lagos. ....	73
Figura 23. Distribución de $R'_{\text{MOR}}$ en lagos.....	74
Figura 24. Balance global del ciclo de $\text{CH}_4$ .....	76
Figura 25. Diagrama de flujo del método de ODC.....	90
Figura 26. Simulación teórica de la concentración observada en la cámara y en el detector UGGA.....	93
Figura 27. Secuencia de procesamiento de datos. ....	95

## Resumen

El Metano ( $\text{CH}_4$ ) es responsable del 25 % de las emisiones totales de gases efecto invernadero a la atmosfera (IPCC, 2013). Los lagos y reservorios, a pesar de sólo cubrir el 3.7% de la superficie continental terrestre (Verpoorter et al., 2014), son responsables de aproximadamente el 16% de las emisiones totales de  $\text{CH}_4$  a la atmosfera (Saunois et al., 2016). En los lagos, el  $\text{CH}_4$  es producido principalmente en los sedimentos anaerobios por arqueas metanogénicas, posteriormente es transportado a través de la columna de agua, donde puede ser oxidado por bacterias metanotróficas (Myrbo 2012). Las emisiones de  $\text{CH}_4$  son el resultado del balance entre ambos procesos (Miller et al 2014), y la metanotrofía el principal componente mitigador de la emisión de  $\text{CH}_4$  de los lagos (Utsumi et al., 1998).

A pesar del gran número de reportes sobre el ciclo del  $\text{CH}_4$  en lagos, la literatura reporta datos fragmentados, obtenidos con una variedad de métodos, generalmente indirectos, resultando en datos poco representativos (Utsumi et al., 1998; Kankaala et al., 2006). Para entender el ciclo del  $\text{CH}_4$  en lagos es necesario cuantificar de forma precisa, extensa, con métodos exactos, por lo menos dos de los tres componentes del ciclo; (1) emisión, (2) metanotrofía y (3) metanogénesis, para de esta forma reducir la incertidumbre que actualmente limita nuestro conocimiento sobre este.

En este trabajo, reportamos el desarrollo de dos métodos; (i) un método de medición continua del flux difusivo y ebullitivo de  $\text{CH}_4$  en ecosistemas acuáticos con un método de cámara dinámica abierta y (ii) un método de medición de la oxidación aerobia de metano en ecosistemas de agua dulce bajo condiciones existentes en el ecosistema. Mostramos que esos métodos permiten mejorar significativamente la exactitud y la precisión en la determinación de las emisiones y de la actividad metanotrófica en lagos, comparado con los métodos tradicionales. Adicionalmente, aplicamos los métodos desarrollados en el estudio de lagos no reportados a la fecha; lagos de la Patagonia chilena.

## Abstract

Methane (CH<sub>4</sub>) is responsible for 25% of the total greenhouse gas emissions to the atmosphere (IPCC, 2013). Lakes and reservoirs, despite covering only 3.7% of the terrestrial continental surface (Verpoorter et al., 2014), are responsible for approximately 16% of the total emissions of CH<sub>4</sub> to the atmosphere (Saunio et al., 2016). In lakes, CH<sub>4</sub> is produced mainly in the anaerobic sediments by methanogenic archaea, and is therefore transported through the water column, where it is subject of aerobic oxidation by methanotrophic bacteria (Myrbo 2012). CH<sub>4</sub> emissions are the result of the balance between both processes (Miller et al 2014), and methanotrophy is the main mitigating component of CH<sub>4</sub> emissions from lakes (Utsumi et al., 1997).

Despite the large number of reports on the CH<sub>4</sub> cycle in lakes, the literature reports only fragmented data, obtained with a variety of methods, generally indirect, resulting in unrepresentative data (Utsumi et al., 1997, Kankaala et al., 2006 ). To understand the CH<sub>4</sub> cycle in lakes, it is necessary to quantify accurately, extensively, with exact methods, at least two of the three components of the cycle; (1) emission, (2) methanotrophy and (3) methanogenesis, to reduce uncertainty that currently limits our knowledge about this cycle.

In this work, we report the development of two methods; (i) a method of continuous measurement of the diffusive and ebullitive flux of CH<sub>4</sub> in aquatic ecosystems with an open dynamic chamber method and (ii) a method of measuring aerobic methane oxidation in freshwater ecosystems under existing conditions in the ecosystem. We show that these methods allow to significantly improve the accuracy and precision in the determination of emissions and methanotrophic activity in lakes, compared with traditional methods. Additionally, we applied the methods developed in the study of lakes not reported to date; Lakes of Chilean Patagonia.



# 1 Introducción

## 1.1 Metano

El metano ( $\text{CH}_4$ ) es un gas incoloro, inodoro y es el principal componente del gas natural. Debido a su fuerza radiativa es un fuerte gas efecto invernadero (GEI). En efecto, el  $\text{CH}_4$  tiene un potencial de calentamiento global, 34 veces superior al del  $\text{CO}_2$  en un horizonte de 100 años (Shindell *et al.*, 2009). A pesar de su baja concentración en la atmosfera (1.8 ppm; <ftp://ftp.cmdl.noaa.gov/ccg/ch4/flask/event/>) y su corto tiempo de vida (alrededor de 12 años), el  $\text{CH}_4$  afecta significativamente el balance energético de la atmosfera. El  $\text{CH}_4$  es el segundo GEI emitido a la atmosfera y representa el 25% del total de las emisiones de GEI.

En general, las fuentes de  $\text{CH}_4$  pueden dividirse en abióticas y bióticas. Las fuentes abióticas incluyen, minería, tratamiento industrial de residuos, combustión de materia orgánica y emisiones volcánicas. Sin embargo, la mayoría del  $\text{CH}_4$  es producido por procesos biológicos (80%), incluyendo emisiones de pantanos, ecosistemas de agua dulce, así como el tracto digestivo de rumiantes y termitas (Schubert *et al.*, 2011).

Globalmente, las fuentes varían con la latitud, es decir, en latitudes altas las emisiones de  $\text{CH}_4$  más importantes incluyen; turberas, extracción de gas natural y sus líneas de transporte, derretimiento de permafrost e hidratos de  $\text{CH}_4$  asociados a este derretimiento. En latitudes medias altamente pobladas las principales fuentes incluyen; la industria de gas y carbón, la agricultura, vertederos y quema de biomasa. En latitudes tropicales la principal fuente de  $\text{CH}_4$  son los pantanos, además de emisiones provenientes de los rumiantes y la quema de biomasa (Nisbet *et al.*, 2014).

## 1.2 Ciclo del metano en lagos

Como se mencionó anteriormente, las principales fuentes de  $\text{CH}_4$  son bióticas. En este sentido, los lagos son ecosistemas complejos donde se llevan a cabo procesos biogeoquímicos de primera importancia en el metabolismo de la biosfera (Duarte *et al.* 2005). A pesar de sólo cubrir el 3.7% de la superficie continental terrestre (Verpoorter *et al.*, 2014), los ecosistemas de agua dulce son responsables de la emisión de aproximadamente  $0.095 \text{ Pg C año}^{-1}$  de  $\text{CH}_4$ , que corresponde al 16% de las emisiones totales de  $\text{CH}_4$  (Saunois *et al.*, 2016), y de  $0.571 \text{ Pg año}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  que representa el 15% de las emisiones de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera (Holgerson y Raymon, 2016).

En lagos, la concentración y emisiones de  $\text{CH}_4$  a la atmósfera, dependen principalmente de dos procesos antagónicos, la producción de  $\text{CH}_4$  (metanogénesis) y la oxidación de  $\text{CH}_4$  (metanotrofia). El balance entre estos procesos determina si un ecosistema específico es fuente o sumidero de  $\text{CH}_4$  (Miller *et al.* 2004). Estos procesos, así como las emisiones de  $\text{CH}_4$  a la atmósfera y los factores que lo afectan, engloban los principales componentes del ciclo del  $\text{CH}_4$ , el cual es muy dinámico y está sujeto a una importante variación espacial y temporal (Wik, *et al.*, 2016).

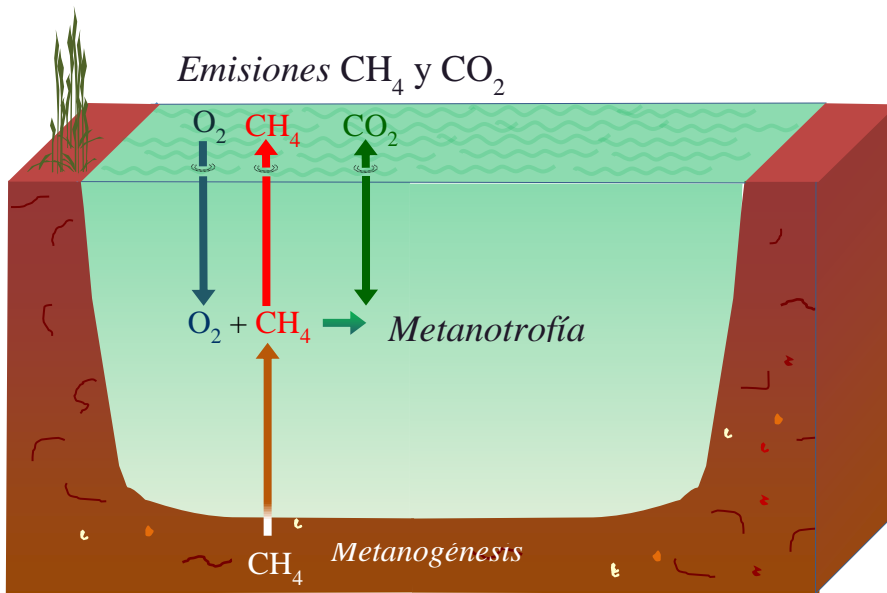


Figura 1. Ciclo del metano ( $\text{CH}_4$ ) en lagos

### 1.2.1 Metanogénesis

La metanogénesis es el proceso terminal más importante en la degradación de materia orgánica en los sedimentos anaerobios de los lagos (Glissmann *et al.*, 2009). En los sedimentos, la materia orgánica es hidrolizada y fermentada, y los productos de la fermentación son convertidos a acetato e hidrogeno ( $H_2$ ), que son los principales sustratos en la metanogénesis (Schubert *et al.*, 2011). La metanogénesis es llevada a cabo por *arqueas* anaerobias estrictas, las cuales son ubicuas en ambientes anaerobios, como la zona anóxica de la columna de agua y los sedimentos, donde la metanogénesis es responsable de entre el 10 y 50% del total de la mineralización del carbón (Bastviken *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Metanotrofía

La metanotrofía en los lagos, juega un papel preponderante. Una vez producido, el  $CH_4$  migra por difusión o ebullición hacia la superficie del lago, y se estima que entre el 30 y 95% del  $CH_4$  total producido en los sedimentos es consumido en la capa oxigenada de la columna de agua. La metanotrofía participa por lo tanto de forma importante en el ciclo global del  $CH_4$ , siendo el principal proceso mitigador de las emisiones de  $CH_4$  en ecosistemas acuáticos (Hrsak *et al.* 1998; Trotsenko y Murrell 2008; Myrbo 2012).

Las bacterias metanotróficas oxidan el  $CH_4$  a  $CO_2$  y agua, con el metanol, formaldehidos y formiatos como intermediarios (Trotsenko y Murrell 2008). A pesar de que existen múltiples rutas metabólicas en este proceso, la metanotrofía anaerobia (MO) es la más importante, en la cual el  $CH_4$  y  $O_2$  son sustratos limitantes (Chi *et al.*, 2015; Bae y Rittmann, 1996; Segers, 1998).

### 1.2.3 Procesos relacionados con el ciclo del $CH_4$

Como se mencionó anteriormente, los lagos son ecosistemas dinámicos donde se llevan a cabo múltiples procesos los cuales interactúan entre sí. El ciclo del  $CH_4$  no es la excepción, ya que interactúa con otros ciclos elementales, principalmente el del oxígeno, y el del nitrógeno. Por ejemplo, la metanogénesis es controlada y afectada por la concentración de oxígeno y de otros aceptores de electrones (ej.  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Fe_3^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ), por la temperatura y por el tipo de materia orgánica. Así, la presencia de formas oxidadas de nitrógeno ( $NO_3^-$ ,

$\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}$ ) actúan como inhibidores de la metanogénesis, favoreciendo a las bacterias desnitrificantes que compiten con la metanogénesis por el sustrato, o por la producción de intermediarios de la desnitrificación ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}$ ) que son tóxicos para el proceso metanogénico (Bodelier y Steenbregh, 2014).

Por otro lado, la metanotrofía es controlada por un amplio número de factores ambientales ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$ , pH, nitrógeno, temperatura, etc.). En este sentido el oxígeno es muy importante para la metanotrofía, ya que el  $\text{O}_2$  es esencial para que se lleve a cabo el proceso (Chi *et al.* 2012; Bodegom *et al.* 2001). El  $\text{O}_2$  en lagos proviene de las capas superiores del lago, ya sea por fotosíntesis o intercambio atmosférico, desde donde migra hacia las capas más profundas del lago, con un gradiente opuesto al del  $\text{CH}_4$ . Consecuentemente la interface oxica/anoxica de la columna de agua es la zona donde se lleva a cabo con mayor intensidad la actividad metanotrófica (Myrbo 2012; Amaral y Knowles 1995; Beal *et al.* 2011; Borrel *et al.* 2011; Granin *et al.* 2013).

#### 1.2.4 Mecanismos de emisión de $\text{CH}_4$

En ecosistemas acuáticos, el  $\text{CH}_4$  producido en los sedimentos puede ser liberado a la atmósfera de diferentes formas, siendo la difusión y ebullición los principales mecanismos en la mayoría de estos ecosistemas (Joyce y Jewell 2003; Bastviken *et al.*, 2004).

El flux difusivo de  $\text{CH}_4$  es el resultado del balance entre el  $\text{CH}_4$  producido en los sedimentos y el  $\text{CH}_4$  oxidado a su paso por la columna de agua, y dependen del gradiente de concentración de  $\text{CH}_4$  entre la capa límite y la atmósfera (Mathews, 2003). Este mecanismo de emisión predomina en lagos poco productivos, templados y profundos (Jannasch, 1975; Strayer y Tiedje, 1978; Molongoski y Klug, 1980; Kelly *et al.*, 1994). A pesar de que este mecanismo de emisión es continuo, en lagos estratificados, el  $\text{CH}_4$  puede ser acumulado en la capa anóxica de la columna de agua y ser liberado en periodos de mezclado (Bastviken *et al.*, 2004; Encinas-Fernández *et al.*, 2014).

Por otro lado, el flux ebulitivo de  $\text{CH}_4$  predomina en ecosistemas someros donde la velocidad producción de  $\text{CH}_4$  es suficientemente alta para formar burbujas en los sedimentos por

separación de las fases (Rudd y Hamilton, 1978; Crill *et al.*, 1988; Devol *et al.*, 1988; Bartlett *et al.*, 1990; Keller y Stallard, 1994). El CH<sub>4</sub> emitido en forma de burbujas, es liberado a la atmosfera casi en su totalidad, debido a que el transporte por burbujas es varios ordenes de magnitud más rápido que el transporte difusivo, por lo que escapa de la oxidación biológica a su paso por la columna de agua (Joyce y Jewell, 2003).

## 2 Antecedentes

Los ecosistemas acuáticos son ecosistemas diversos, complejos y variables, donde los bioprocesos involucrados en el ciclo del CH<sub>4</sub> son sensibles a innumerables factores ambientales. En este sentido, una correcta apreciación de dicho ciclo requiere de técnicas precisas y rápidas, que permitan un gran número de mediciones de los componentes principales del ciclo del CH<sub>4</sub> en un tiempo razonable, estos componentes son:

1. Las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a la atmosfera: Por la importancia de los lagos en el balance global de gases de efecto invernadero (GEI) es importante caracterizar y cuantificar de forma detallada las emisiones de estos gases a la atmosfera.
2. La concentración de CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto en la columna de agua: Conocer la concentración y disposición de estos gases permite delimitar las zonas donde se lleva a cabo cada uno de los procesos involucrados en el ciclo del CH<sub>4</sub>.
3. La velocidad de oxidación y producción de CH<sub>4</sub>: Estos procesos son los principales en el ciclo de CH<sub>4</sub>, por lo que, su cuantificación permite entender la dinámica del CH<sub>4</sub> en los ecosistemas acuáticos.

A pesar de la importancia del ciclo de CH<sub>4</sub> en ecosistemas acuáticos, la magnitud y los mecanismos involucrados en éste siguen siendo parcialmente desconocidos y un esfuerzo adicional es requerido (Conrad, 2009). Al respecto, las técnicas actuales no permiten la realización de mediciones con estas características, las cuales serán descritas a continuación;

Medición de emisiones: Los fluxes difusivos y ebullitivos son medidos por múltiples métodos, y pueden ser clasificados en; (i) cámara flotante, (ii) capa limite, (iii) micrometeorología, y (iv) balance de masa. De entre todos los métodos, la cámara flotante es la más utilizada por su bajo costo y fácil aplicación, así como por ser el mejor método para dilucidar la variación espacial (Duchemin *et al.*, 1998; Hendriks *et al.*, 2010). A pesar de sus ventajas, la cámara flotante implica múltiples problemas, principalmente causados por el concepto mismo de la cámara, que consiste en capturar y medir la acumulación de CH<sub>4</sub> en la cámara. Esa acumulación genera microambientes, cambios en la presión atmosférica y

alteración del equilibrio aire-agua (Matthews *et al.*, 2003). Adicionalmente, el uso de cámaras flotantes requiere un tiempo significativo para cada medición, lo cual limita el número de mediciones que se puedan hacer en un tiempo razonable.

Medición de gases disueltos en agua: Las técnicas actuales se basan en la toma de muestras de agua, su transferencia en viales que contienen un espacio de cabeza de un gas inerte libre del gas que se desea medir ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ), el establecimiento de un equilibrio gas/líquido por agitación a temperatura controlada y la posterior medición de la concentración del gas de interés en el espacio de cabeza por cromatografía o espectrometría (Magen *et al.*, 2014; Sepulveda-Jauregui *et al.*, 2012). Al igual que las técnicas de medición de fluxes, esa técnica es relativamente sencilla, pero tediosa y requiere de largos tiempos de mediciones, limitando el número de mediciones que se pueden realizar para la caracterización de un ecosistema.

Medición de actividad biológica: La determinación se basa usualmente en la realización de ensayos durante los cuales se mide el cambio de la concentración de  $\text{CH}_4$  en un vial con espacio de cabeza enriquecido con  $\text{CH}_4$  y  $\text{O}_2$ . A tiempos regulares, se toma una muestra del espacio de cabeza en la cual se determina la concentración de  $\text{CH}_4$ . Esa estrategia permite determinar la oxidación del  $\text{CH}_4$ , pero cambia de forma importante las condiciones de la muestra, por la adición de  $\text{CH}_4$  y  $\text{O}_2$ , que no corresponde a las condiciones reales del ecosistema del cual proviene.

Otra limitación en el conocimiento sobre el ciclo del  $\text{CH}_4$  es la cobertura geográfica incompleta, en efecto, a pesar de la alta variabilidad de los lagos latitudinalmente (Lehner y Döll, 2004), la literatura reporta principalmente estudios en ecosistemas boreales, templados y tropicales, dejando de lado ecosistemas del hemisferio sur, al mejor de nuestros conocimientos, no se han reportado estudios del ciclo del  $\text{CH}_4$  en ecosistemas australes, específicamente ecosistemas localizados en la región nombrada por Rozzi *et al.* (2012) como ecorregión subantártica magallánica, la cual, es la única región continental localizada entre 45 y 55 °S, es una de las 24 regiones mejor conservadas del mundo (Mittermeier *et al.*, 2003), además de ser caracterizada por tener las lluvias y corrientes más limpias del mundo (Hedin *et al.*, 1995).

## 2.1 Antecedentes directos

Para entender el ciclo del CH<sub>4</sub> existen muchas limitantes, siendo las metodológicas las principales, al respecto, el grupo de trabajo ha desarrollado métodos rápidos, precisos y aplicables en campo, utilizando como plataforma tecnológica la espectrometría láser. Estos métodos son;

1. Medición de la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la columna de agua: El grupo ha desarrollado un nuevo método, basado en espectrometría láser de cavidad integrada (OA-ICOS) que permite determinar *in situ*, la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto en agua, con alta frecuencia (>1 dato/segundo) y alta sensibilidad (p.ej.  $4.4 \times 10^{-9}$  g /L para el CH<sub>4</sub> y  $6.6 \times 10^{-6}$  g /L para el CO<sub>2</sub> ; Gonzalez-Valencia, 2014).
2. Medición de las actividades metanogénicas y metanotróficas: El grupo ha desarrollado un método usando “tunable diode laser absorption spectroscopy” (TDLAS; Martinez-Cruz *et al.* 2012, 2015), que permite determinar la actividad metanogénica y metanotrófica en muestras de aguas. Esa técnica es relativamente sencilla, pero sigue siendo, en el caso de la metanotrofia, basada en la adición de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza, modificando sustancialmente las condiciones de la muestra, no permitiendo la determinación de la actividad metanotrófica en condiciones reales.



### 3 Justificación

Considerando que los lagos son fuentes importantes de GEI, y que el ciclo del CH<sub>4</sub> en estos depende de múltiples factores con una alta variación espacial y temporal (Wik *et al.*, 2016), es importante desarrollar métodos que permitan el estudio del ciclo del CH<sub>4</sub> con una mayor definición espacial y temporal. En particular, técnicas que permitan (i) la caracterización y cuantificación de los mecanismos de emisión de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a la atmósfera y (ii) la cuantificación de la oxidación aerobia de CH<sub>4</sub> en condiciones reales. Además, considerando la cobertura geográfica incompleta de los estudios actuales, es importante estudiar ecosistemas poco o no estudiados, en particular lagos australes, en los cuales el ciclo del CH<sub>4</sub> no ha sido reportado previamente.

## 4 Objetivos

### 4.1 General

Caracterizar el ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos, mediante el desarrollo de métodos que permitan la medición rápida y precisa de los componentes principales del ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos, de forma exhaustiva con una plataforma tecnológica única.

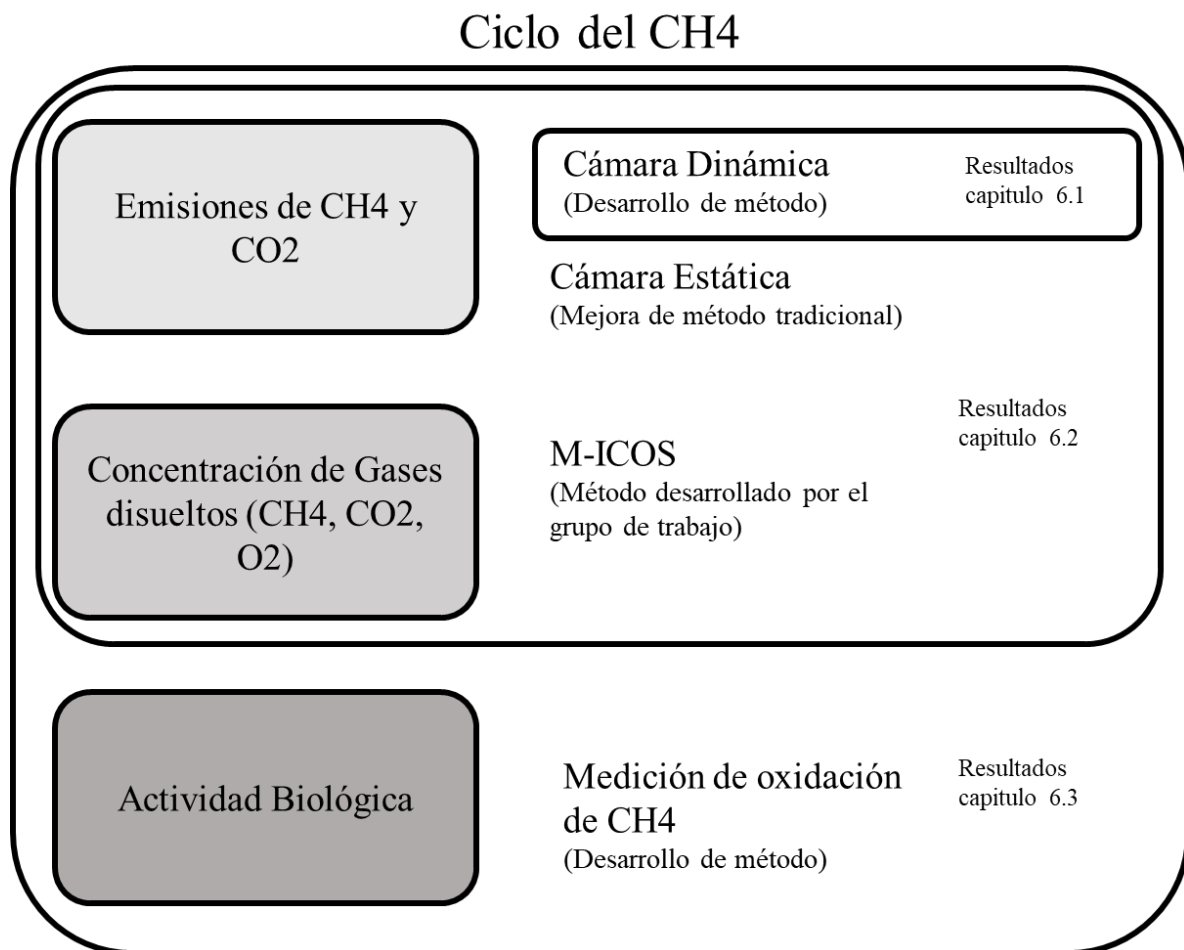
### 4.2 Objetivos específicos

Cada una de las brechas de conocimiento identificadas en el ciclo del CH<sub>4</sub> fueron abordadas de forma independiente, siendo un objetivo específico en este trabajo.

1. Desarrollo de un método de caracterización y cuantificación de la emisión de CH<sub>4</sub> y de CO<sub>2</sub> en lagos, basado en un espectrómetro OA-ICOS.
2. Cuantificación de la oxidación aerobia de CH<sub>4</sub> en condiciones reales, en lagos con características contrastantes, basado en un espectrómetro OA-ICOS.
3. Caracterización de la variación espacial y temporal de las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> con alta resolución espacial en ecosistemas contrastantes, basado en un espectrómetro OA-ICOS.
4. Caracterización del ciclo y las emisiones anuales del CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en ecosistemas no o poco estudiados, basado en un espectrómetro OA-ICOS.

## 5 Material y métodos

En este capítulo se ilustra de forma general la estrategia experimental seguida para poder alcanzar los objetivos particulares de este trabajo, los materiales y métodos serán explicados de forma extensa en cada uno de los capítulos de resultados. La estrategia experimental se basó en el desarrollo y aplicación de métodos que permiten caracterizar los componentes principales del ciclo del CH<sub>4</sub> (emisiones, gases disueltos y velocidad de oxidación de CH<sub>4</sub>).



*Figura 2. Componentes principales del ciclo del CH<sub>4</sub>. Los recuadros representan las etapas en las que se realizaron los experimentos y el capítulo donde se desarrollan de manera extensa.*

### 5.1 Descripción de los sitios de estudio

Se estudiaron diferentes ecosistemas, los cuales se pueden dividir en lagos subantárticos, lagos subtropicales, lagos tropicales, lagos subárticos y árticos, los cuales se enumeran en la Tabla 1.

*Tabla 1. Lagos estudiados, localización geográfica y características batimétricas*

#	Nombre del ecosistema	Clima	Latitud	Longitud	Cámara dinámica	Lagos Australes	Oxidación de CH <sub>4</sub>
1	Hambre	Subantártico	-53.6035	-70.9526			
2	Lynch	Subantártico	-53.1757	-71.0076			
3	Castor	Subantártico	-54.9390	-67.6390			
4	FAK	Subantártico	-54.9314	-67.3317			
5	Llano	Subtropical	19.6577	-99.5069			
6	Guadalupe	Subtropical	19.6319	-99.2577			
7	Killarney	Subártico	64.8700	-147.9010			
8	Nutella	Subártico	63.2150	-147.6780			
9	Otto	Subártico	63.8420	-149.0370			
10	Goldstream	Subártico	64.9160	-147.8470			
11	SIL 1	Ártico	67.5347	86.6358			
12	SIL 2	Ártico	67.5135	86.5915			
13	SIL 3	Ártico	67.5254	86.6163			
14	SIL4	Ártico	67.5243	86.6134			

## 6 Resultados

### 6.1 Medición continua del flux difusivo y ebullitivo de CH<sub>4</sub> en ecosistemas acuáticos con el método de cámara dinámica abierta

**Oscar Gerardo-Nieto**, Abner Vega-Peñaranda, Rodrigo Gonzalez-Valencia, Frederic Thalasso

Artículo sometido en: *Environmental Science and Technology*.

#### 6.1.1 Resumen

Se diseñó, desarrolló y utilizó una cámara dinámica abierta para el monitoreo continuo de fluxes difusivos y ebullitivos de CH<sub>4</sub> en ecosistemas acuáticos. Este método está basado en una cámara flotante estándar donde un flujo bien definido de gas pasa por la cámara, la concentración de CH<sub>4</sub> es medida continuamente en la salida de esta y el flux es calculado a partir de una ecuación de balance de masa. El método fue probado cuidadosamente en laboratorio y posteriormente aplicado en dos lagos con características tróficas contrastantes, a saber, lago de Guadalupe y lago del Llano. El método nos permitió cuantificar de forma continua el flux difusivo de CH<sub>4</sub>, con valores superiores a  $25 \times 10^{-6} \text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , así como la magnitud del flux ebullitivo, y caracterizar las burbujas superiores a 1.5 mm de diámetro. El método también fue aplicado para determinar las emisiones de CO<sub>2</sub>, en cuyo caso el método es menos sensible, pero nos permitió caracterizar fluxes superiores a  $10 \text{mg CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  y burbujas superiores a 5.3 mm de diámetro.

#### 6.1.2 Introducción

La emisión de metano (CH<sub>4</sub>) de los ecosistemas acuáticos es un componente principal del ciclo del carbono, con una emisión anual estimada de alrededor de 95 Tg CH<sub>4</sub> (Saunois *et al.*, 2016). A pesar de esta estimación global, las emisiones globales de CH<sub>4</sub> de los lagos y reservorios se consideran imprecisas (Wik *et al.*, 2016), y su magnitud y variabilidad deben estudiarse más. La incertidumbre actual es causada principalmente por la existencia de los múltiples mecanismos de emisión que pueden ocurrir simultáneamente o por separado, cada

uno de los cuales es altamente variable, tanto en el espacio como en el tiempo (DelSontro *et al.*, 2011; Ortiz-Llorente *et al.*, 2012). En la literatura se identifican cinco mecanismos de emisión de CH<sub>4</sub> a la atmósfera, los cuales son: difusión, ebullición, almacenamiento, almacenamiento de bujas en el hielo y fluxes mediados por plantas (Bastviken *et al.*, 2004; Sepulveda-Jauregui *et al.*, 2015). Entre estos modos de emisión, los fluxes difusivos y ebulitivos son considerados los predominantes (Bastviken *et al.*, 2004; Joyce y Jewell, 2003).

Los fluxes difusivos y ebulitivos se pueden determinar por múltiples métodos, que incluyen: (i) método de cámara flotante, en el que el flux se determina a partir de la acumulación de gas dentro del espacio de cabeza de la cámara; (ii) método de capa límite, que se basa en la determinación del gradiente de concentración en la interfaz agua/atmósfera y en el que el flux se determinan a partir de la primera ley de Fick (Cole y Caraco, 1998); (iii) métodos micrometeorológicos, como la covarianza de Eddy, que se basan en la medición del flux verticales derivado del análisis de series de datos de alta frecuencia de viento y concentración del gas de interés (Eugster y Plüss, 2010); y (iv) métodos de balance de masa, que se basan en una estimación del balance global a escala del ecosistema (Denmead, 2008). Los métodos antes mencionados, han sido comparados y discutidos por Deemer *et al.* (2016). Además de estos métodos, se han sugerido otros para la determinación del flux ebulitivo, incluyendo el uso de embudos invertidos sumergidos (Deshmukh *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2015; Keller y Stallard, 1994), detectores hidroacústicos (DelSontro *et al.*, 2015), detectores ópticos (Delwiche *et al.*, 2015), caracterización por conteo de burbujas atrapadas (Walter-Anthony *et al.*, 2010), detectores de gas montados en botes robóticos (Grinham *et al.*, 2011) y cuantificación de flux remoto hiperespectral (Gålfalk *et al.*, 2017).

Entre estos métodos, la cámara flotante es el método más utilizado porque es un método simple y de bajo costo que se basa en la cuantificación directa del flux total de gas, es decir, flux difusivo y ebulitivo, en un contenedor flotante que se puede adaptar a cualquier detector. Se ha sugerido que es el mejor método para elucidar las variaciones espaciotemporales en la emisión de CH<sub>4</sub> (Duchemin *et al.*, 1998; Hendriks *et al.*, 2010). Según la clasificación de Livingston y Hutchinson (1995), dos técnicas de cámara son las más utilizadas: (i) cámara

de flujo no continuo, también llamada "cámara estática cerrada", que se basan en el muestreo discreto del gas contenido en un cámara para un análisis posterior; y (ii) cámara de flujo continuo no estacionaria, también llamada "cámara dinámica cerrada" (CDC), que se basan en la medición continua del gas contenido en la cámara. En ambos casos, la determinación del flux se obtiene a partir de la pendiente ocasionada por el aumento de la concentración en la cámara flotante a lo largo del tiempo, que va de unos pocos minutos a varias horas, dependiendo de la magnitud del flux y la sensibilidad del detector. Estos métodos de estado no estacionario presentan varios inconvenientes, entre ellos, posiblemente el más importante es el cambio en la presión parcial de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza de la cámara, lo que puede alterar el equilibrio aire/agua (Matthews et al., 2003). Además, estos métodos requieren un tiempo importante de análisis, lo que resulta en un número relativamente reducido de mediciones.

Para solventar estos problemas, Edwards y Sollins, (1973) sugirieron el uso de una cámara en la cual un gas acarreador bien definido fluye continuamente, la concentración del gas de interés se mide continuamente a la salida de la cámara, y el flux se determina a partir de una ecuación de balance de masa. Según la clasificación de Livingston y Hutchinson (1995), este diseño correspondería a una cámara de estado estacionario con flujo continuo, que en lo sucesivo se denominará "cámara dinámica abierta" (ODC). En comparación con las cámaras de estado no estacionario, el concepto de ODC presenta varias ventajas, incluida la no acumulación de gas en la cámara. Además, una ODC acoplada a un detector continuo permite mediciones de flux instantáneo, ya que el flux es función de la derivada de la concentración de gas dentro de la cámara. Esa característica aumenta aún más el potencial interés en el uso de la ODC en lagos, ya que las burbujas pueden detectarse y caracterizarse. Por lo tanto, la ODC puede permitir una fácil segregación entre los fluxes difusivos y ebulitivos y la caracterización de burbujas.

En la literatura la ODC se ha utilizado para la determinación de los fluxes, principalmente en suelo (Edward y Sollins, 1973; Gao y Yates, 1998a,b; Lindberg *et al.*, 2001; Pihlatie *et al.*, 2013; Pumpanen *et al.*, 2004; Verguinelli *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2001; Carpi y Linberg, 1998; Denmead, 1979; Denmead, 2008; Fang y Mocrieff, 1996; Gao *et al.*, 1997; Pape *et al.*,

2009; Reichman y Rolston, 2002; Svensson, 1994), además de en árboles (Breuninger *et al.*, 2012), plantas de tratamiento de aguas residuales (Tabachow *et al.*, 2002) y ríos (Lorke *et al.*, 2015). Sorprendentemente, y hasta donde sabemos, la ODC no se ha utilizado para la determinación de las fluxes de CH<sub>4</sub> en ecosistemas de agua dulce. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la ODC para la determinación de fluxes difusivos y ebullitivos de CH<sub>4</sub> en lagos y reservorios, incluyendo la caracterización de burbujas. Aunque nuestro principal objetivo fue la caracterización de las emisiones de CH<sub>4</sub>, también aplicamos el método ODC para la caracterización de las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

### 6.1.3 Materiales y métodos

#### 6.1.3.1 Cámara dinámica abierta

El diseño conceptual de la ODC se muestra en la Figura 3. Se utilizó un flujo continuo de nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> como gas acarreador. El flujo del gas portador se reguló a 7.72 L min<sup>-1</sup> por un controlador de flujo másico (GFC 17, Aalborg, Dinamarca). El gas acarreador se suministró continuamente en una cámara flotante (polipropileno; volumen, 8.9 L; área en contacto con el agua, 0.11 m<sup>2</sup>), equipada con un ventilador para mantener la homogeneidad del espacio de cabeza en la cámara. La ODC también estaba equipado con espuma de poliestireno para garantizar su flotabilidad, y garantizar que la cámara se sumergiera 1-2 cm para evitar el intercambio con la atmósfera. El gas dentro de la cámara se extrajo utilizando la bomba interna de un analizador de gases de efecto invernadero ultraportátil (UGGA, modelo 915-0011, Los Gatos Research, Inc., California, EE. UU.), donde se determinó la concentración de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y vapor de agua, con una frecuencia de medición de 1 s<sup>-1</sup>. Todas las mangueras utilizadas en el prototipo fueron de poliuretano y tenían 6 mm de diámetro externo (Festo, México). El flujo de gas extraído de la cámara por el UGGA era de aproximadamente 0.52 L min<sup>-1</sup>, siendo inferior al caudal de gas acarreador suministrando a la cámara, por lo tanto, el gas acarreador excedente se evacuó a través de una purga. Esto último permitió mantener la presión dentro del ODC en equilibrio con la atmósfera sin afectar las ecuaciones del balance de masa. Se añadió un puerto de inyección de gas a la línea de gas



acarreador en la entrada (Figura 3, n ° 5) para permitir la inyección de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> con fines de calibración.

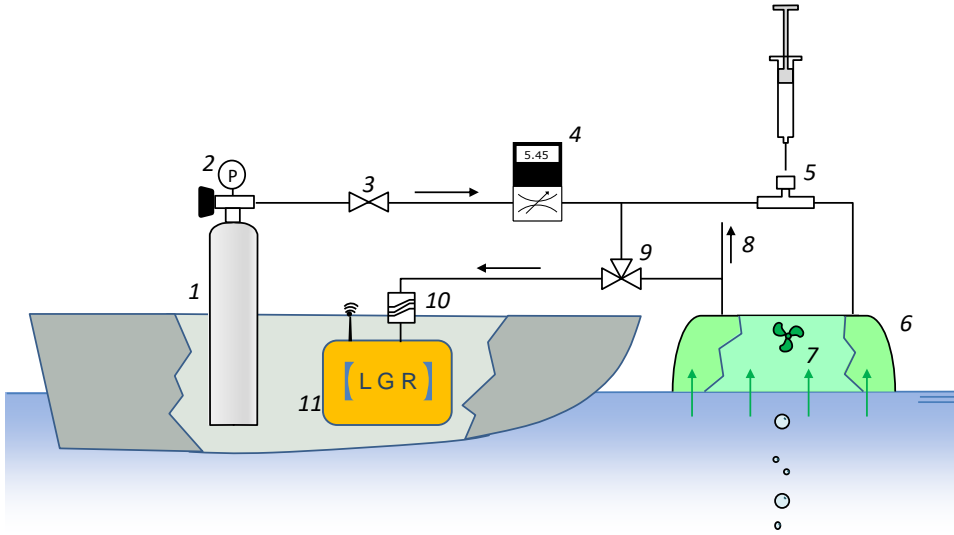


Figura 3. Diseño conceptual de la ODC para la medición continua de fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>: 1. Nitrogeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (gas acarreador); 2. Manorreductor; 3. Válvula controladora de flujo; 4. Controlador de flujo másico; 5. Puerto de inyección (calibración); 6. ODC; 7. Ventilador; 8. Purga; 9. Válvula de tres vías para limpieza del gas en el espacio de cabeza ; 10. Filtro hidrófobo; 11. Analizador de gas efecto invernadero ultraportátil (UGGA).

### 6.1.3.2 Balance de masa y medición de flux instantáneo

El diagrama de flujo del método ODC y las ecuaciones de balance de masa se muestran en el Apéndice 1. Establecimos que el flux se puede determinar a partir de la Ecuación 1:

$$F = \left( \frac{d(\theta_D \frac{dC_D}{dt} + C_D)}{dt} + \frac{\theta_D \frac{dC_D}{dt} + C_D - C_0}{\theta_{ODC}} \right) \cdot \frac{V_{ODC}}{A_{ODC}}, \quad (1)$$

donde  $F$  es el flux instantáneo ( $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ );  $C_D$  es la concentración medida por el UGGA ( $\text{g m}^{-3}$ );  $C_0$  es la concentración del gas acarreador ( $\text{g m}^{-3}$ ; 0 en nuestro caso);  $\theta_{ODC}$  y  $\theta_D$  son los tiempos de residencia neumaticos en el ODC y la cavidad del UGGA, respectivamente;  $V_{ODC}$  es el volumen del espacio de cabeza de la ODC ( $\text{m}^3$ ); y  $A_{ODC}$  es el área del ODC en contacto con el ecosistema acuático ( $\text{m}^2$ ).

Debido a que la ecuación 1 contiene una doble derivada, es extremadamente sensible al ruido. En este sentido el UGGA se caracteriza por una alta relación señal/ruido (SNR;  $1,520 \pm 415$ ; Gonzales-Valencia *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de la alta SNR, fue necesario suavizar los datos para reducir la ruido durante las determinaciones de flujo instantáneo. Se optó por un suavizado ponderado doble de  $C_D$  ( $C'_{D,t}$ ;  $C''_{D,t}$ ), descrito por las Ecuaciones 2 y 3, respectivamente:

$$C'_{D,t} = 0.1 \cdot C_{D,t-2} + 0.2 \cdot C_{D,t-1} + 0.4 \cdot C_{D,t} + 0.2 \cdot C_{D,t+1} + 0.1 \cdot C_{D,t+2} \quad (2)$$

$$C''_{D,t} = 0.1 \cdot C'_{D,t-2} + 0.2 \cdot C'_{D,t-1} + 0.4 \cdot C'_{D,t} + 0.2 \cdot C'_{D,t+1} + 0.1 \cdot C'_{D,t+2}, \quad (3)$$

Como se describirá en la sección Resultados, después del suavizado de datos del flux, determinamos con éxito el flux difusivo instantáneo y el flux total con las Ecuaciones 1-3.

#### 6.1.3.3 Caracterización de burbujas

La caracterización de las burbujas, es decir, el volumen de burbuja ( $V_B$ ), basado en las mediciones de flux instantáneo, estaba sujeta a un error relativamente importante, especialmente cuando se producían dos eventos ebullitivos en un corto período de tiempo. Para evitar estos errores, optamos por una estrategia basada en el aumento abrupto de  $C_D$  después de cada evento ebullitivo (descrito en detalle en el Apéndice 1). Primero, observamos experimentalmente que el aumento en  $C_D$  ( $\Delta C_D$ ) fue proporcional al aumento en  $C_{ODC}$  ( $\Delta C_{ODC}$ ), causado por la captura de una burbuja en la ODC, que se describe mediante la Ecuación 4:

$$\Delta C_{ODC} = \alpha \cdot \Delta C_D, \quad (4)$$

donde  $\alpha$  es una constante de proporcionalidad.

Por lo tanto, la masa de CH<sub>4</sub> contenida en la burbuja ( $M_{B, CH_4}$ ) se determinó mediante la Ecuación 5:

$$M_{B,CH_4} = \Delta C_{ODC,CH_4} \cdot V_{ODC} \quad (5)$$

Posteriormente, determinamos el volumen de CH<sub>4</sub> contenido en cada burbuja ( $V_{B, CH_4}$ ) y un diámetro equivalente ( $\phi_{B, CH_4}$ ) de acuerdo con la ley de los gases ideales (Ec. 6 y 7):

$$V_{B,CH_4} = \left( \frac{M_{B,CH_4}}{16} \right) \cdot V_M \quad (6)$$

$$\phi_{B,CH_4} = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{3}{4} \cdot \frac{V_{B,CH_4}}{\pi}}, \quad (7)$$

donde  $V_M$  es el volumen molar del CH<sub>4</sub>.

#### 6.1.3.4 Operación y calibración ODC

Observamos que la ODC se mezcló por completo y, por lo tanto,  $\theta_{ODC}$  se determinó a partir de la velocidad de flujo del gas portador y el volumen de ODC. Por el contrario, observamos que la cavidad UGGA no siguió un comportamiento perfectamente agitado, por lo que la determinación de  $\theta_D$  requirió una calibración. Esto se hizo aplicando un incremento escalonado en la concentración de CH<sub>4</sub> a la entrada del UGGA (descrito en el Apéndice 1). De manera similar, la constante de proporcionalidad  $\alpha$  (Ec. 4) también requirió calibración, que se realizó inyectando un volumen conocido de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> estándar a través del puerto no. 5 (Figura 3). Una vez calibrado, el método de medición fue el siguiente: (i) la ODC se colocó en la superficie del agua, (ii) se requirieron alrededor de 30 s para obtener lecturas UGGA

estables, y (iii) la medición se mantuvo hasta obtener resultados significativos, típicamente superior a 10 min.

#### 6.1.3.5 Pruebas de laboratorio y campo

Las pruebas de laboratorio del método ODC se realizaron utilizando un contenedor de plástico de 120 L en el que se disolvieron diferentes concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, mediante el burbujeo de una mezcla estándar de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> (60/40% vol.) con agitación moderada durante un tiempo arbitrario. Las pruebas de laboratorio incluyeron la calibración de  $\theta_D$  y  $\alpha$ , la medición de los fluxes difusivos y su comparación con los fluxes medidos con la CDC estándar y la caracterización de las burbujas modelo.

El método ODC fue implementado en dos reservorios contrastantes: Lago "Guadalupe" (LG; 19.6274, -99.2686), que es un reservorio altamente contaminado con grandes fluxes difusivos y ebullitivos, y Lago "Llano" (LL; 19.6552, -99.5086), que es un reservorio poco contaminado, meso-oligotrófico, donde el flux difusivo era predominante. Estos ecosistemas han sido descritos previamente por el grupo de trabajo (Gonzales-Valencia *et al.*, 2014a; b). El método ODC se implementó en 18 lugares en el LG y en 6 en el LL, todos estos lugares con características batimétricas diferentes, a saber, distancia de la costa y profundidad de la columna de agua. En las regiones de estos lagos donde no se observó flux ebullitivo, los fluxes difusivos se midieron con la ODC y se compararon con las mediciones realizadas con la CDC estándar.

#### 6.1.3.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo para comparar las diferencias significativas entre los resultados. La normalidad se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) y las diferencias significativas entre las variables se determinaron mediante la prueba de

comparación U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Todos los análisis estadísticos y las regresiones lineales se realizaron con el software R (2018).

## 6.1.4 Resultados y discusión

### 6.1.4.1 Prueba de laboratorio

Primero, se estableció el tiempo de residencia del UGGA ( $\theta_D$ ), mediante el incremento escalonado de la concentración de  $\text{CH}_4$  en la cámara, obteniendo como resultado  $\theta_D = 11.11 \pm 0.79$  s, que es aproximadamente un 85% más alto que el  $\theta_D$  que se observaría en una cavidad perfectamente mezclada. En más de 3 meses de los experimentos el  $\theta_D$  no cambió significativamente. Posteriormente, se midieron fluxes difusivos con la ODC en el laboratorio (Figura 4A) y se compararon con los fluxes determinados con la CDC. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue superior a 0.98. Cuando se compararon los fluxes obtenidos mediante ODC y CDC, la diferencia de medias entre los dos métodos fue del  $4.0\% \pm 1.8\%$ . Durante las mediciones, ambos métodos dieron una SNR similares, es decir,  $3,400 \pm 950$ . Esta SNR fue mayor que la observada previamente en un modelo UGGA similar pero más viejo (es decir,  $1,520 \pm 415$ ; González-Valencia *et al.*, 2014). La correlación observada entre los fluxes medidos por CDC y ODC sugiere la similitud de los resultados obtenidos en ambos métodos, aunado a que el método de ODC permite mediciones continuas de fluxes y evita la acumulación de  $\text{CH}_4$  dentro del espacio de cabeza de la cámara.

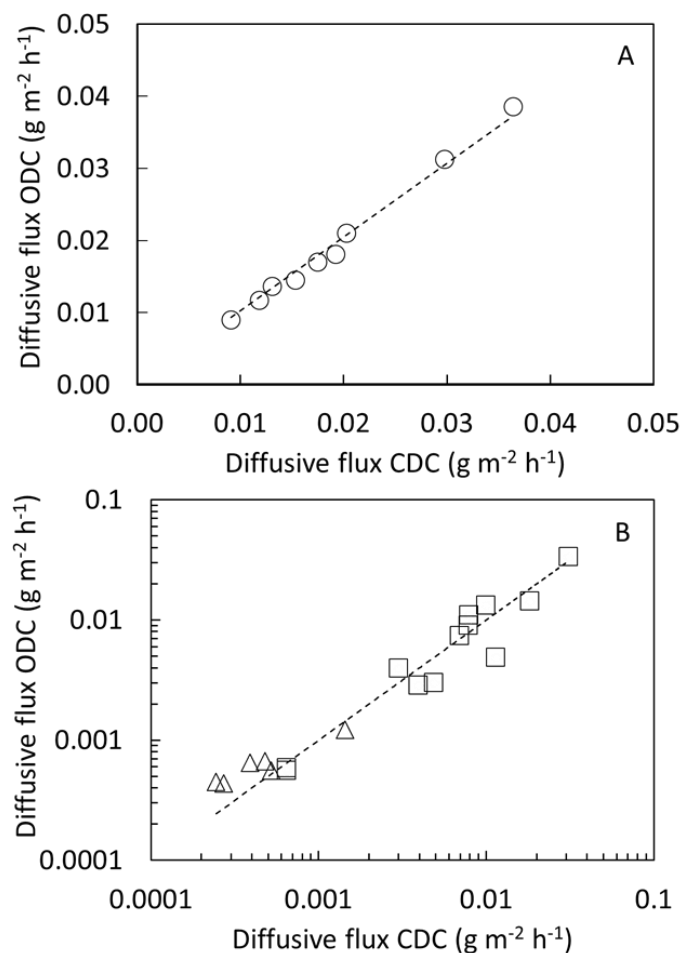


Figura 4. Correlación entre el flux difusivo de CH<sub>4</sub> medido con CDC y ODC, durante las pruebas en laboratorio (A) y en el desarrollo en el campo (B; □, LG; Δ, LL).

La ODC se probó para la caracterización de burbujas. Primero, antes de la caracterización de la burbuja, tanto en el laboratorio como en el campo, se determinó  $\alpha$  (Ecuación 4, Sección S2) inyectando volúmenes de 0.05-5 ml de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> (60/40% en volumen) en el puerto no. 5 (Figura 3). El parámetro  $\alpha$  para CH<sub>4</sub> fue notablemente estable, con un valor medio de  $2.026 \pm 0.033$ , sin diferencias significativas entre los diferentes volúmenes inyectados. Después de la calibración, las burbujas se crearon artificialmente en un rango de 0.05-5 mL (CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub>; 60/40% vol.), que corresponden a 2.3-10.6 mm de diámetro. La Figura 5 muestra la correlación observada entre el volumen de CH<sub>4</sub> inyectado y el volumen determinado mediante el método ODC. El valor de R<sup>2</sup> fue superior a 0.99, lo que confirma que el método

ODC permite la detección y caracterización de burbujas. A continuación, para probar la capacidad del método ODC para discriminar eventos ebullitivos sucesivos en un corto período de tiempo, inyectamos burbujas de 2 ml ( $\text{CH}_4 / \text{CO}_2$ ; 60/40% en vol.) con un intervalo de 5, 10, 20, 30 y 60 s. La Figura 6 presenta la  $C_D$  observada durante esta prueba, donde se muestra que, en todos los casos, excepto por el intervalo de tiempo de 5 s, las burbujas fueron discriminables. Combinando todas las pruebas de eventos ebullitivos sucesivos, encontramos que el error medio en la determinación del volumen de burbujas fue de  $4.4\% \pm 7.6\%$ , sin diferencias significativa entre cada prueba. Estos resultados indican que hay un tiempo mínimo, que llamamos tiempo mínimo de discriminación ( $M_{Dt}$ ), debajo del cual dos eventos ebullitivos no pueden ser discriminados, que en nuestro caso fue de 10s. Sin embargo, como se discutirá en la siguiente sección, este  $M_{Dt}$  puede reducirse sustancialmente.

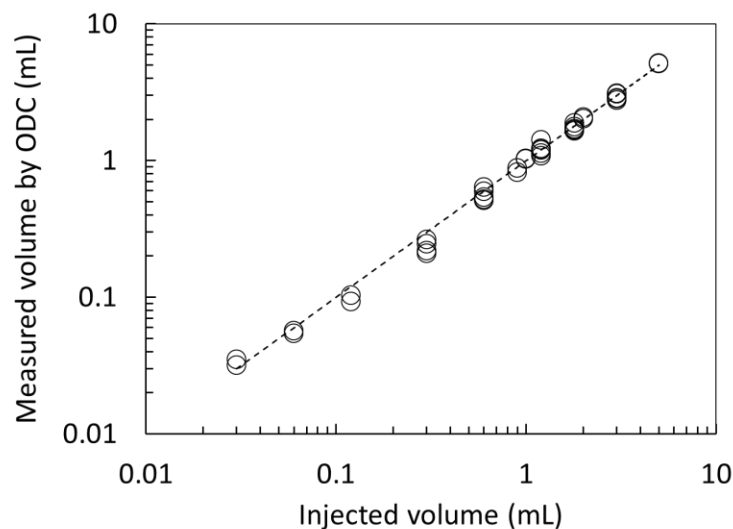


Figura 5. Correlación entre el volumen de  $\text{CH}_4$  inyectado como burbujas artificiales y el volumen calculado por la ODC.

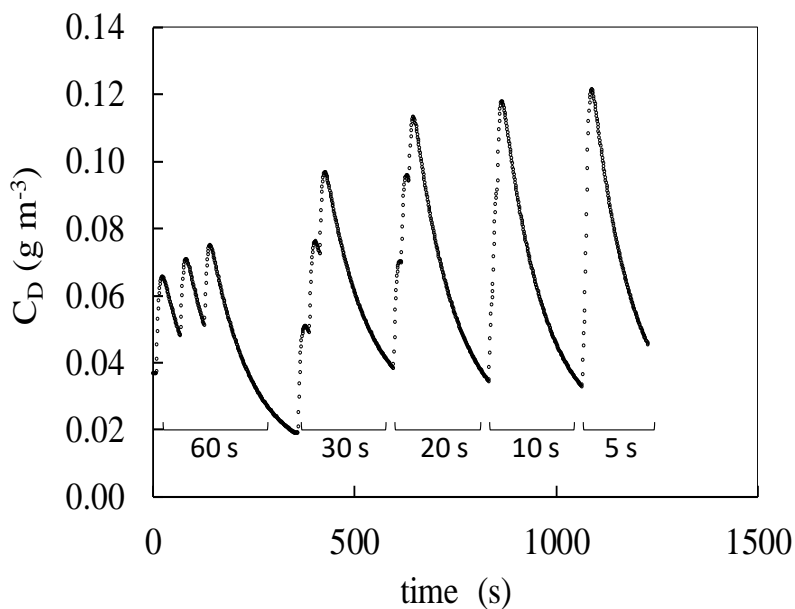


Figura 6. Concentración de  $CH_4$  ( $C_D$ ) observada durante la inyección de 3 burbujas de 2mL ( $CH_4/CO_2$ ; 60/40 % vol.) con intervalos de 60, 30, 20, 10 y 5 s.

#### 6.1.4.2 Implementación de campo

El ODC se implementó en dos reservorios. En ambos, se seleccionó primero una región sin ebullición aparente y se midió el flux difusivo con el CDC estándar y el ODC (Figura 4B). Una comparación entre los dos métodos dio un valor de  $R^2$  superior a 0.99, confirmando así la similitud entre los dos métodos, como se observó previamente en el laboratorio. Durante el desarrollo en campo, observamos que, en comparación con lo que se observó en el laboratorio, la SNR disminuyó significativamente a  $1,153 \pm 379$ , lo que es una indicación del ruido de fondo en el campo. En la Figura 7 se muestra un ejemplo de la medición de fluxes en LG, combinando fluxes difusivos y ebulitivos, y el procesamiento de datos. Se debe recordar que, tal como se describe en la sección materiales y métodos, los fluxes obtenidos después del doble suavizado (Fig. 7C) solo se usaron para determinar el flux difusivo y el total, mientras que las características de la burbuja se determinaron mediante otro conjunto de ecuaciones (Ec. 4-7). Durante las pruebas de campo, observamos que los datos de flux sin suavizado (Fig. 7B) presentaban, en algunos casos, un doble pico, como se ilustra en el detalle de la figura 7A y B. En este ejemplo ilustrado, la separación temporal entre cada pico era 5s



(más corto que el  $M_{Dt}$  de 10 s determinado en las pruebas de laboratorio), y, en algunos otros casos, se detectaron picos dobles con un tiempo de separación tan corto como 2s. Por lo tanto, la interpretación de los datos de flux sin suavizar se puede considerar como una herramienta para detectar eventos ebullitivos, con mayor capacidad que la observación de aumentos abruptos en  $C_D$  (Figura 27, Apéndice 1). Sin embargo, el UGGA utilizado en el presente trabajo tiene una frecuencia de medición de  $1 \text{ s}^{-1}$ , lo que hace que los  $M_{Dt}$  cortos (menores de 5 s) sean inciertos. Por lo tanto, durante nuestra implementación en el campo, utilizamos los datos de flux bruto para identificar eventos ebullitivos, pero discriminamos las burbujas solo cuando el tiempo de separación fue superior a 5 s.

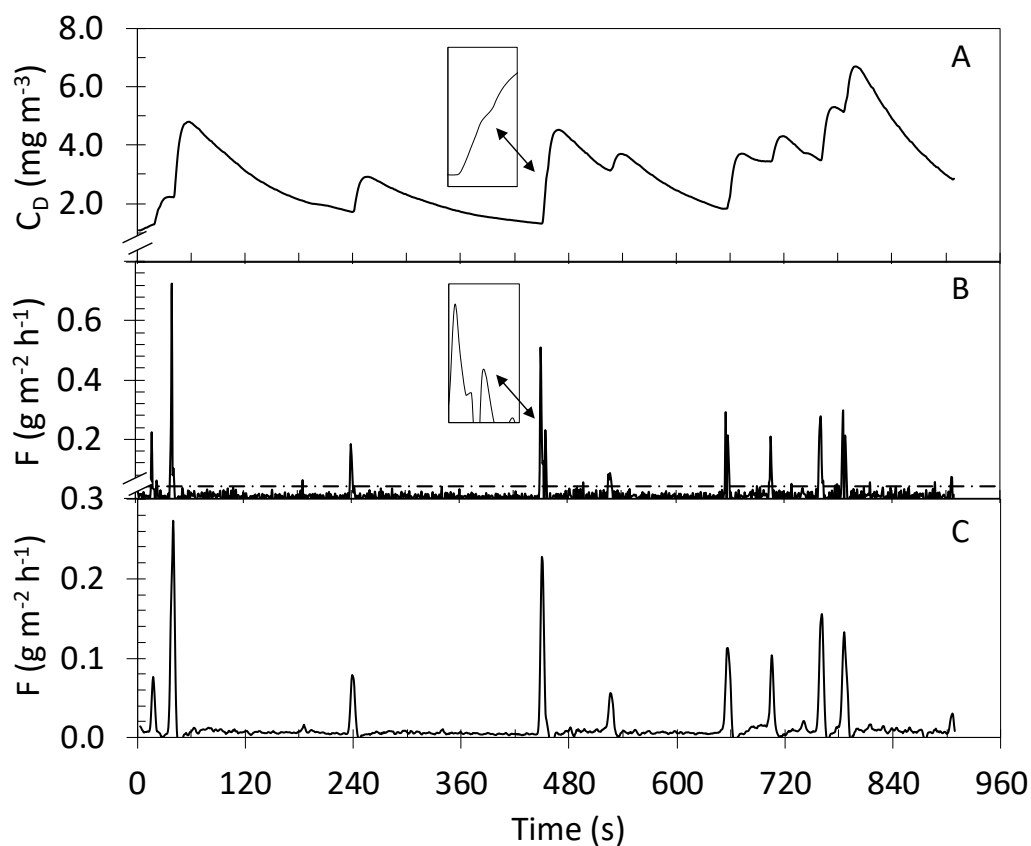


Figura 7. Ejemplo de la medición continua por la ODC en el LG: A.  $C_D$  sin tratamiento; B. flux sin filtrar (Ec. 1); C. Flux con doble suavizado (Ec. 2 y 3). El detalle en A y B muestran un acercamiento de la detección de doble pico. Nota: La diferencia de la escala en A y B es causado por el suavizado de los datos.

Definimos una altura mínima de pico, más alta que el ruido de fondo, para identificarla como un evento ebullitivo. Seleccionamos arbitrariamente un flux instantáneo de  $0.04 \text{ g de CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  como índice de corte (que se muestra en la Figura 7B). Bajo las condiciones experimentales, este flux de corte correspondió a burbujas que contenían  $1.6 \times 10^{-3} \text{ mL}$  de  $\text{CH}_4$ . Suponiendo que las burbujas contienen 60-90% de  $\text{CH}_4$  (DelSontro *et al.*, 2011; Mattson y Likens, 1990; Mattson y Anderson, 2013), este flux de corte corresponde a burbujas de 1.50-1.72 mm de diámetro, que pueden considerarse como el límite de detección de nuestro método, en su configuración actual, y que está por debajo del rango de diámetros de burbuja reportados previamente en lagos, es decir, 2.6-11.4 mm (DelSontro *et al.*, 2015; Delwilche *et al.*, 2015; Ostrovsky *et al.*, 2008). Con respecto al límite inferior de detección de flux difusivo, el uso de nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$ , así como la alta sensibilidad de la UGGA (informada por el fabricante por debajo de 10 ppb) hace que el método de ODC sea muy sensible. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, teóricamente estimamos que el flux difusivo mínimo detectable de  $\text{CH}_4$  es de aproximadamente  $25 \times 10^{-6} \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , que está por debajo del 98% del flux difusivo promedio reportado en 393 lagos por Bastviken *et al.* (2011) y que también se encuentra dentro de los fluxes más bajos de 224 lagos boreales reportados por Rasilo *et al.* (2015).

Durante 12 h de despliegue en campo, observamos 233 eventos ebullitivos, principalmente en LG (se detectó el 98% de todas las burbujas). A partir de estas observaciones, determinamos la frecuencia de burbuja específica ( $f_B$ ), que es el número de burbujas detectadas por unidad de tiempo y área (Ec. 8):

$$f_B = \frac{n_B}{t \cdot A_{ODC}}, \quad (8)$$

donde  $n_B$  es el número de burbujas detectadas en un tiempo  $t$ .

En el LG, un reservorio hipereutrófico, observamos eventos ebullitivos en todos los puntos de muestreo y, en consecuencia, observamos  $f_B$  que van desde 25.0 a 919  $\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , con una media de 346  $\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ . Por el contrario, en el LL, observamos solo dos eventos ebullitivos, que correspondieron a un  $f_B$  medio de 10.0  $\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ , aunque inciertos ya que solo observamos dos burbujas. La Figura 8 muestra la distribución estadística de los diámetros de burbuja equivalentes ( $\varnothing_{B,CH_4}$ ). En el LG,  $\varnothing_{B,CH_4}$  varió de 1.5 a 34.5 mm, no distribuidos normalmente ( $p > 0.05$ ), con un diámetro geométrico promedio de 8.16 mm. Esta gama de diámetros de burbuja es significativamente más amplia que la gama de diámetros de burbuja informados previamente en lagos, es decir, 2.6-11.4 mm (Ostrosky *et al.*, 2008; Delwilche *et al.*, 2015; DelSontro *et al.*, 2014).

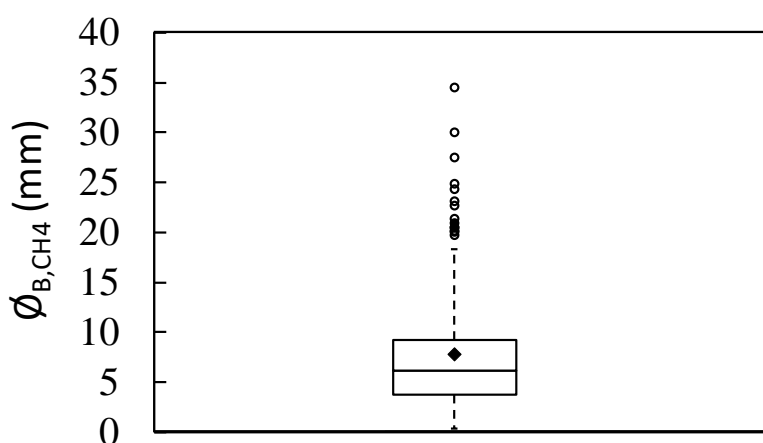


Figura 8. Distribución del tamaño de burbuja de  $\text{CH}_4$  equivalente ( $\varnothing_{B,CH_4}$ ). La caja muestra el primer segundo y tercer cuartil, el promedio está representado por el diamante ( $\blacklozenge$ ), y los bigotes son el mínimo y máximo, mientras que los valores atípicos (círculos) fueron los que cayeron fuera de 1.5 veces el rango intercuartil (IQR), i. e. límite inferior =  $Q_1 * 1.5 \text{ IQR}$ , y límite superior =  $Q_3 * 1.5 \text{ IQR}$ .

Las burbujas más grandes detectadas plantearon una pregunta importante sobre la capacidad del método ODC para segregar burbujas cuando se capturan varias en poco tiempo. Un análisis estadístico del  $\varnothing_{B,CH_4}$  mostró la ausencia de valores atípicos inferiores y un número

relativamente grande de valores atípicos superiores (Figura 8), lo que sugiere que al menos algunas de las burbujas más grandes detectadas fueron en realidad varias burbujas más pequeñas identificadas como una sola burbuja. En el presente trabajo, consideramos un  $M_{Dt}$  de 5 s, lo que significa que no discriminamos entre dos eventos ebullitivos que ocurren en menos de 5s. La capacidad de segregación del método ODC puede mejorarse significativamente utilizando un detector de alta frecuencia, ya que algunos detectores comerciales tienen una frecuencia  $\geq 10$  Hz. Una segunda opción es ajustar el área de contacto de la ODC para reducir la probabilidad de eventos ebullitivos simultáneos mientras se captura una cantidad significativa de burbujas.

En promedio, observamos en el LG un flux total que varía de 2.5 a 649.7 mg CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, con una media de 147.8 mg m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. De este flux total, entre 39.0% y 96.5% fue causado por ebullición. Consecuentemente a lo reportado por Natchimuthu *et al.* (2016), observamos que la ebullición fue más importante en las regiones litorales del lago (Figura 9). En el LL, el flux total varió de 0.4 a 2.9 mg CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, con una media de 1.1 mg CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Dado que solo se observaron dos eventos ebullitivos, el porcentaje de ebullición en el flux total se estimó en un 14%, que no fue estadísticamente significativo.

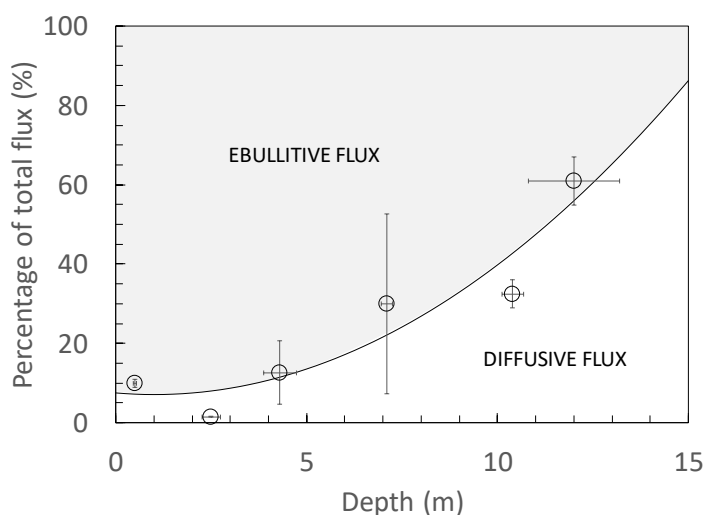


Figura 9. Porcentaje del flux difusivo y ebullitivo observado en el LG en función de la profundidad de la columna de agua.

#### 6.1.4.3 ODC para fluxes de CO<sub>2</sub>

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de nuestro trabajo fue evaluar el interés potencial en la ODC para la determinación de fluxes difusivos y ebullitivos de CH<sub>4</sub> en lagos. Dado que nuestro UGGA detectó tanto CH<sub>4</sub> como CO<sub>2</sub>, también caracterizamos los fluxes de CO<sub>2</sub> por el método ODC. Primero, como se hizo previamente para CH<sub>4</sub> (Figuras 4 y 5), probamos el método ODC en el laboratorio, para fluxes difusivos y para la caracterización de burbujas. Los resultados (no mostrados) fueron similares a los observados con CH<sub>4</sub> (en ambos casos  $R^2 > 0,96$ ). Sin embargo, durante el despliegue de campo, observamos señales más ruidosas desde el UGGA, que se cuantificaron a través de una SNR de  $343 \pm 82$ , que fue significativamente menor que la observada con CH<sub>4</sub>. En LG, la correlación entre los fluxes difusivos medidos con la CDC estándar y la ODC fue significativa ( $R^2$  de 0.92); en LL, sin embargo, se observaron resultados erráticos. Sin lugar a dudas, la falla del método en LL fue causada por la sensibilidad relativamente baja de UGGA al CO<sub>2</sub> (informado por el fabricante para ser de 1 ppm). El flux difusivo de CO<sub>2</sub> promedio en LG y LL, medido con el CDC estándar, fue de  $70.9 \pm 26$  y  $3.0 \pm 2.5$  mg m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos fluxes de CO<sub>2</sub> correspondieron a un C<sub>D</sub> de  $28.3 \pm 10.4$  y  $1.21 \pm 1.00$  ppm, respectivamente. Por lo tanto, en LG, el flux de CO<sub>2</sub> estaba en la región del límite de detección UGGA. A partir de estos resultados, estimamos que el límite de detección del método ODC fue de aproximadamente 10 mg de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, que es más alto que el rango inferior de fluxes de CO<sub>2</sub> reportado por Rasilo *et al.* (2015) en 224 lagos boreales.

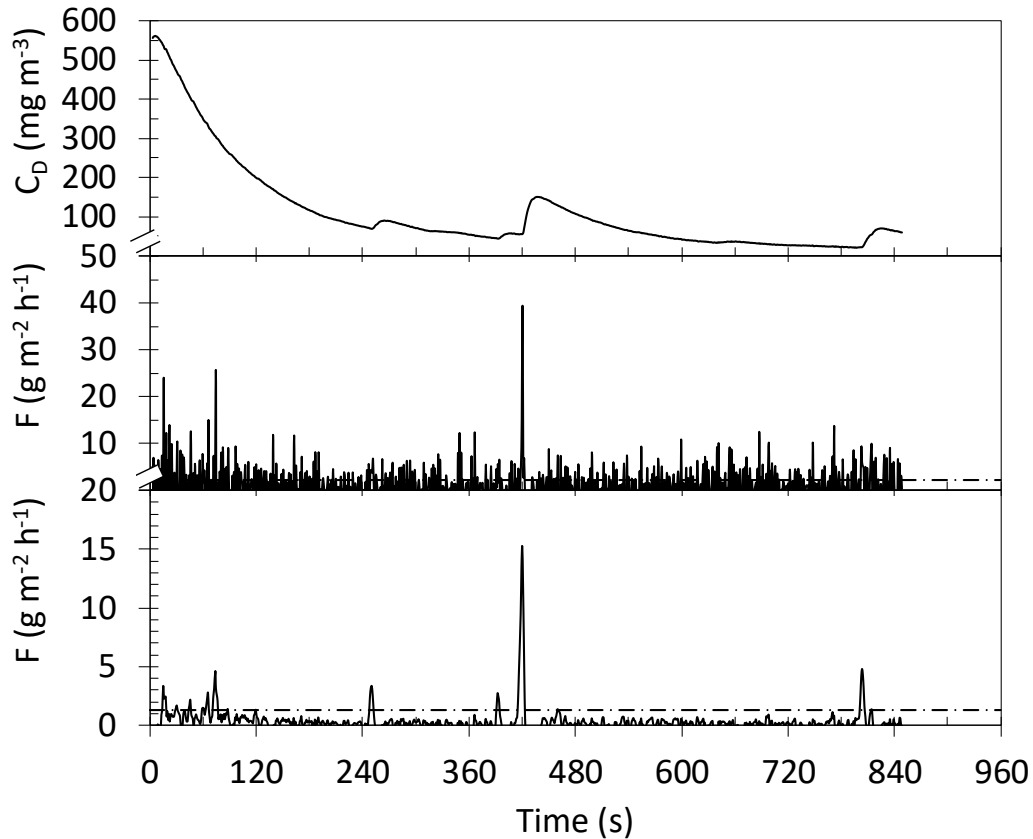


Figura 10. Ejemplo de la medición continua por la ODC en el LG: A.  $C_D$  sin tratamiento; B. flux sin filtrar (Ec. 1); C. Flux con doble suavizado (Ec. 2 y 3).

Durante las mediciones combinadas de flux difusivo y ebulitivo en el LG, observamos aumentos abruptos en  $C_D$  en el espacio de cabeza y su pico correspondiente en los datos de flux (Figura 10). Sin embargo, en este caso, para distinguir los incrementos en el flux del ruido de fondo, necesitamos un índice de corte para un flux instantáneo de  $2.15 \text{ g de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , que corresponde a un contenido de burbujas de  $31.2 \times 10^{-3} \text{ mL de CO}_2$  o burbujas de 5.3-8.4 mm de diámetro con un contenido de 40-10% de  $\text{CO}_2$ . Este rango solo cubre el rango más alto de diámetros de burbujas reportados previamente en lagos, 2.6-11.4 mm (DelSontro *et al.*, 2015; Delwilche *et al.*, 2015; Ostrovsky *et al.*, 2008), lo que indica que el método de ODC, bajo las condiciones experimentales probadas, presenta serias limitaciones. En la Figura 11, ilustramos gráficamente esa limitación, mostrando el rango de diámetros de burbuja de  $\text{CH}_4$  ( $\varnothing_{B, \text{CH}_4}$ ) y  $\text{CO}_2$  ( $\varnothing_{B, \text{CO}_2}$ ) que se pueden caracterizar por el método de ODC, bajo su configuración actual, también mostramos la región de burbujas (en diámetro y

composición) previamente reportada en la literatura. Como se muestra, la capacidad de detección de CH<sub>4</sub> del método de ODC cubre toda la amplitud de burbujas, mientras que, para el CO<sub>2</sub> el método de ODC cubre solo el 42% del rango informado en la literatura. Esto último fue confirmado por nuestros experimentos de campo, ya que el CO<sub>2</sub> se detectó solo en las burbujas más grandes. La burbuja más pequeña detectada (8,2 mm, indicada en la Figura 11 por "•") contenía un 17% de CO<sub>2</sub>. Solo se detectaron 23 burbujas (27% del total de burbujas detectadas) que contenían CO<sub>2</sub> de las 84 con un diámetro > 8,2 mm. Estas burbujas contenían, en promedio, 8.5% de CO<sub>2</sub>, mientras que el porcentaje promedio de CO<sub>2</sub> en todas las burbujas > 8.2 mm de diámetro fue del 3.8%.

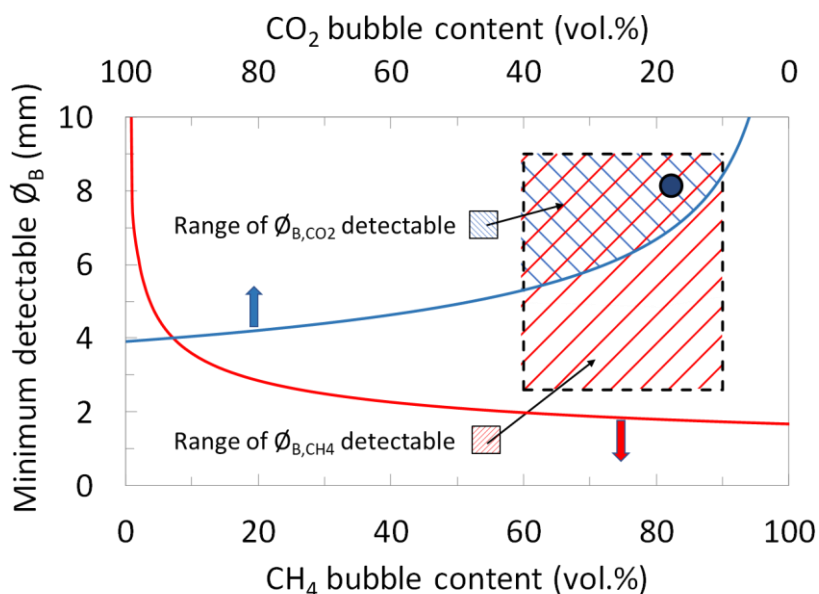


Figura 11. Diámetro mínimo de burbuja que puede ser detectado y caracterizado en función del porcentaje de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> que contiene cada burbuja por el método de ODC. La línea roja muestra el  $\phi_{B,\text{CH}_4}$  mínimo detectable, la línea azul muestra  $\phi_{B,\text{CO}_2}$  mínimo detectable, y el recuadro achurado muestra el rango de diámetros reportados en la literatura.

#### 6.1.4.4 Fortalezas y debilidades del método ODC

Hemos observado que el método de ODC permite la caracterización de fluxes de CH<sub>4</sub> difusivos y ebulitivos, incluyendo la caracterización de burbujas. La principal debilidad del

método, cuando se aplica a CH<sub>4</sub>, es la incertidumbre relativa a  $\varnothing_{B, CH_4}$ , en el caso de las burbujas que alcanzan simultáneamente la ODC, es decir, en menos de 5 s. Discutimos que la segregación de burbujas podría mejorarse significativamente con un detector de alta frecuencia o mediante el uso de una ODC con una superficie de contacto más pequeña. La aplicación del método de ODC para la caracterización del flux de CO<sub>2</sub> presentó mayores debilidades, ya que los fluxes inferiores a 10 mg CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> o burbujas con un diámetro inferior a 5.3 mm (suponiendo un contenido de 40% de CO<sub>2</sub>) no pudieron cuantificarse. Esta limitación se puede resolver utilizando un detector más sensible, usar una superficie más grande de la ODC en contacto con el agua, y reducir la velocidad de flujo del gas portador para reducir la dilución.

De hecho, el método ODC incluye una gran cantidad de parámetros de diseño y control, cada uno de los cuales tiene un impacto en las mediciones de flux y características de burbuja. Entre los parámetros más importantes, la velocidad del flujo del gas acarreador y el área de la ODC en contacto con el agua son las que tienen mayor impacto en la sensibilidad del método y su capacidad para detectar y cuantificar burbujas. Una superficie más grande en contacto con el agua mejoraría la capacidad de la ODC para capturar un mayor número de burbujas en un tiempo dado, así como para detectar fluxes difusivos bajos. Una velocidad de flujo de gas de acarreador más baja aumentaría la sensibilidad del método y permitiría la cuantificación de burbujas pequeñas o fluxes difusivos bajos. Por lo tanto, por ejemplo, una gran superficie y un caudal bajo estarían mejor adaptados para los lagos oligotróficos. Afortunadamente, las cámaras flotantes son simples y de bajo costo, lo que hace factible el desarrollo y el despliegue de varios diseños de cámara. Además, vale la pena mencionar que el diseño de la ODC se puede cambiar fácilmente a CDC estándar cerrando la entrada del gas acarreador y devolviendo la salida del detector a la cámara flotante, en caso de que la ODC no cumpla adecuadamente con las medidas esperadas. Además, el método de ODC podría convertirse fácilmente en una cámara cerrada automática al incluir un dispositivo temporizador que controla la ventilación discreta del espacio de cabeza de la cámara (Duc *et al.*, 2013; Martinsen *et al.* 2018; Hoffmann *et al.*, 2017).



Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se utiliza un método de ODC para la caracterización de las emisiones de CH<sub>4</sub> en ecosistemas de agua dulce. En comparación con otros métodos, el método de embudo invertido (Deshmukh *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2015; Keller y Stalalrd, 1994) permite la cuantificación directa de la ebullición a una profundidad determinada de la columna de agua, pero no cuantifica las mediciones de flux difusivo. Los detectores hidroacústicos (Ostrovsky *et al.*, 2008) son móviles y de gran interés para la detección de burbujas, pero no cuantifican ni los fluxes, ni la composición de las burbujas. Los detectores ópticos (Delwilche *et al.*, 2015), que son un novedoso desarrollo de embudos invertidos, permiten un análisis de alta definición del tamaño de burbuja, pero no cuantifican la composición de burbujas individuales ni los fluxes difusivos. La caracterización por conteo de burbujas atrapadas (Walter Anthony *et al.*, 2010) cuantifica los fluxes ebullitivos en todo el mundo, pero solo durante el período invernal y en los lagos sujetos a congelación. En el caso de los detectores de gas montados en botes robóticos (Grinham *et al.*, 2011), la detección de eventos ebullitivos puede realizarse en una plataforma móvil; sin embargo, no cuantifica el flux difusivo ni segrega las burbujas. Por lo tanto, cada método presenta algunas ventajas específicas, siendo la principal ventaja del método de ODC es que cuantifica fluxes difusivos y ebullitivos. En conclusión, consideramos que el ODC es un método potencial de alto rendimiento que complementa otros métodos y respalda los esfuerzos actuales de la comunidad científica para caracterizar mejor las emisiones de gases de efecto invernadero de los ecosistemas de agua dulce.

## 6.2 Reporte inicial sobre la dinámica de emisión de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en ecosistemas de agua dulce subantárticos: Estudio estacional de un lago y un reservorio

**Oscar Gerardo-Nieto**, María Soledad Astorga-España, Andrés Mansilla, Frederic Thalasso

Artículo publicado en: *Science of the Total Environment* 593–594 (2017) 144–154.

### 6.2.1 Resumen

En la ecorregión sub-Antártica de Magallanes los ecosistemas han sido escasamente estudiados, y el ciclo y emisiones de CH<sub>4</sub> de los lagos no han sido reportadas. Para llenar esta brecha del conocimiento, se seleccionaron y estudiaron, dos ecosistemas localizados a 53°S, un lago y un reservorio, durante tres campañas distribuidas equitativamente en un año. Los parámetros medidos fueron las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, así como sus concentraciones disueltas en la columna de agua, todas ellas fueron determinadas con una alta resolución espacial. No se observó ebullición en ninguno de los ecosistemas estudiados, el rango del flux de CH<sub>4</sub> fue entre 0.0094 y 4.47 mmol m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup> mientras que el flux de CO<sub>2</sub> fue entre -22.95 y 35.68 mmol m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>. La concentración de CH<sub>4</sub> disuelto varió entre 0.025 y 128.75 μmolL<sup>-1</sup>, mientras que la concentración de CO<sub>2</sub> varió desde por debajo del límite de detección (0.15 μmol L<sup>-1</sup>) hasta 379.09 μmolL<sup>-1</sup>. La alta resolución espacial de los métodos utilizados permitió la construcción de mapas batimétricos, mapas superficiales de contorno de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, y mapas de contorno transeccionales de temperatura y de concentración de O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. De forma general, los lagos estudiados fueron productores netos de gases efecto invernadero y no tuvieron diferencias significativas con lagos templados localizados en latitudes boreales similares (53°N), exceptuando que la ebullición no fue observada en los ecosistemas sub-Antárticos estudiados.

## 6.2.2 Introducción

A pesar que los lagos y reservorios sólo cubren aproximadamente el 3.7% de la superficie continental terrestre (Verpoorter *et al.*, 2014), se estima que son responsables de alrededor del 16% de las emisiones totales de CH<sub>4</sub> a la atmósfera (Bastviken *et al.* 2011; Saunois *et al.*, 2016). Las emisiones de CH<sub>4</sub> de los lagos y reservorios son, por lo tanto, un componente importante del ciclo biogeoquímico del carbono a nivel mundial. La producción de CH<sub>4</sub> en los ecosistemas de agua dulce ha sido descrita desde principios de la década de 1960 (Koyama, 1963), mientras que las emisiones de CH<sub>4</sub> han sido objeto de un creciente interés desde principios de la década de 1980 (Harriss y Sebacher, 1981). De manera similar, los ecosistemas de agua dulce son una fuente importante de CO<sub>2</sub>, estimando una emisión de 1.4 Pg-C año<sup>-1</sup> (Tranvik *et al.* (2009), de los cuales los lagos y reservorios emiten alrededor de 0.32 Pg-C año<sup>-1</sup> (Raymond *et al.* 2013). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de informes sobre el ciclo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en los ecosistemas de agua dulce, se ha prestado poca atención al hemisferio sur. Por ejemplo, las síntesis de Bastviken *et al.* (2011) y Saunois *et al.* (2016) no reportan emisiones de CH<sub>4</sub> de ecosistemas acuáticos más al sur que 24°S, y al mejor de nuestro conocimiento, tampoco hay informes sobre las emisiones de CO<sub>2</sub> de estas latitudes meridionales.

La Patagonia austral, o más precisamente la ecorregión sub-Antártica de Magallanes (Rozzi *et al.*, 2012), es una región del mundo donde los ecosistemas no han sido estudiados (Rozzi *et al.*, 2008) y en la cual el ciclo CH<sub>4</sub> y las emisiones en los lagos nunca han sido reportados. Sin embargo, esta región de 145,000 km<sup>2</sup> es de gran importancia por varias razones. En primer lugar, se trata de un área continental única en el mundo situada entre 45 y 55°S, más al sur que el Cabo de Buena Esperanza (Sudafrica, 35 ° S) y el Estrecho de Bass (Australia, 39 ° S). En segundo lugar, esta región es una de las veinticuatro áreas mejor conservadas del mundo debido a su flora y fauna preservadas, combinada con su baja densidad de población (72% del área está protegida, Mittermeier *et al.*, 2003). En tercer lugar, el área se caracteriza por las aguas de lluvia y arroyos más limpios del mundo, principalmente porque la lluvia se origina sobre el Pacífico sur, fuera de las corrientes de aire que transportan contaminantes industriales (Hedin *et al.*, 1995).

La caracterización del ciclo del CH<sub>4</sub> y del CO<sub>2</sub>, incluyendo la medición de las emisiones de los lagos de la ecorregión subantártica de Magallanes es, por lo tanto, de gran importancia porque llenaría una laguna de conocimiento y mejoraría las estimaciones globales de emisiones de gases de efecto invernadero de los ecosistemas acuáticos. Además, también puede servir como referencia para las condiciones en ambientes prístinos templados con los cuales comparar lagos templados en Europa y América del Norte.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el ciclo y las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> con alta resolución espacial para un lago y un reservorio en la ecorregión sub-Antártica de Magallanes en tres meses estacionalmente característicos (es decir, para la primavera, el verano y invierno). El ciclo y las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se caracterizaron mediante la determinación exhaustiva de los fluxes y las concentraciones disueltas en la columna de agua. Para complementar nuestra comprensión del ciclo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, también se midieron las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) y otros parámetros fisicoquímicos. Los diversos parámetros de los lagos estudiados se discuten y se comparan con los de los lagos del norte.

### 6.2.3 Material y métodos

#### 6.2.3.1 Sitios de estudio y campañas

Se seleccionaron dos lagos subantárticos. El primero fue Lago Hambre (LH; 53.6035°S, 70.9526°W; Figura 12A), un lago natural con forma redonda ubicado a 50 km al sur de Punta Arenas (53.16°S, 70.92°O) y 60 m sobre el nivel del mar. Este lago se encuentra en un área protegida con acceso limitado y operado por el "Parque del Estrecho de Magallanes". El segundo fue Lago Lynch (LL; 53.1757°S, 71.0076°O; Figuras 12B y 12C), que es un lago natural que fue modificado en 1925 y 1940 con la construcción de una presa para aumentar su capacidad. Este reservorio se encuentra a 12 km al oeste de Punta Arenas a 220 m sobre el nivel del mar y dentro de otra área protegida - "Reserva Nacional de Magallanes". No existe un uso antropogénico actual del agua en LH, mientras que LL es la principal fuente de

agua potable para la ciudad de Punta Arenas, cuyos servicios de agua son operados por "Aguas de Magallanes". La selección de los lagos se basó en varios criterios, que incluyeron, la lejanía con actividades antropogénicas, la accesibilidad con bote, la capacidad de comunicación y la presencia de bosques subpolares naturales en el entorno del lago (ecosistema dominante de la región). Además, seleccionamos lagos relativamente pequeños (Tabla 2) debido a que este tipo de lagos son característicos de la región, son el principal tipo de lagos en el mundo (Cael y Seekell, 2016), y son más dinámicos que los lagos grandes (Cael y Seekell, 2016; Holgerson y Raymond, 2016), lo que los convierte en un buen modelo para este primer estudio de aproximación.

El clima en la región de Punta Arenas es frío, con una temperatura promedio anual de 6.5 °C y un rango de 10 °C en las temperaturas mensuales promedio, siendo julio y enero los meses más fríos y cálidos con temperaturas promedio de 1.8 y 11.0 °C, respectivamente (Butorovich, 2013). La región se caracteriza por fuertes vientos, con una velocidad promedio del viento de 5.2 m s<sup>-1</sup> y ráfagas frecuentes de hasta 30 m s<sup>-1</sup> (Butorovich, 2013). No hay datos confiables sobre el clima en LH, aunque se asume que el clima es similar al de Punta Arenas debido a su proximidad. Sin embargo, LL está a una elevación 160 m más alta que la de LH y más expuesta a los vientos, lo que causaría un clima moderadamente más frío en LL que en LH. Ambos lagos se caracterizaron en tres campañas en intervalos de 4 meses y en meses estacionalmente característicos: octubre de 2014 (principios de primavera), febrero de 2015 (mediados de verano) y junio de 2015 (principios de invierno). Cada campaña duró aproximadamente un mes.

#### 6.2.3.2 Morfometría del lago y características fisicoquímicas

En cada campaña de campo y en cada lago, la profundidad se midió entre 50 y 70 ubicaciones utilizando una sonda portátil (Depthmate Portable Sounder, Speedtech, EE. UU.). La ubicación en cada punto se determinaron con un sistema de posicionamiento global (eTrex 20, Garmin, EE. UU.). El área superficial de los lagos ( $A_w$ ) se obtuvo a través del análisis de imágenes de fotografías aéreas. El volumen del lago ( $V$ ) se determinó a partir de mediciones de profundidad y área. Dos parámetros morfométricos, es decir, la profundidad promedio

( $Z_m$ ) y el desarrollo de la línea costera ( $D_L$ ), se determinaron mediante las Ecuaciones 9 y 10, donde  $L$  es la longitud de la orilla del lago.

$$Z_m = \frac{V}{A_W} \quad (9)$$

$$D_L = \frac{L}{2 \cdot \sqrt{\pi \cdot A_W}} \quad (10)$$

De 8 a 13 estaciones de muestreo y monitoreo fueron seleccionadas a lo largo del transecto más largo de cada lago (Figura 12). En cada estación de muestreo, se midieron la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto (OD) desde la superficie hasta los sedimentos a intervalos de profundidad de 1 m usando una sonda multiparamétrica (HI 9828, Hanna Instrument, México). Además, se tomaron muestras de agua superficial (1 m de profundidad) con una botella Van Dorn horizontal de 2.2 L (Wildco, México) para la determinación del nitrógeno total (TN), carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico (IC), clorofila *a* (Chla) y fósforo reactivo soluble (SRP). Las muestras de agua se manejaron de acuerdo con métodos estándar (APHA, 1989). TN, TOC y TC se determinaron usando un analizador de carbono y nitrógeno total (módulo Shimadzu-Vcsn + TN1, Shimadzu, México). Las concentraciones de Chla y SRP se determinaron de acuerdo con métodos estándar (APHA, 1989).

Las densidades del agua calculadas a partir de la temperatura del agua superficial y del fondo se utilizaron para determinar la estabilidad relativa de la columna de agua (RWCS, Padiak *et al.*, 2003) mediante el cálculo con la Ecuación 11, donde  $D_B$  es la densidad del agua del fondo,  $D_s$  es la densidad del agua superficial, y  $D_4$  y  $D_5$  son las densidades del agua a 4 °C y 5 °C, respectivamente (Kalff, 2002). Los lagos con  $RWCS > 56.5$  se consideraron completamente estratificados, los lagos con  $RWCS < 16.3$  se consideraron completamente mezclados, y aquellos con valores de RWCS intermedio se consideraron parcialmente

estratificados (Branco *et al.*, 2009). La profundidad de la termoclina se determinó a partir de la estabilidad de la columna de agua, de acuerdo con el método de Coloso *et al.* (2010).

$$RWCS = \frac{D_B - D_S}{D_4 - D_5} \quad (11)$$

### 6.2.3.3 Concentraciones de gases de efecto invernadero disueltas

Las concentraciones de CH<sub>4</sub> (C<sub>CH<sub>4</sub></sub>) y CO<sub>2</sub> (C<sub>CO<sub>2</sub></sub>) disueltas en la columna de agua se determinaron utilizando una membrana acoplada a un espectrometro laser de cavidad integrada (M-ICOS) desarrollada por González-Valencia *et al.* (2014). Brevemente, este método consiste en un flujo de nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> y un flujo de agua continuamente extraído de la profundidad deseada. Los dos flujos se cruzan en un módulo de intercambio de gas/líquido (PDMSXA-1000, Medarray Inc., EE. UU.). Este módulo estaba compuesto por una serie de fibras huecas de silicona, con un área de intercambio total de 1000 cm<sup>2</sup>, donde nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fluye por el lumen (interior de las membranas) y el agua fluye por el exterior. Debido a la fuerza de difusión una parte proporcional a la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto en el agua es transferida a la fase gaseosa, donde es medida por un detector portátil de gases efecto invernadero (UGGA, Los Gatos Research, EE. UU.). El agua se extrajo continuamente a la profundidad deseada con una bomba peristáltica (12 V, Solinst, México) con un caudal de 1,2 L min<sup>-1</sup>, mientras que el nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fluía con un caudal de 0,75. L min<sup>-1</sup> controlado por un controlador de flujo másico (GFC-17, Aalborg, México).

Además, se tomó una muestra de agua del lago y se midió usando los métodos M-ICOS y el de equilibrio en el espacio de cabeza estándar en paralelo para la calibración al comienzo y al final de cada día de medición. El método de equilibrio del espacio de cabeza consistió en tomar 40 ml de la muestra de agua en una jeringa de polipropileno de 60 ml, agregar 20 ml de nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, y luego agitar enérgicamente durante 20 s para alcanzar el equilibrio gas/líquido. El líquido mezclado se evacuó y se inyectaron los 20 ml del espacio

de cabeza de la jeringa en la línea de gas de la UGGA, lo que provocó una respuesta en forma de pico que se integró para determinar las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza. Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la muestra de agua se determinaron a partir de las concentraciones en el espacio de cabeza aplicando la ley de Henry como se da en la Ecuación 12 donde T es la temperatura del agua (K), H<sub>298.15</sub> es la constante estándar de Henry (a 298.15 K), y τ es la constante de dependencia de la temperatura. Los valores para H<sub>298.15</sub> y τ se obtuvieron de la literatura (NIST, 2016). Los detalles sobre este procedimiento se pueden encontrar en Gonzalez-Valencia *et al.* (2014).

$$H_T = H_{298.15} \cdot e^{\tau \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right)} \quad (12)$$

El procedimiento para determinar los perfiles de C<sub>CH<sub>4</sub></sub> y C<sub>CO<sub>2</sub></sub> consistió en colocar la sonda de extracción de agua unos centímetros debajo de la superficie del agua durante aproximadamente 60s. La sonda se bajó lentamente y de manera constante hasta el fondo del lago, donde permaneció durante 30s adicionales. Se mantuvo una velocidad de sumerción controlada (alrededor de 1 m min<sup>-1</sup>). Con este procedimiento, se adquirieron aproximadamente 60 mediciones de gases disueltos por cada metro de profundidad de la columna de agua.

#### 6.2.3.4 Fluxes de gases de efecto invernadero

Los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se determinaron entre 30 y 40 ubicaciones por cada lago durante cada campaña de muestreo con una cámara dinámica cerrada (CDC) conectada a un UGGA en circuito cerrado. Para reducir los efectos de la turbulencia, el diseño del CDC minimizó la profundidad de penetración (<1 cm) a la vez que garantiza un sellado efectivo. Las ubicaciones para las mediciones de flux se seleccionaron en el siguiente orden de prioridad: (i) la línea de transecto donde se determinaron todos los parámetros (de 8 a 10 ubicaciones en cada lago y campaña), (ii) mediciones en la zona litoral (de 13 a 17 ubicaciones) para garantizar las condiciones de frontera para la interpolación de datos y los mapas de contorno



estuvieran bien establecidas, y (iii) mediciones entre la zona litoral y la línea de transecto (de 9 a 13 ubicaciones). Comprobamos después de cada día de medición que los puntos de muestreo estaban bien distribuidos en toda la superficie del lago y que el número de mediciones era adecuado siguiendo el método sugerido por Wik *et al.* (2016). El flux se determinó usando la Ecuación 13 donde  $F$  es el flux ( $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ),  $\Delta C$  es el cambio en la concentración de  $\text{CH}_4$  o  $\text{CO}_2$  observado en el CDC durante el intervalo de tiempo ( $\Delta t$ ),  $V_{\text{CDC}}$  es el volumen SC (7.8 L) y  $A_{\text{CDC}}$  es el área del CDC en contacto con la superficie del agua ( $0.096 \text{ m}^2$ ).

$$F = \frac{\Delta C}{\Delta t} \cdot \frac{V_{\text{CDC}}}{A_{\text{CDC}}} \quad (13)$$

El método CDC mide el flux total en la superficie del lago e incluye tanto flux difusivo y ebulitivo. Debido a que este método incluía mediciones continuas de la concentración de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  con una frecuencia de 1 Hz, permitió una distinción entre los dos modos de emisión. El flux difusivo se caracterizan por un aumento lineal de las concentraciones de  $\text{CH}_4$  o  $\text{CO}_2$  en la CDC, mientras que en la ebullición, cuando una burbuja que alcanza la CDC causa un incremento repentino en la concentración. Antes de las mediciones de flux, se realizaron observaciones visuales del área y se midió el flux a largo plazo (15 minutos) en las zonas litorales de los lagos, donde la ebullición es más frecuente (Natchimuthu *et al.*, 2015), para determinar si este modo de flux estaba presente. Cuando no se observó ebullición antes o durante las mediciones de flux, las emisiones se determinaron a partir de las mediciones de concentración de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  30s después de colocar la CDC en la superficie del agua y durante tres minutos de medición continua. Cuando se observó ebullición, la CDC se mantuvo en posición durante un período mucho más largo, es decir, hasta que se recopilaron suficientes datos para determinar una pendiente lineal con un coeficiente de correlación lineal mayor que 0.8. Cada determinación de flux se realizó por triplicado.

#### 6.2.3.5 Tratamiento de datos y estadísticas

A partir de los datos obtenidos durante las campañas de muestreo, se establecieron mapas batimétricos y mapas de contorno de superficie de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. También se establecieron mapas de contorno del transecto longitudinal para DO, T, C<sub>CH4</sub> y C<sub>CO2</sub>. Los fluxes se interpolaron con el software Surfer 11.0 (Golden Software, EE. UU.). La selección del mejor método de interpolación, de los 10 métodos incluidos en el software Surfer, se basó en dos criterios: el error medio absoluto (MAE) y el error medio del sesgo (MBE, Willmott y Matura, 2006). Las emisiones totales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> de cada lago se determinaron integrando los fluxes interpolados sobre la distribución espacial (Borjesson *et al.*, 2000). La distribución de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, la C<sub>CH4</sub> y C<sub>CO2</sub>, DO, T y pH fueron probadas en cuanto a normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando los datos no se distribuyeron normalmente, se transformaron log<sub>10</sub> para fines de comparación. También se analizaron las diferencias significativas entre los conjuntos de datos (por ejemplo, las profundidades de lagos, estaciones y columnas de agua). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software del sistema de análisis estadístico NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, EE. UU.).

## 6.2.4 Resultados y discusión

### 6.2.4.1 Morfología del lago

Los datos morfométricos de LH y LL se resumen en la Tabla 2 y los mapas batimétricos se muestran en la Figura 12. El nivel de agua en LH permaneció sin cambios durante las tres campañas con una profundidad promedio de 6.2 m, una profundidad máxima de 19.7 m y un volumen promedio de 101,680 m<sup>3</sup>. El nivel de agua en LL cambió considerablemente con el tiempo debido al funcionamiento del reservorio. Durante la primavera, la profundidad máxima fue de 8.0 m y el volumen del embalse fue de 1'310,000 m<sup>3</sup> mientras que en verano el nivel del agua, el volumen y el área del reservorio se redujeron en 62, 75 y 52%, respectivamente, de los valores correspondientes en primavera. Durante la campaña de invierno, LL se congeló, lo que redujo significativamente el muestreo y la caracterización del lago. Durante esa campaña, solo se pudieron alcanzar tres ubicaciones, aproximadamente

en el centro del lago. El desarrollo de la línea costera en LH ( $D_L$ ) fue de 1.33 en todas las estaciones, mientras que en LL la  $D_L$  varió de 1.67 en primavera a 2.02 en verano.

*Tabla 2. Propiedades morfométricas y parámetros físico químicos del Lago Hambre y Lago Lynch (región Magallánica, Chile).  $A_w$  – área superficial  $Z_m$  – profundidad promedio;  $Z_{max}$  – profundidad máxima;  $V$  – volumen;  $D_L$  – desarrollo de la línea costera;  $L_T$  – longitud del transecto longitudinal; RWCS – estabilidad relativa de la columna de agua;  $T$  – temperatura;  $DO$  – oxígeno disuelto;  $TOC$  – carbono orgánico total;  $IC$  – carbono inorgánico;  $TN$  – nitrógeno total;  $SD$  – profundidad Secchi;  $Chl a$  – Clorofila “a”;  $SRP$  – fósforo reactivo soluble;  $ND$  – No determinado.*

Lake Season	Hambre (LH)			Lynch (LL)		
	Spring	Summer	Winter	Spring	Summer	Winter
$A_w$ (m <sup>2</sup> )	16,400	16,400	16,400	262,000	127,000	262,000
$Z_m$ (m)	6.2	6.2	6.2	5	2.5	ND
$Z_{max}$ (m)	19.7	19.7	19.7	8.2	5	ND
$L_T$ (m)	173	173	173	1120	965	ND
$V$ (m <sup>3</sup> )	101,680	101,680	101,680	1,310,000	317,500	ND
$D_L$ (-)	1.33	1.33	1.33	2.02	1.67	1.81
RWCS*	25.11 (PS)	86.65 (S)	1.56 (M)	0.92 (M)	2.41 (M)	5.87 (M)
$T$ (°C)	7.47 ± 2.25	11.23 ± 2.79	2.94 ± 0.34	5.27 ± 0.21	11.10 ± 0.14	1.17 ± 0.45
$DO$ (μmol L <sup>-1</sup> )	381.7 ± 67.8	267.6 ± 26.8	355.3 ± 35.8	227.3 ± 20.6	264.6 ± 10.8	162.4 ± 4.7
pH (-)	7.8 ± 0.4	7.3 ± 0.4	8.1 ± 0.8	8.6 ± 0.8	8.6 ± 0.2	7.8 ± 0.2
$TOC$ (mg L <sup>-1</sup> )	5.78 ± 0.13	ND	ND	9.47 ± 0.48	ND	ND
$IC$ (mg L <sup>-1</sup> )	3.73 ± 0.41	ND	ND	1.98 ± 0.12	ND	ND
$TN$ (mg L <sup>-1</sup> )	0.30 ± 0.20	ND	ND	0.18 ± 0.02	ND	ND
$SD$ (m)	2.8	1.7	2.5	3.2	2.1	1.3
$Chl a$ (μg L <sup>-1</sup> )	6.7	8.1	6.2	2.9	3.5	1.5
$SRP$ (mg L <sup>-1</sup> )	0.023	0.047	0.025	0.032	0.054	0.023

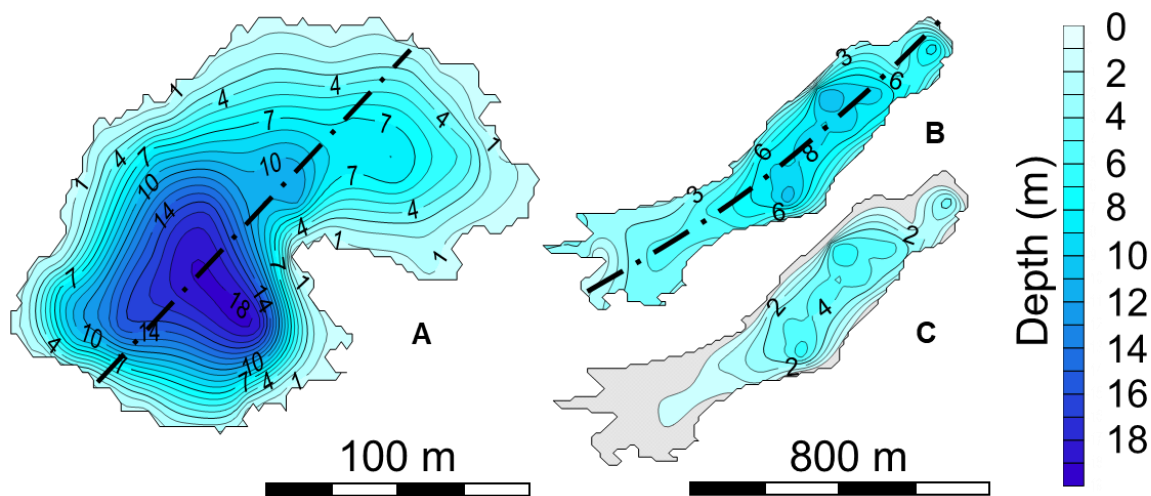


Figura 12. Mapa batimétrico del Lago Hambre, LH (A), y Lago Lynch, LL durante la primavera (B), y verano (C), la línea discontinua muestra el transecto longitudinal usado para el mapa transeccional.

#### 6.2.4.2 Caracterización fisicoquímica

La Figura 13 muestra los mapas de contorno de temperatura de los datos registrados durante las tres campañas de muestreo. De acuerdo con el RWCS, el LH fue parcialmente estratificado durante la primavera (Tabla 2) con una termoclina ubicada aproximadamente a 4 m. Durante el verano, LH estuvo completamente estratificado con una termoclina ubicada aproximadamente a 6 m, mientras que durante el invierno, LH estuvo completamente mezclado. En el LL, la columna de agua se mezcló durante las tres estaciones, probablemente debido a los fuertes vientos, creando estrés por fricción en la superficie del agua, formando olas y corrientes que se propagan a lo largo de la columna de agua (Joyce y Jewell, 2003). Durante el verano, el nivel de agua en LL se redujo sustancialmente (profundidad máxima 5.0 m), por lo que fue más propenso a ser mezclado por el viento. Durante el invierno, la temperatura del agua superficial en ambos lagos fue ligeramente inferior a la temperatura del agua del fondo, con gradientes de 0.9 y 1.3 °C para LH y LL, respectivamente. Sin embargo, el RWCS era bajo y la columna de agua para ambos lagos se consideró mezclada. La temperatura promedio en el transecto del LH fue  $7.47 \pm 2.25$  °C en primavera,  $11.23 \pm 2.79$  °C en verano y  $2.94 \pm 0.34$  °C en invierno. Para LL, la temperatura promedio fue de  $5.27 \pm$

0.21 °C en primavera,  $11.10 \pm 0.14$  °C en verano y  $1.17 \pm 0.45$  °C en invierno. Con base en la RWCS calculada, el LH y LL se clasificaron como lagos monomítico y polimítico, respectivamente (Lewis, 1983).

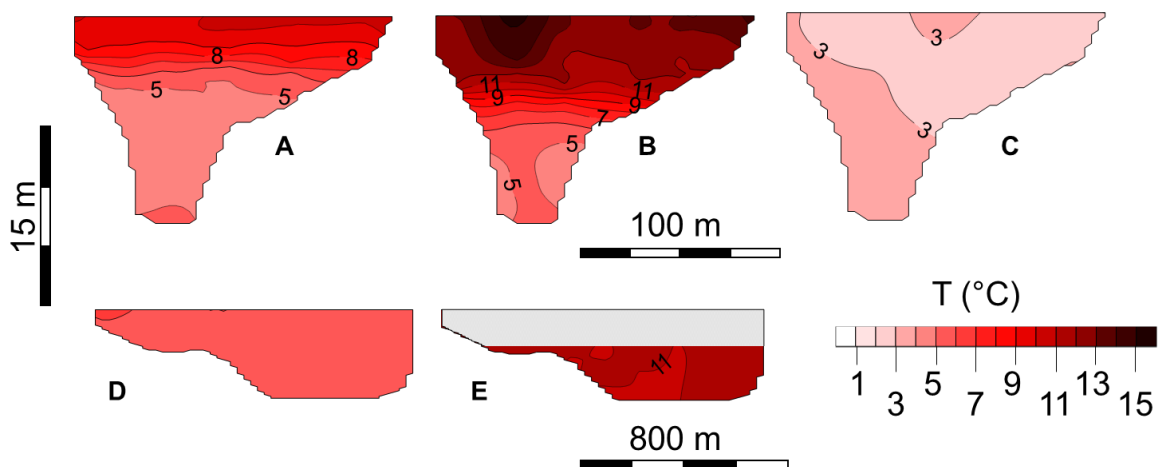


Figura 13 Transecto de los perfiles de temperatura del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

La Tabla 2 muestra los parámetros fisicoquímicos medidos en ambos lagos. En ambos lagos y en todas las estaciones, el pH promedio fue básico, variando de  $7.3 \pm 0.4$  a  $8.6 \pm 0.8$ . Cuando se observó estratificación térmica (es decir, LH en verano), también se observó un gradiente de pH ( $7.7 \pm 0.1$  en el epilimnio y  $6.9 \pm 0.2$  en el hipolimnio). También se observó una quimioclina a la misma profundidad que la termoclina (6 m). Las profundidades Secchi variaron de  $1.3 \pm 0.3$  a  $3.2 \pm 0.2$  m, lo que corresponde a condiciones eutróficas en los lagos (OCDE, 1982). La concentración de Chla varió de  $1.5 \pm 0.2$  a  $8.1 \pm 0.5$   $\mu\text{g L}^{-1}$ , lo que corresponde a concentraciones generalmente encontradas en lagos mesotróficos (Chapra y Tarapchak, 1976). La concentración superficial de nitrógeno total medida durante la primavera fue de  $0.30 \pm 0.20$   $\text{mg L}^{-1}$  en LH y  $0.18 \pm 0.02$   $\text{mg L}^{-1}$  en LL, que corresponde a un rango oligotrófico (Dodds *et al.*, 1998). Utilizando la clasificación de Carlson (1977), al combinar la profundidad Secchi con las concentraciones de Chla y nitrógeno total, tanto LL como LH se clasificaron como lagos mesotróficos.

#### 6.2.4.3 Dinámica de gases disueltos

La Figura 14 muestra los mapas de contorno de DO para LH y LL. En ambos lagos y en todas las estaciones, la columna de agua estaba completamente oxigenada, excepto durante el verano en LH cuando se observó una fuerte estratificación y se encontraron condiciones anóxicas debajo de la oxiclina (Tabla 2, Figura 14B). En general, las concentraciones de OD estuvieron cerca de los valores de saturación, excepto en LL durante el invierno, donde la concentración de OD fue solo del 48% de la saturación. Esta concentración de DO relativamente baja probablemente fue causada por la capa de hielo, que impidió la transferencia de oxígeno de la atmósfera y redujo sustancialmente la penetración de la luz y la producción de oxígeno por fotosíntesis (Clilverd *et al.*, 2009; White *et al.*, 2008). Al igual que con los perfiles de temperatura, no se observaron tendencias longitudinales de OD en ninguna estación.

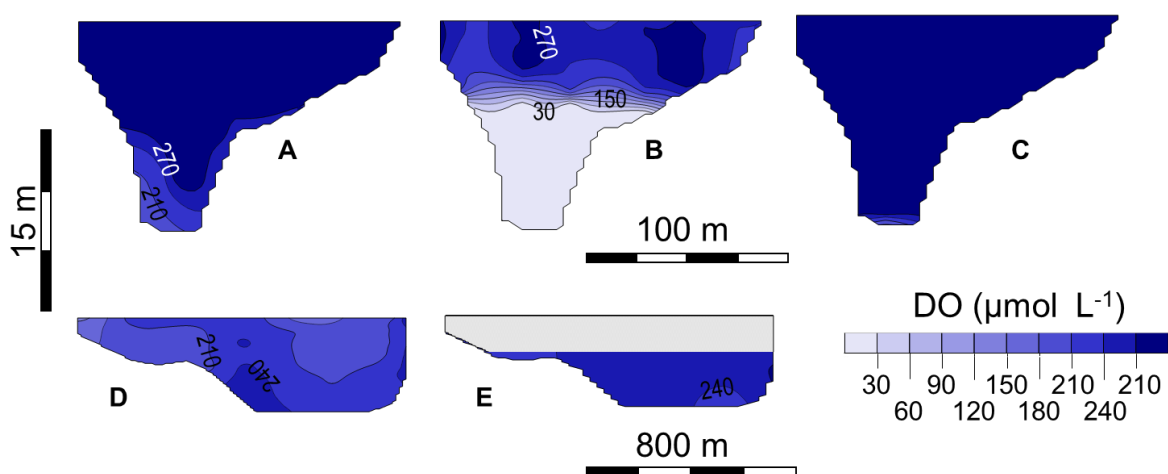


Figura 14 Transecto de los perfiles de DO del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

La  $C_{CH_4}$  observada en los lagos varió en más de cuatro órdenes de magnitud, desde  $0.025 \mu\text{mol L}^{-1}$  (en el agua superficial de LL durante la primavera) a  $128.75 \mu\text{mol L}^{-1}$  (en la parte inferior de LH durante el verano) (Figura 15). El promedio de  $C_{CH_4}$  observado para toda la columna de agua del transecto del LH fue de  $0.069 \pm 0.043 \mu\text{mol L}^{-1}$  en primavera,  $9.61 \pm 21.14 \mu\text{mol L}^{-1}$  en verano y  $0.21 \pm 0.13 \mu\text{mol L}^{-1}$  en invierno. En LL, el promedio  $C_{CH_4}$  en el transecto fue de  $0.057 \pm 0.015 \mu\text{mol L}^{-1}$  en primavera,  $0.68 \pm 0.11 \mu\text{mol L}^{-1}$  en verano y  $0.24 \pm 0.07 \mu\text{mol L}^{-1}$  en invierno. La diferencia del orden de magnitud observada entre LH y LL

en verano se debió a la estratificación de LH, con concentraciones superficiales promedio de  $0.843 \pm 0.003$  y  $0.638 \pm 0.105 \mu\text{mol L}^{-1}$  a lo largo de los transectos de LH y LL, respectivamente. En general, los datos  $C_{\text{CH}_4}$  fueron del mismo orden de magnitud que los datos reportados para lagos ubicados en latitudes norteadas similares (es decir, entre  $53$  y  $55^\circ\text{N}$ ; Barlett y Harriss, 1993; Casper *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2014). Durante el invierno en LL, solo se midieron tres perfiles  $C_{\text{CH}_4}$  aproximadamente en el centro del lago, porque el lago estaba cubierto por una capa de hielo de aproximadamente  $1$  cm y porque no se observó un gradiente longitudinal en las campañas anteriores. Los valores promedio de  $C_{\text{CH}_4}$  para estos perfiles de invierno fueron significativamente más altos que los tomados durante la primavera ( $p < 0.05$ ). Combinado con la menor concentración de OD, la mayor  $C_{\text{CH}_4}$  sugiere que la capa de hielo impidió el intercambio de gases con la atmósfera y promovió una acumulación de  $\text{CH}_4$  y una disminución de la concentración de DO, como se observa comúnmente en los lagos norteados (Bartosewicz *et al.*, 2016; Encinaz-Fernandez *et al.*, 2014; Martinez-Cruz *et al.*, 2015; Sepulveda-Jauregui *et al.*, 2015; Striegl y Michmerhuizen, 1998). En ambos lagos, la  $C_{\text{CH}_4}$  más baja observada fue cuatro órdenes de magnitud superior a la saturación atmosférica correspondiente a  $1.8$  ppmv de  $\text{CH}_4$ , que fue la concentración promedio medida a  $1$  m por encima de la superficie de cada lago. Los valores de  $C_{\text{CH}_4}$  mayores que el equilibrio atmosférico son una clara indicación de que ambos lagos son fuentes de  $\text{CH}_4$ , como se analizará más adelante.

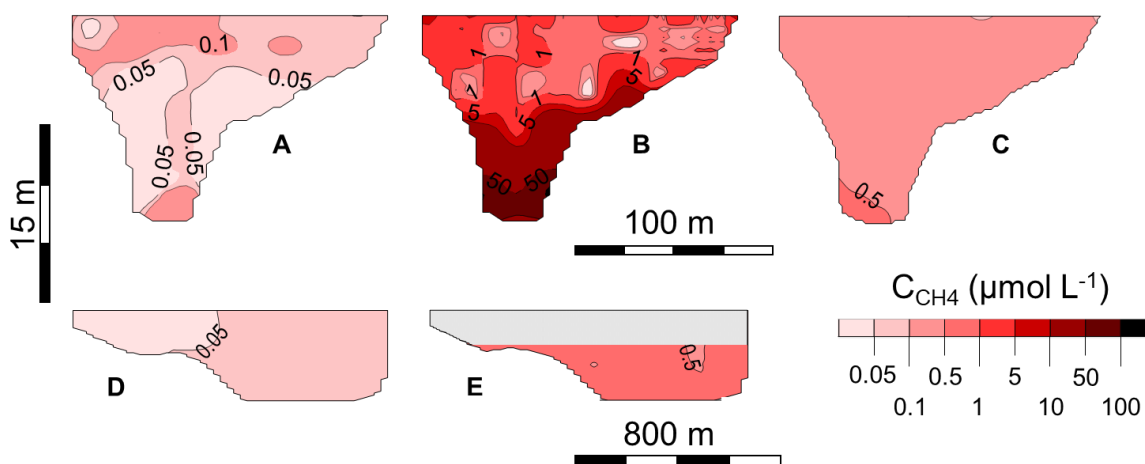


Figura 15 Transecto de los perfiles de  $C_{\text{CH}_4}$  del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

De manera similar a la del perfil DO, se observó un mayor gradiente vertical de  $C_{CH_4}$  durante la estratificación veraniega en LH, cuando la  $C_{CH_4}$  en la capa inferior fue hasta 300 veces mayor que en la superficie, debido a la acumulación de  $CH_4$  en el hipolimnio anoxico. La acumulación de  $CH_4$  en el hipolimnio de lagos estratificados ha sido ampliamente reportada en la literatura (Bartosewicz *et al.*, 2016; Bastviken *et al.*, 2004; Borrel *et al.*, 2011; Encinas-Fernandez *et al.*, 2014; Granin *et al.*, 2013; López Bellido *et al.*, 2009; Striegl y Michmerhuizen, 1998). Este gradiente vertical de  $CH_4$  comúnmente observado es el resultado de los siguientes tres factores: (i) metanogénesis en sedimentos lacustres y su posterior acumulación en aguas profundas, (ii) la existencia de una fuerte estratificación impedía la mezcla de las capas de la columna de agua, y (iii) condiciones metanotróficas presentes en la oxiclina donde el  $CH_4$  puede ser fácilmente oxidado (Bastviken *et al.*, 2004). La existencia de oxidación aerobia de  $CH_4$  por metanótrofos está respaldada por los perfiles de  $C_{CH_4}$  que son inversamente proporcionales a las concentraciones de OD (Figuras 14 y 15), como se informó anteriormente (Lambert y Sommers, 2007; Martinez-Cruz *et al.*, 2015), aunque no se midió las tasas de oxidación en este estudio.

Durante el verano, la  $C_{CH_4}$  promedio debajo de la termoclina de LH fue de  $24.11 \pm 29.08$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  y la masa total de  $CH_4$  acumulado en el hipolimnio se estimó en 16.8 kg para todo el lago, o  $0.131$   $\text{mol m}^{-2}$  cuando se considera solo el área del lago donde se observó la acumulación de  $CH_4$ . Este  $CH_4$  acumulado eventualmente se liberaría durante el mezclado de otoño, como se analizará en la siguiente sección. No se encontró una tendencia longitudinal en la  $C_{CH_4}$  en ningún lago o época del año.

La Figura 16 muestra los mapas de contorno de  $C_{CO_2}$  para LH y LL para las tres estaciones. Durante la primavera en LH, el  $C_{CO_2}$  disuelto estaba por debajo del límite de detección de nuestro método, es decir,  $0.15$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  (González-Valencia *et al.*, 2014), en cualquier posición o profundidad a lo largo del transecto del lago. Para descartar algunas fallas en nuestro método de medición, se midieron muestras de agua potable en equilibrio con el  $CO_2$  atmosférico utilizando nuestro método, que dieron lecturas positivas. Se concluyó que nuestros instrumentos estaban funcionando y que la  $C_{CO_2}$  estaba por debajo del límite de detección, que está muy por debajo del equilibrio de saturación atmosférico ( $23$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).



Esto último se confirmó midiendo los fluxes de CO<sub>2</sub> negativos, que se analizarán más adelante. En LH durante el verano y el invierno, la C<sub>CO2</sub> varió de 379.1 ± 419.0 a 101.3 ± 24.7 μmol L<sup>-1</sup>, con un claro gradiente de profundidad observado durante el verano. Ese gradiente se observó a la misma profundidad que la termoclina, la oxiclina y el perfil C<sub>CH4</sub>. En LL, la C<sub>CO2</sub> varió de 41.5 ± 8.2 a 144.0 ± 21.0 μmol L<sup>-1</sup> sin ningún gradiente de profundidad, lo cual concuerda con la columna de agua mezclada observada en todas las estaciones. Excluyendo los datos de primavera en LH, la C<sub>CO2</sub> fue de tres a cuatro órdenes de magnitud por encima de la saturación, con una concentración atmosférica de 410 ppmv, que fue la concentración atmosférica promedio medida 1 m por encima de la superficie de los lagos.

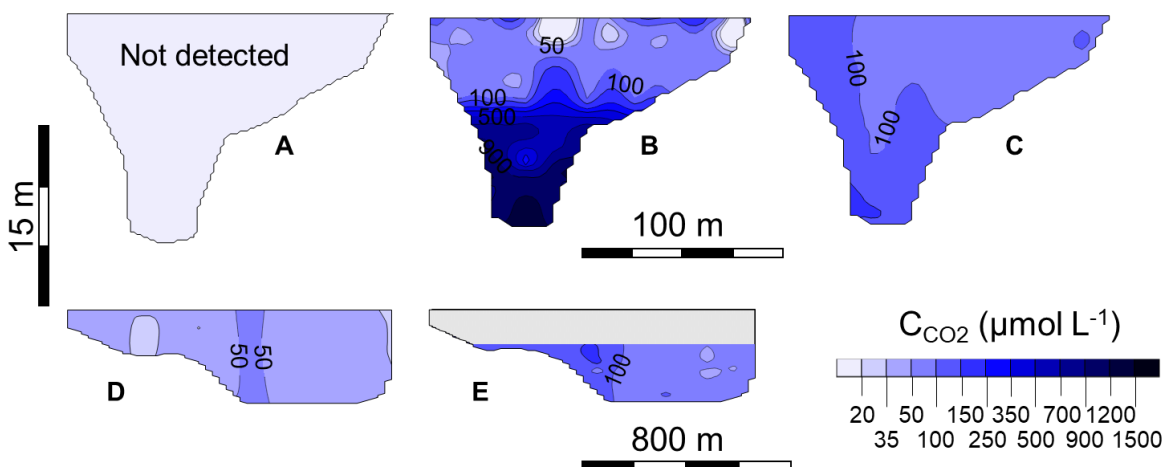


Figura 16 Transecto de los perfiles de C<sub>CO2</sub> del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

Durante el verano en LH, la C<sub>CO2</sub> promedio debajo de la termoclina fue 815.0 ± 276.4 μmol L<sup>-1</sup>. La masa total de CO<sub>2</sub> acumulada en el hipolimnion se estimó en 1277 kg para todo el lago, o 3,6 mol m<sup>-2</sup> cuando se considera solo el área del lago donde se observó la acumulación de CO<sub>2</sub>. Al igual que con el CH<sub>4</sub>, este CO<sub>2</sub> acumulado eventualmente se liberaría durante el mezclado de otoño, como se analizará más adelante. No se encontró una tendencia longitudinal en la C<sub>CO2</sub> en ningún lago durante ninguna temporada.

#### 6.2.4.4 Emisiones de gases de efecto invernadero

En ambos lagos y en todas las campañas, no se observó evidencia de ebullición, ya sea por observación visual o durante las mediciones de CDC. En un total de aproximadamente 630 mediciones de flux (que correspondieron a un tiempo de medición acumulado de 30 h), nunca se observaron aumentos abruptos en la concentración de CH<sub>4</sub> o CO<sub>2</sub>. Suponiendo tamaños de burbuja de 1 a 10 mm (DelSontro *et al.*, 2015) y un contenido de CH<sub>4</sub> en las burbujas del 70% (Walter Anthony *et al.*, 2010), cualquier burbuja que hubiera alcanzado el CDC habría generado un incremento en la concentración de CH<sub>4</sub> de 0.047 a 47 ppm. Un aumento en la concentración de CH<sub>4</sub> de esa magnitud habría sido detectado por el UGGA, que midió las concentraciones de CH<sub>4</sub> con una frecuencia de 1 Hz, sensibilidad de 1 ppb y ruido de aproximadamente 10 ppb. Como nuestras mediciones de flux incluyeron las zonas litorales de los lagos donde la ebullición se observa con mayor frecuencia (Keller y Stallard, 1994; Natchimuthu *et al.*, 2015), se concluyó que la ebullición no era un modo de emisión significativo y que la difusión dominaba.

La Figura 17 muestra los mapas de contorno del flux de CH<sub>4</sub>, que variaron de 0.009 a 4.47 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. En LH, el flux promedio de CH<sub>4</sub> fue 0.26 ± 0.13 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en primavera, 1.38 ± 1.03 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en verano y 0.105 ± 0.097 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en invierno. Los fluxes de CH<sub>4</sub> en verano en LH fueron significativamente más altos que los observados durante la primavera o el invierno (p < 0.05), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las emisiones de primavera e invierno. Suponiendo que cada una de las tres campañas fuera igualmente representativa de un tercio del año, las emisiones promedio de CH<sub>4</sub> de LH fueron 0.57 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, y las emisiones totales anuales de CH<sub>4</sub> de LH fueron 0.245 mol m<sup>-2</sup> (54.8 kg para toda la superficie del lago). Se debe incluir un componente de almacenamiento de 16.1 kg de CH<sub>4</sub> en las emisiones totales de CH<sub>4</sub> (como se estimó previamente a partir de la acumulación de CH<sub>4</sub> durante el verano en el hipolimnio), dando emisiones totales de 71.6 kg de CH<sub>4</sub>, de las cuales el 23% se emitiría durante el mezclado de otoño. Este porcentaje es relativamente bajo en comparación con los valores reportados para lagos templados (es decir, 45-80%: Bartosienwicz *et al.*, 2016; Encinas-Fernandez *et al.*, 2014; Striegl y Michmerhuizen, 1998). El componente de almacenamiento estimado en el presente trabajo está sujeto a algunos posibles errores significativos. Por un lado, la acumulación de CH<sub>4</sub> en el verano en el momento de la medición probablemente no era el máximo absoluto. Por otro

lado, nuestras estimaciones no incluyeron una cuantificación de la oxidación de CH<sub>4</sub> por la metanotrofia.

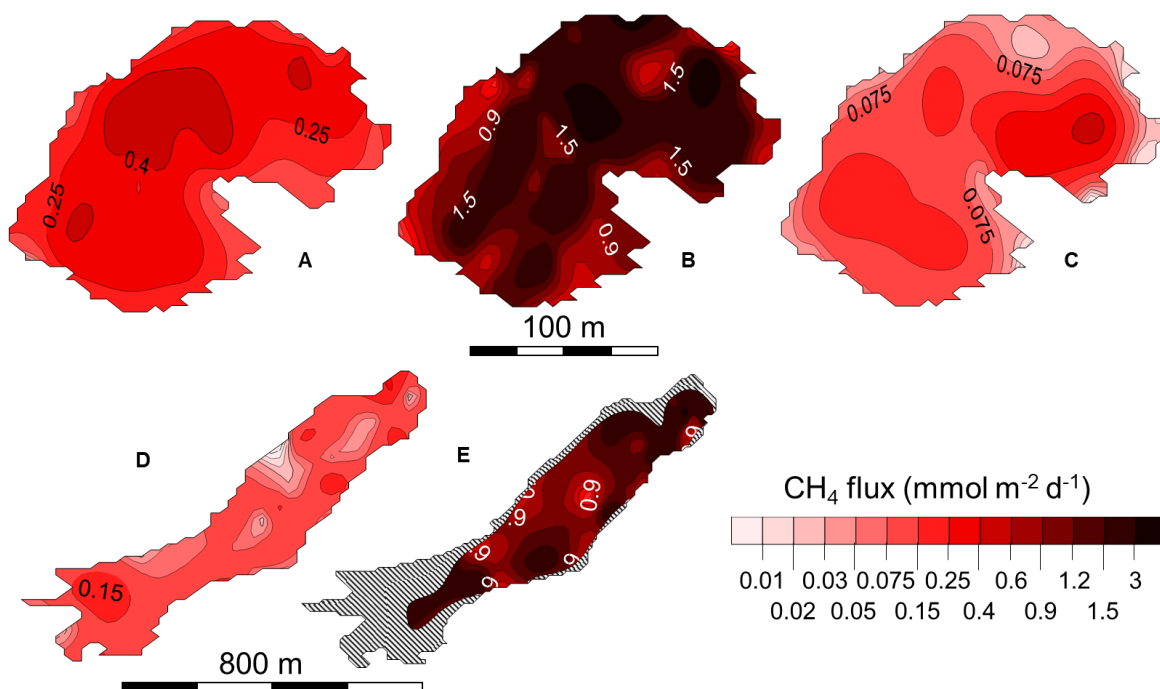


Figura 17 Fluxes de CH<sub>4</sub> del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

En LL, el flux promedio de CH<sub>4</sub> fue  $0.101 \pm 0.061$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en primavera y  $1.32 \pm 0.75$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en verano. Durante el invierno, cuando el lago estaba cubierto por hielo, no se detectaron fluxes, sin duda porque la capa de hielo actuaba como una barrera para el gas. El hielo superficial en LL es ocasional y no suele observarse durante largos períodos. Esto sugiere que el almacenamiento invernal (es decir, la acumulación de CH<sub>4</sub> disuelto y el almacenamiento bajo la cubierta de hielo) probablemente no sea un componente significativo de las emisiones anuales. Por lo tanto, las emisiones medias anuales se estimaron suponiendo que las emisiones medias invernales no fueron significativamente diferentes de las emisiones de la primavera, como se observó en LH. A partir de esa suposición, las emisiones promedio de CH<sub>4</sub> en LL se estimaron en  $0.508$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, lo que corresponde a un flux anual total de  $0.186$  mol m<sup>-2</sup>, que es semejante al flux anual de LH de  $0.208$  mol m<sup>-2</sup>.

La Figura 18 muestra los mapas de contorno del flux de CO<sub>2</sub>. En LH, el flux promedio de CO<sub>2</sub> fue  $-25.23 \pm 14.42$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en primavera,  $26.58 \pm 33.01$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en verano, y  $59.64 \pm 54.84$  mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en invierno. El flux de CO<sub>2</sub> en primavera en LH fue significativamente menor que los observados durante el verano o el invierno ( $p < 0.05$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las emisiones de verano y de invierno. Los fluxes de CO<sub>2</sub> negativos observados durante la primavera coincidieron con los valores de C<sub>CO2</sub> medidos que estaban por debajo de la concentración en equilibrio con la saturación atmosférica (Figura 16). Durante la primavera, LH fue, por lo tanto, un sumidero de CO<sub>2</sub>, comportamiento que ha sido reportado anteriormente en otros lagos con pH alcalino y C<sub>CO2</sub> por debajo de la saturación atmosférica (Bartosiewicz *et al.*, 2015; McGinnis *et al.*, 2015). La absorción de CO<sub>2</sub> observada en LH podría explicarse por el crecimiento intensivo de fitoplancton (Nõges *et al.*, 2016) o la conversión de CO<sub>2</sub> a bicarbonato/carbonato soluble y su posterior precipitación (Wanninkhof y Knox, 1996). Suponiendo que cada una de las tres campañas fuera igualmente representativa de un tercio del año, las emisiones de CO<sub>2</sub> promedio en LH se estimaron en 21.14 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, con emisiones anuales totales de CO<sub>2</sub> de 7.68 mol m<sup>-2</sup> (5547 kg para toda la superficie del lago). Al igual que con el CH<sub>4</sub>, se debe agregar un componente de almacenamiento de 1277 kg de CO<sub>2</sub> a las emisiones totales de CO<sub>2</sub> (estimado a partir de la acumulación de CO<sub>2</sub> en el hipolimnio durante el verano) que resulta en emisiones totales por 6824 kg de CO<sub>2</sub>, 19% del cual es emitido durante el mezclado en otoño.

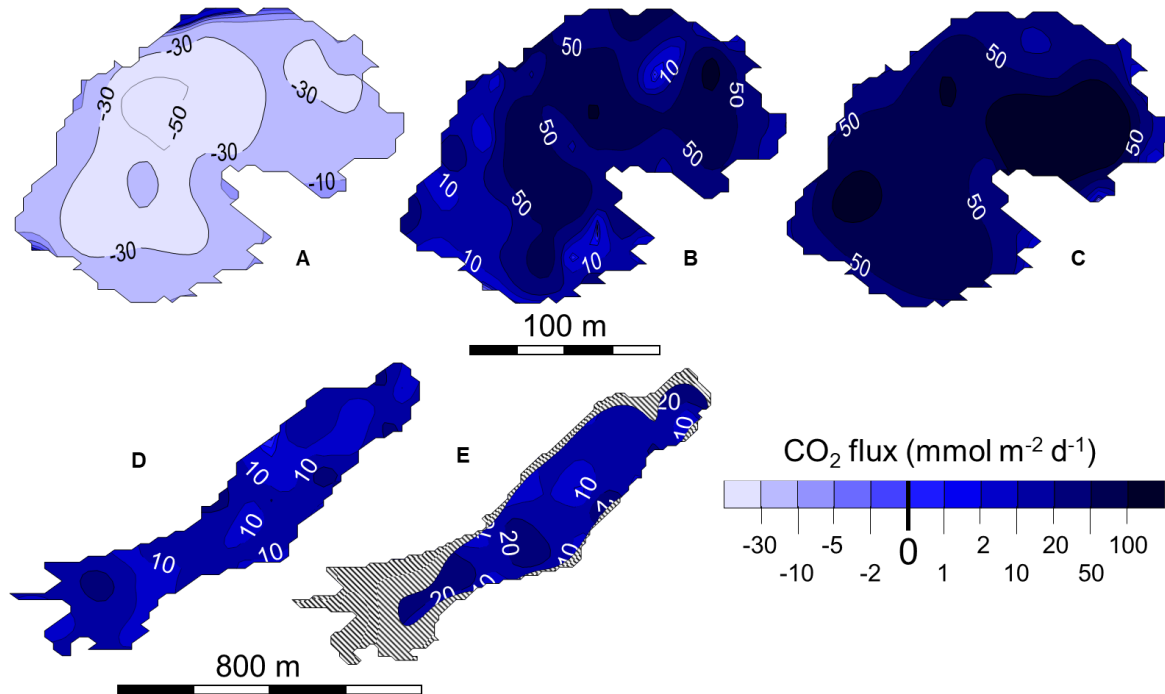


Figura 18 Fluxes de  $\text{CO}_2$  del Lago Hambre, LH, durante primavera (A), verano (B) e invierno (C), y del Lago Lynch, LL, durante primavera (D) y verano (E).

En LL, los fluxes promedio de  $\text{CO}_2$  fueron  $12.75 \pm 7.04 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  durante la primavera y  $11.79 \pm 6.66 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  durante el verano. Durante el invierno, no se detectaron fluxes de  $\text{CO}_2$  debido a la capa de hielo. Suponiendo que el almacenamiento bajo la capa de hielo no era un componente significativo de las emisiones anuales de  $\text{CO}_2$  en LL, y suponiendo que las emisiones medias invernales no difirieron significativamente de las emisiones de primavera, las emisiones de  $\text{CO}_2$  promedio en LL se estimaron en  $12.58 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Este valor corresponde a un flux anual de  $4.59 \text{ mol m}^{-2}$ , 40% menos que el flux anual de  $\text{CO}_2$  estimado para LH. En LH, el componente de almacenamiento representó el 19% del flux anual total, lo que sugiere que la ausencia de almacenamiento de  $\text{CO}_2$  en LL explica aproximadamente la mitad de la diferencia en los fluxes anuales observados entre LL y LH.

Las mediciones del flux en los lagos generalmente se realizan usando CDC o modelos basados en el viento (Cole y Caraco, 1998). La literatura sugiere que un CDC modifica las condiciones de contorno de la superficie en la interfaz agua/atmósfera, induciendo turbulencia en condiciones de poco viento pero reduciéndola en condiciones de viento

(Matthews *et al.*, 2003). Sin embargo, no existe un consenso actual sobre el mejor método, y aunque Vachon *et al.* (2010) indicaron una gran sobreestimación de los fluxes medidos por DCC (en comparación con los métodos basados en el viento), mientras que Bartosiewicz *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares de ambos métodos. Sin lugar a dudas, la presencia de una estructura flotante modifica las condiciones en la superficie del lago localmente, pero los métodos basados en el viento requieren una calibración frecuente para determinar el coeficiente de intercambio de gases, que generalmente se realiza con CDC (Schilder *et al.*, 2016). En este trabajo, se prefirió el método CDC porque permite la detección de ebullición, lo que no es posible con métodos basados en el viento. Además, la región de Magallanes se caracteriza por vientos fuertes que son muy cambiantes en dirección e intensidad y tienen ráfagas frecuentes de hasta  $30 \text{ m s}^{-1}$ , haciendo que los métodos basados en el viento sean menos confiables. No obstante, reconocemos que en las condiciones de viento durante el muestreo, el método SC puede haber subestimado los flujos de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .

#### 6.2.4.5. Dinámica de gases de efecto invernadero y comparaciones con lagos del norte

En general, las emisiones totales expresadas en equivalentes de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2 \text{ eq}$ ;  $25 \text{ g-CO}_2\text{-eq g}^{-1} \text{ CH}_4$ ; Shindell *et al.*, 2009) fueron de  $0.52 \text{ kg-CO}_2\text{-eq m}^{-2} \text{ y}^{-1}$  en LH y  $0.28 \text{ kg-CO}_2\text{-eq m}^{-2} \text{ y}^{-1}$  en LL, de los cuales las contribuciones de  $\text{CH}_4$  fueron 20 y 25% en LH y LL, respectivamente. Este porcentaje es menor que el estimado previamente por Tranvik *et al.* (2009), quienes sugirieron que el  $\text{CH}_4$  y el  $\text{CO}_2$  son igualmente responsables de las emisiones de gases de efecto invernadero de los lagos (en  $\text{CO}_2 \text{ eq}$ ). Sin embargo, Bastviken *et al.* (2011) estimaron que aproximadamente el 30% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero provienen del  $\text{CH}_4$  (en  $\text{CO}_2 \text{ eq}$ ). Holgerson y Raymond (2016) sugirieron que la contribución de  $\text{CH}_4$  (en  $\text{CO}_2 \text{ eq}$ ) del flux difusivo depende del área del lago y oscila entre 6% y 37% para lagos con áreas de  $0.1$  a  $1 \text{ km}^2$  y para lagos de un área inferior a  $0.001 \text{ km}^2$ , respectivamente.

Las comparaciones de los fluxes observados en el presente trabajo con los reportados para lagos y reservorios ubicados en otras regiones del mundo son difíciles, principalmente debido al clima oceánico único que se encuentra en la región subantártica de Magallanes. De hecho,

el principal atributo climático de la región es el rango relativamente pequeño de temperaturas promedio mensuales, con la diferencia entre el mes más frío y el más caluroso del año, de solo 10 °C. En comparación, en latitudes norteñas similares (53 °N), el rango de temperatura es de 31 °C en la región de Edmonton (Canadá), 27 °C a lo largo de las costas de Terranova y Labrador, y 19 °C en Alemania Central ([www.metoffice.gov.uk / hadobs](http://www.metoffice.gov.uk/hadobs)). En el hemisferio norte, el rango comparativamente grande para las temperaturas promedio mensuales resulta en largos inviernos cuando los lagos están cubiertos por hielo, modificando sustancialmente los ciclos biogeoquímicos de los lagos (Hampton *et al.*, 2016). Los veranos cortos pero cálidos también tienen una influencia. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, el clima oceánico subpolar de la región de Magallanes es solo comparable a las condiciones climáticas encontradas en el norte de Escocia, Tasmania y algunas islas de Alaska (Peel *et al.*, 2007). Las emisiones de gases de efecto invernadero de los lagos no se han reportado para ninguna de estas áreas.

A pesar de las diferencias climáticas, los fluxes promedio de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> medidos en el presente trabajo (es decir, 0.54 y 16.8 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente) estuvieron por debajo o dentro del rango promedio inferior informado para los lagos del norte (es decir, de 1.6 a 6.9 y de 4.8 a 2,900 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente) (Casper *et al.*, 2000; McGinnis *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2015; Encinas-Fernandez *et al.* al., 2014; Prairie and del Giorgio, 2013; St. Louis *et al.*, 2000; St. Louis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013). De acuerdo con Bastviken *et al.* (2011), los fluxes de CH<sub>4</sub> observados en el presente trabajo fueron menores que los fluxes difusivos reportados para lagos entre 25 y 54 °N, pero más altos que los observados en lagos ubicados entre 54 y 66 °N. Los fluxes medidos en el presente trabajo también estuvieron en el mismo rango que los reportados por Rasilo *et al.* (2015) (es decir, 0.003 a 20.5, y de -65.92 a 339.42 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente), quienes reportaron 224 lagos durante el verano ubicados entre 46 y 55 °N en Québec.

De manera similar, al excluir las concentraciones de verano del hipolimnio en LH, la C<sub>CH<sub>4</sub></sub> (0.1 a 13.4 μmol L<sup>-1</sup>) estuvo dentro del rango previamente reportado para los lagos norteños (2 a 18 μmol L<sup>-1</sup>) (Casper *et al.*, 2000; McGinnis *et al.* 2015; Encinas-Fernandez *et al.*, 2014;

Rasilo *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2014). Las  $C_{CO_2}$ , una vez más al excluir la hipolimnion de LH en verano, oscilaron entre 0 y  $143 \mu\text{mol L}^{-1}$ , y estuvieron dentro del rango informado para los lagos norteros (Casper *et al.*, 2000; Halbedel y Koschorreck, 2013; Rasilo *et al.* al. 2015).

En contraste, la ausencia de fluxes ebullitivos en los lagos sub-Antárticos es una diferencia significativa de los lagos del norte. De hecho, a pesar de las limitaciones técnicas de los métodos existentes para cuantificar correctamente los fluxes ebullitivos (DelSontro *et al.*, 2011; Wik *et al.*, 2016), Bastviken *et al.* (2011) estimaron que la ebullición es con mucho el componente de emisión más importante del flux total de los lagos del norte. La razón por la cual no se observó ebullición en los lagos del sur no está clara. La principal diferencia entre las latitudes septentrional y meridional es climática, ya que las latitudes septentrionales presentan climas más contrastantes. Una segunda diferencia está en el tipo de ecosistema forestal que rodea los lagos. Los bosques subpolares de Magallanes están dominados por las especies de *Nothofagus*, que son muy diferentes a los bosques boreales de las especies *Picea* y *Betula* que se encuentran en latitudes similares en el norte de América y también a los bosques mixtos de Europa. Las diferencias climáticas y de los ecosistemas entre los hemisferios norte y sur son lo suficientemente grandes para implicar que se pueden encontrar diferencias significativas en el funcionamiento de sus respectivos lagos, aunque actualmente no se puede presentar ninguna teoría.

En todas las estaciones y en ambos lagos, se encontró una correlación lineal entre los fluxes de  $CH_4$  y de  $CO_2$ , con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para LH de 0.87, 0.59 y 0.98, respectivamente, en primavera, verano e invierno, y para LL de 0.77 y 0.79 en primavera y verano, respectivamente. Excepto durante la primavera en LH, que dio una correlación negativa (es decir, mayores fluxes de  $CH_4$  se asociaron con mayores fluxes negativos de  $CO_2$ ), todas las correlaciones indicaban que son el aumento en los fluxes de  $CO_2$  los fluxes de  $CH_4$  aumentaban. La relación de flux de  $CO_2$  a  $CH_4$  fue muy variable, variando de 4 a  $720 \text{ mmol-CO}_2 \text{ mmol-CH}_4^{-1}$ . Las relaciones más altas se observaron en LH durante el invierno, mientras que las relaciones más bajas se observaron en LH durante la primavera. Las mayores proporciones de invierno podrían explicarse por la sensibilidad a la temperatura de los



metanógenos, que son arqueas mesófilas con una temperatura óptima en el rango de 35 a 42 °C (Zeikus y Winfrey, 1976).

Las distribuciones espaciotemporales de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se cuantificaron utilizando el coeficiente de variación (CV), que es la relación entre la desviación estándar y la media. El CV indica la cantidad de dispersión alrededor de la media en un conjunto de valores de datos. En LH, el CV de fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fue respectivamente de 50.3 y 62.2% en primavera, 70.7 y 83.5% en verano, y 102.9 y 101.8% en invierno. En LL, el CV de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fue respectivamente 60.9 y 56.5% en la primavera y 56.5 y 51.8% en el verano. Al combinar datos de flux de todas las estaciones en un lago dado, los valores CV (que representan la distribución espaciotemporal) para CH<sub>4</sub> fueron 119.2% en LH y 153.7% en LL. De manera similar, los valores de CV espaciotemporales para el CO<sub>2</sub> fueron 174.4% en LH y 98.7% en LL. En comparación, Bastviken *et al.* (2011) reportaron un CV promedio de 150% para las emisiones de CH<sub>4</sub> entre los lagos ubicados dentro de un rango de latitud dado, y Rasilo *et al.* (2015) informaron un CV de 227% entre los fluxes difusivos de CH<sub>4</sub> en 224 lagos del norte. Esta diferencia drástica en los valores de CV indica que la variación en los fluxes dentro de un lago dado es mucho menor que la variación entre los lagos.

Para explorar más a fondo la variación espaciotemporal de los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, se probaron las correlaciones entre los fluxes y la profundidad del lago. En nuestro caso, no se encontró ninguna correlación en ningún lago durante ninguna campaña. Esto puede explicarse por la ausencia de ebullición en los lagos estudiados, como Wik *et al.* (2016), West *et al.* (2016), Bastviken *et al.* (2004) y Keller y Stallard (1994) mostraron un aumento en la probabilidad de ebullición con profundidad decreciente, causando mayores fluxes ebullitivos en las zonas litorales de los lagos. La ausencia de correlación entre los fluxes y la profundidad sugiere que los cambios en el nivel del agua en LL no tuvieron ningún efecto sobre los fluxes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se informa por primera vez el ciclo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en un lago y un reservorio ubicado en la región de Magallanes, un área continental única en latitudes entre 45 y 55 °S. El área de la región es de 461,212 km<sup>2</sup> (IGM,

2008), de los cuales el 9.02% está cubierto por lagos (Verpoorter *et al.*, 2014) o un área total de lagos de aproximadamente 41,600 km<sup>2</sup>. Suponiendo que las emisiones observadas en el presente trabajo sean representativas de la región, las emisiones anuales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> de los lagos en el área equivaldrían a 0.13 y 11.2 Tg de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente. Según las estimaciones actuales (Bastviken *et al.*, 2011; Tranvik *et al.*, 2009), estas emisiones anuales representarían alrededor del 0.13% y el 0.80% de las emisiones mundiales de agua dulce de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente. Por lo tanto, las emisiones de gases de efecto invernadero de la región de sub-Antártica de Magallanes son marginales en el contexto mundial.

### 6.2.5 Conclusiones

La ecorregión sub-Antártica de Magallanes, que es un área continental única en el mundo entre las latitudes 45 y 55 °S, ha sido poco estudiada y los lagos de esta región no han sido contabilizados en las estimaciones de las emisiones globales de gases de efecto invernadero. Este estudio estacional del ciclo del CH<sub>4</sub> en un lago y un reservorio reveló que estos lagos no eran significativamente diferentes de los lagos templados ubicados en latitudes septentrionales similares. Los dos lagos subantárticos fueron fuentes netas de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Sus concentraciones disueltas de gases de efecto invernadero y las emisiones a la atmósfera se encontraban dentro del rango medio informado anteriormente para los lagos del norte. Específicamente, se observó que el lago menos profundo era polimíctico, probablemente como resultado de los fuertes vientos en la región, mientras que el lago más profundo era monomíctico y estaba sujeto a una estratificación extrema durante el verano. El régimen de mezcla no tuvo un efecto claro sobre el flux difusivo, pero tuvo un efecto sobre las emisiones de almacenamiento. Alrededor de un cuarto del flux total anual de los gases efecto invernadero se emitió a través de la vía de almacenamiento en el lago monomíctico. Los lagos sub-Antárticos no son claramente diferentes de sus análogos del norte, y podrían incluirse en la base de datos de lagos sin cambios significativos en las estimaciones globales de las emisiones de gases de efecto invernadero de los ecosistemas acuáticos.



## 6.3 Oxidación aerobia de metano en ecosistemas de agua dulce

**Oscar Gerardo-Nieto**, Frederic Thalasso

Artículo en proceso de escritura.

### 6.3.1 Resumen

La oxidación aerobia de CH<sub>4</sub> en lagos es el principal componente mitigados de las emisiones de este a la atmosfera (Utsumi *et al.*, 1997). En la actualidad se emplean 5 métodos para medir la actividad metanotrófica, los cuales son; difusión, asimilación, incubaciones potenciales, incubaciones potenciales ajustadas e incubaciones en condiciones reales. En el presente trabajo se determinó en una amplia variedad de ecosistemas la actividad metanotrófica aerobia en condiciones reales y estos resultados fueron comparados con el método más reportado, i.e. incubaciones potenciales, además de identificar los principales factores que influyen en el proceso.

Los resultados indicaron que el principal factor limitante en el proceso es la disponibilidad del CH<sub>4</sub>, en cuanto a las características batimétricas, los lagos más profundos correspondieron a los lagos donde mayo porcentaje de CH<sub>4</sub> producido en los sedimentos fue oxidado. Por último, al comparar los resultados entre ambos métodos utilizados, se encontró una clara tendencia en los métodos de incubaciones potenciales, los cuales sobreestima la metanotrofía entre 5 y 1,000 veces.

### 6.3.2 Introducción

El CH<sub>4</sub> es un importante gas de efecto invernadero, por lo tanto, conocer los procesos involucrados en su emisión a la atmósfera es de gran relevancia en el contexto global del cambio climático. En este sentido, los ecosistemas de agua dulce juegan un papel primordial. En efecto, a pesar de solo cubrir 3.7% de la superficie terrestre (Verpoorter *et al.*, 2006) se estima que emiten 0.095 Pg C año<sup>-1</sup> de CH<sub>4</sub> o 16% de las emisiones totales de CH<sub>4</sub> a la atmósfera (Saunois *et al.* al. 2011).

Las emisiones de CH<sub>4</sub> en los ecosistemas acuáticos, dependen de dos bioprocesos antagónicos; la producción de CH<sub>4</sub> o metanogénesis, y la oxidación de CH<sub>4</sub>. La oxidación aerobia de metano (MO), también llamada metanotrofia, es el principal componente mitigador en ecosistemas de agua dulce (Utsumi *et al.*, 1997). Se ha estimado que entre 40 y 100% del CH<sub>4</sub> producido en los ecosistemas de agua dulce se oxida biológicamente (Utsumi *et al.*, 1997; 1998; Striegl y Michmerhuizen, 1998; Kankaala *et al.*, 2006; Bastviken *et al.*, 2008).

La MO ha sido estudiada desde principios de 1970 (Rudd *et al.*, 1974), siendo el monitoreo de la concentración de CH<sub>4</sub> (C<sub>CH4</sub>) el principal método reportado en literatura. En este método, la pendiente de la C<sub>CH4</sub> en el tiempo representa la velocidad de oxidación aerobia de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, la ausencia de métodos que permiten determinar directamente la concentración de CH<sub>4</sub> en agua, hacen que esos ensayos se realicen en presencia de un espacio de cabeza, donde la C<sub>CH4</sub> es medida. Debido a la poca solubilidad del CH<sub>4</sub> en el agua es necesario que el espacio de cabeza sea enriquecido en CH<sub>4</sub>, y la adición de aire en el espacio de cabeza (para evitar el desarrollo de condiciones anaerobias) también significa un enriquecimiento del sistema en oxígeno. Esas condiciones modifican sustancialmente las condiciones de CH<sub>4</sub> en la muestra, con respecto a las condiciones existentes en el ecosistema acuático. Los ensayos realizados en esas condiciones modifican la cinética de oxidación del CH<sub>4</sub> (Web *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos bajo esas condiciones deben de considerarse como “velocidad potencial de MO” (R<sub>MOP</sub>) porque corresponden al potencial oxidativo de las poblaciones metanotróficas; i.e., sin limitación por CH<sub>4</sub> u O<sub>2</sub>.

Para evitar los inconvenientes inherentes a los métodos con espacio de cabeza, Janasch (1975) propuso un método de incubación sin espacio de cabeza, que permite por lo tanto incubar las muestras y determinar la velocidad de MO bajo condiciones *in situ*. Más tarde, Kankaala *et al.* (2006) desarrolló un método semejante al método de Janasch (1975) en el cual jeringas de vidrio, herméticas a los gases, son usadas como viales de incubación. En intervalos regulares, se toman submuestras que son usadas para determinar la  $C_{CH_4}$ . Los resultados obtenidos en esas condiciones deben de considerarse como “velocidad real de MO” ( $R_{MOR}$ ) porque corresponden a la actividad oxidativa real de las poblaciones metanotróficas.

A pesar de la existencia de métodos para determinar de actividad metanotrófica en condiciones reales, en la mayoría de los estudios reportados en la literatura se usan métodos con espacio de cabeza. Pocos son los estudios que se han realizado en condiciones reales. Adicionalmente, la mayoría de los estudios previos realizados con espacio de cabeza, no reconocen la alteración de las condiciones de incubación y consideran los valores de  $R_{MOP}$  como valores representativos del ecosistema. Miller *et al.* (2004) reconocieron el impacto de dicha confusión entre ensayos potenciales y reales, subrayando la importancia de medir la MO manteniendo las condiciones naturales en los ensayos.

Adicionalmente, a los métodos de determinación de actividad metanotrófica, potenciales y reales, la literatura (Chi *et al.*, 2015; Bae y Rittmann, 1996; Segers, 1998) reporta el uso de un método de corrección de los valores  $R_{MOP}$ , para tomar en cuenta las condiciones de  $C_{CH_4}$  y OD existentes en el ecosistema. Mediante ese método corregido, se determina un valor de actividad metanotrófica que llamaremos  $R'_{MOP}$ . Ese método se basa en un modelo de Monod de doble sustrato que considera la concentración de  $CH_4$  y  $O_2$  disueltos, y donde se toma en cuenta valores de constantes de afinidad para ambos compuestos.

Cabe mencionar que la literatura reporta también valores de actividad metanotrófica basadas en perfiles de concentración de  $CH_4$  en la columna de agua. Ese método, que llamaremos “método de difusión” considera que cualquier desviación del perfil de concentración de  $CH_4$

con respecto a un modelo de difusión, se debe a la oxidación (o producción) de CH<sub>4</sub> (Bastviken *et al.*, 2012; Schmale *et al.*, 2012). Finalmente, la literatura reporta trabajos de determinación de la actividad metanotrófica mediante la determinación de la asimilación de CH<sub>4</sub> marcado (<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>). Ese método será denominado a continuación como “método de asimilación” (Bastviken *et al.*, 2002; Granin *et al.*, 2012).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el impacto que ha tenido el uso del método de espacio de cabeza en las estimaciones globales de la actividad metanotrófica en lagos, y a la par, reportar valores de R<sub>MOR</sub> en una diversidad de lagos, cubriendo un amplio rango de latitudes, climas, así como características batimétricas y fisicoquímicas. Para cumplir con ese objetivo nuestro planteamiento fue realizar un estudio exhaustivo de la literatura y aplicar un método de determinación de actividad real metanotrófica en el mayor número posible de lagos. Nuestra hipótesis fue que, comparando la R<sub>MOP</sub> obtenida a partir de ensayos potenciales y la R<sub>MOR</sub> obtenida a partir de ensayos en condiciones reales, disminuirá la estimación de la contribución de la metanotrofia en el ciclo global del CH<sub>4</sub>.

### 6.3.3 Materiales y métodos

#### 6.3.3.1 Sitio de estudio

Este estudio incluyó la caracterización de 14 lagos diferentes, en los cuales se tomaron muestras en 1, 2 o 3 estaciones diferentes (Tabla 3). En cada lago se midieron los principales componentes del ciclo de CH<sub>4</sub>, a saber, la concentración de gases de efecto invernadero (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>; C<sub>GEI</sub>), las emisiones de GEI y, por supuesto la R<sub>MOR</sub>.

*Tabla 3 Ecosistemas seleccionados, región, estación y coordenadas.*

#	Nombre del lago	Región	Estación	Latitud	Longitud
1	SIL 1	Siberia	Verano	67.5347	86.6358
2	SIL 3	Siberia	Verano	67.5254	86.6163
3	SIL 4	Siberia	Verano	67.5243	86.6134
4	SIL 2	Siberia	Verano	67.5135	86.5915
5	Goldstream	Alaska	Verano	64.9160	147.8470
6	Killarney	Alaska	Verano	64.8700	-147.9010
7	Otto	Alaska	Verano	63.8420	-149.0370

8	Nutella	Alaska	Verano	63.2150	-147.6780
9	Llano	México	Primavera	19.6577	-99.5069
10	Llano	México	Verano	19.6577	-99.5069
11	Guadalupe	México	Primavera	19.6319	-99.2577
12	Guadalupe	México	Verano	19.6319	-99.2577
13	Lynch	Patagonia	Verano	-53.1600	-70.9200
14	Lynch	Patagonia	Invierno	-53.1600	-70.9200
15	Lynch	Patagonia	Verano	-53.1600	-70.9200
16	Hambre	Patagonia	Verano	-53.6035	-70.9526
17	Hambre	Patagonia	Invierno	-53.6035	-70.9526
18	Hambre	Patagonia	Verano	-53.6035	-70.9526
19	Fack	Cabo de Hornos	Verano	-54.9314	-67.3317
20	Castor	Cabo de Hornos	Verano	-54.9390	-67.6390

### 6.3.3.2 Muestreo y medición de campo

En cada uno de los muestreos, se midió la profundidad del lago en al menos 20 lugares con una sonda portátil (Depthmate Portable Sounder, Speedtech, EE. UU.). La ubicación de cada punto se determinó mediante GPS (eTrex 20, Garmin, EE. UU.). El área superficial de los lagos ( $A_w$ ) se obtuvo a través del análisis de imágenes aéreas. El volumen del lago ( $V$ ) se determinó a partir de las mediciones de profundidad y área. En cada lago, se estableció una estación de muestreo, cerca del centro del lago, generalmente donde se localizaba la zona más profunda del mismo. La temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto (DO) se midieron en la columna de agua, desde la superficie hasta los sedimentos, en intervalos de profundidad de 1 m, utilizando una sonda multiparamétrica (HI 9828, Hanna Instruments, México). La densidad del agua, calculada a partir de la temperatura de esta (Tanaka *et al.*, 2001) se utilizó para determinar la estabilidad relativa de la columna de agua (RWCS, Padisak *et al.*, 2003; Ec. 11).

$$RWCS = \frac{D_B - D_S}{D_4 - D_5} \quad (11)$$

Donde  $D_B$  es la densidad del agua del fondo,  $D_S$  es la densidad del agua superficial, y  $D_4$  y  $D_5$  son las densidades del agua a 4 °C y 5 °C, respectivamente (Kalff, 2002). Los lagos con  $RWCS > 56.5$  se consideraron completamente estratificados, los lagos con  $RWCS < 16.3$  se consideraron completamente mezclados, y aquellos con valores de RWCS intermedios se consideraron parcialmente estratificados (Branco *et al.*, 2009). La profundidad de la



termoclina se determinó a partir de la estabilidad de la columna de agua, de acuerdo con el método de Coloso *et al.* (2010).

Se midió la concentración de CH<sub>4</sub> disuelto (C<sub>CH<sub>4</sub></sub>) en la columna de agua utilizando el método propuesto por González-Valencia *et al.* (2014). Este método consiste en un módulo de intercambio gas/líquido (PDMSXA-1000, Medarray Inc., EE. UU.) compuesto por una serie de fibras de silicon huecas con un área de intercambio total de 0.1 m<sup>2</sup>, donde nitrógeno libre de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fluye por el lumen (interior de las membranas) y el agua fluye por el exterior. Debido a la fuerza de difusión una parte proporcional a la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto en el agua es transferida a la fase gaseosa, donde es medida por un detector portátil de gases efecto invernadero (UGGA, Los Gatos Research, EE. UU.).

También se midieron las emisiones de CH<sub>4</sub> con el método de cámara dinámica cerrada (CDC) conectada a un UGGA en circuito cerrado. El flux se determinó usando la Ecuación 13 donde  $F$  es el flux (mg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>),  $\Delta C$  es el cambio en la concentración de CH<sub>4</sub> observado en el CDC durante el intervalo de tiempo ( $\Delta t$ ),  $V_{CDC}$  es el volumen de la CDC (7.8 L) y  $A_{CDC}$  es el área de la CDC en contacto con la superficie del agua (0.096 m<sup>2</sup>).

$$F = \frac{\Delta C}{\Delta t} \cdot \frac{V_{sc}}{A_{sc}} \quad (13)$$

### 6.3.3.3 Medición de oxidación de metano

Con el objetivo de medir la actividad metanotrófica en la zona aerobia de la columna de agua, se tomaron muestras a profundidades seleccionadas en base a la concentración de DO, en al menos 2 puntos de la columna óxica de agua, a saber, en la superficie (20 cm por debajo de la interfaz aire/agua) y en la oxiclina (zona de la columna de agua donde ocurre la transición entre zona óxica y anóxica). En lagos donde la oxiclina estaba a más de 1m de profundidad, se tomaron muestras en intervalos de hasta 1 m para describir el proceso con mayor resolución. La velocidad MO fue medida en condiciones *in situ* de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub> (R<sub>MOR</sub>), y en condiciones potenciales (R<sub>MOP</sub>).

El método para determinar la  $R_{MOR}$  consistió en medir el decremento de  $C_{CH_4}$  con el tiempo en muestras de agua, incubadas en jeringas de vidrio de 10 mL bajo condiciones *in situ*. De forma práctica el método consistió en coleccionar muestras de agua a la profundidad deseada, mediante una botella de Van Dorn (Wildco. EE. UU.), y llenar con esa agua jeringas cuidadosamente enjuagadas con agua de la muestra deseada, antes de ser llenadas tomando la precaución de que ninguna burbuja de gas queda atrapada. Las jeringas fueron cerradas con una válvula de tres vías e incubadas a una temperatura igual a la del lago de donde provenían las muestras. A intervalos regulares, sub-muestras fueron transferidas a una jeringa secundario de polipropileno de 10 mL, donde se estableció por agitación un equilibrio gas/líquido con un espacio de cabeza de nitrógeno ( $N_2$ ; libre de  $CH_4$  y  $CO_2$ ). Una vez alcanzado el equilibrio, se inyectó el espacio de cabeza de la jeringa de equilibrio en un flujo continuo de  $N_2$ , para ser analizado por un detector UGGA. La  $C_{CH_4}$  en las submuestras de agua se determinó con el método de concentración en el espacio de cabeza (Magen *et al.*, 2014), a partir de la aplicación de la ley de Henry (Ec. 16); donde  $H_T$  es la constante de Henry ( $mol\ kg^{-1}\ atm^{-1}$ ), a la temperatura T. La velocidad de MO se calculó mediante la regresión lineal de la disminución de la  $C_{CH_4}$  en el tiempo, donde se consideró como MO sólo aquellas donde la disminución de  $C_{CH_4}$  fue significativa ( $p < 0.05$ ) y donde el coeficiente de correlación correlación lineal fue superior a 0.80.

$$H_T = H_{298.15} \cdot e^{\tau \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right)} \quad (12)$$

El método para medir  $R_{MOP}$ , consistió en medir el decremento de  $C_{CH_4}$  con el tiempo en muestras de agua, incubadas en jeringas de polipropileno de 50 mL con un espacio de cabeza de aire enriquecido con  $CH_4$  (0.1 ml de  $CH_4$  añadido). La  $R_{MOP}$  fue considerada como la velocidad máxima, debido a las condiciones en las que se llevó a cabo en condiciones. En la literatura (Chi *et al.*, 2015; Bae y Rittmann, 1996; Segers, 1998) se reporta el uso de un método de corrección de los valores  $R_{MOP}$ , para tomar en cuenta las condiciones de  $C_{CH_4}$  y OD existentes en el ecosistema. Mediante ese método corregido, se determina un valor de actividad metanotrófica que llamaremos  $R'_{MOP}$ . Ese método se basa en un modelo de Monod de doble sustrato (Ec. 14) en el que  $C_{CH_4}$  y  $C_{O_2}$  representan la concentración de  $CH_4$  y  $O_2$

disueltos, y  $K_{SCH_4}$  y  $K_{SO_2}$  son las constantes de afinidad aparente de la comunidad metanotrófica, para  $CH_4$  y  $O_2$ , respectivamente.

$$MO = MO_{max} \frac{C_{CH_4}}{K_{SCH_4} + C_{CH_4}} \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{SO_2} + C_{O_2}} \quad (14)$$

Los valores de  $K_{SCH_4}$  y  $K_{SO_2}$  utilizados en el presente trabajo corresponden a los reportados en la literatura para lagos con características semejantes a los lagos estudiados ( $K_{SCH_4}$   $0.110 \pm 0.053$  mg L<sup>-1</sup>; Liikanen *et al.*, 2002; Lofton *et al.*, 2014;  $K_{SO_2}$   $0.624 \pm 0.064$  mg L<sup>-1</sup>; Lidstrom y Somers, 1984; Frenzel *et al.*, 1990).

#### 6.3.3.4 Análisis estadístico

La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Como la mayoría de los datos no se distribuyeron normalmente y tenían un número desigual de muestras, las diferencias significativas entre todos los parámetros se determinaron mediante la prueba Kruskal-Wallis de comparación múltiple (las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0.05$ ,  $Z > 1.96$ ). Las diferencias significativas entre  $C_{CH_4}$  en el tiempo se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA,  $p < 0.05$ ), después de que la normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software del sistema de análisis estadístico NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, EE. UU.). También se realizaron regresiones lineales para determinar las tasas de MO utilizando Wolfram Mathematica 7.0 (Wolfram, Minneapolis, MN, EE. UU.). Los valores medios se calcularon para todos los puntos de muestreo.

#### 6.3.4 Resultados y discusión

Se realizó una revisión exhaustiva a la literatura, en la cual se encontraron más de 200 valores de velocidad de MO en condiciones aerobias (Figura 19). Tal como mencionado en la introducción, se identificaron cinco formas principales de determinar la actividad metanotrófica, las cuales son; (i) métodos de difusión, (ii) métodos de asimilación, (iii) métodos de actividad potencial ( $R_{MOP}$ ), (iv) métodos de actividad potencial corregida ( $R'_{MOP}$ ), y (v) métodos de actividad real ( $R_{MOR}$ ). La Figura 19 muestra los valores

encontrados en la literatura, donde se distinguen las principales formas para determinar la actividad metanotrófica. La técnica más usada en la literatura es el método de actividad potencial (n=174), es decir, bajo condiciones diferentes a las del ecosistema acuático de donde provino la muestra (adición de un espacio de cabeza enriquecido en CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>). Al respecto, en ≈60% de los casos, el resultado obtenido en condiciones potenciales es ajustado y considerado tal. Por otro lado, los modelos nos dan luz de la velocidad del proceso de oxidación del CH<sub>4</sub>, al proporcionar estimaciones globales, y basarse en valores teóricos están sujetos a una importante incertidumbre (Miller *et al.*, 2004).

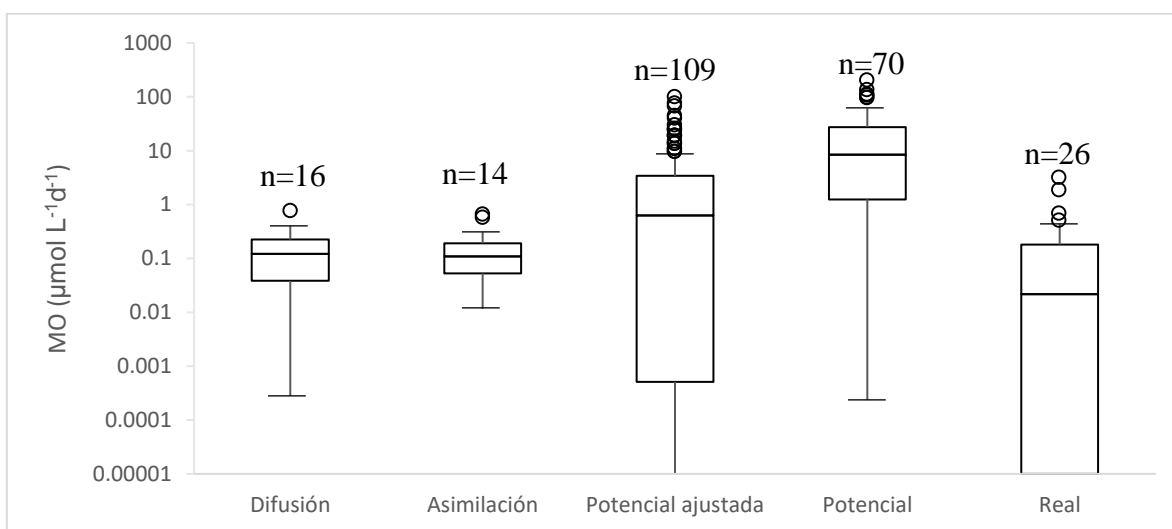


Figura 19. Valores reportados en la literatura con los cinco métodos identificados. Cada punto representa la velocidad reportada para una muestra. La división horizontal en las cajas representa la media de los valores reportados. Las cajas delimitan los cuartiles 25 y 75. Los bigotes son el mínimo y máximo, mientras que los valores atípicos (círculos) fueron los que cayeron fuera de 1.5 veces el rango intercuartil (IQR), i. e. límite inferior =  $Q_1 * 1.5 IQR$ , y límite superior =  $Q_3 * 1.5 IQR$ .

#### 6.3.4.1 Lagos estudiados y sus características fisicoquímicas

Como se mencionó, se caracterizaron 14 ecosistemas, 10 lagos en 1 temporada, 2 lagos en 2 temporadas y 2 en 3 temporadas. Los datos geográficos y batimétricos de los lagos se resumen en la Tabla 1. La profundidad de los lagos varió entre 2.5 y 20 m, siendo los lagos #7 y #5 los lagos menos profundos y el lago #12 el lago más profundo. Por otro lado, el lago

#3 fue el más pequeño con un volumen de 18,200 m<sup>3</sup> y el lago #12 el más grande, con un volumen de 21'762,800 m<sup>3</sup>.

*Tabla 4 Ecosistemas seleccionados, estación, área total (A<sub>w</sub>; m<sup>2</sup>), profundidad máxima (Z<sub>max</sub>; m), profundidad promedio (Z<sub>m</sub>; m), profundidad de la termoclina (Z<sub>t</sub>; m) y régimen de mezclado (RWCS).*

#	Nombre del lago	Estación	A <sub>w</sub>	Z <sub>max</sub>	Z <sub>m</sub>	Z <sub>t</sub>	RWCS
1	SIL 1	Verano	24,862	9.7	3.9	2.5	195.3 (S)
2	SIL 3	Verano	23,154	5.5	2.1	2.5	133.2 (S)
3	SIL 4	Verano	4,732	9.3	3.8	2.5	182.1 (S)
4	SIL 2	Verano	33,434	8.1	5	2.5	149.3 (S)
5	Goldstream	Verano	8,715	2.5	2.3	1.5	202.9 (S)
6	Killarney	Verano	8,997	2.8	1.9	1.0	89.0 (S)
7	Otto	Verano	426,850	2.5	2.3	----	2.42 (M)
8	Nutella	Verano	195,978	9.5	3.5	5.0	150.5 (S)
9	Llano	Primavera	46,495	17	4.8	2.0	98.2 (S)
10	Llano	Verano	39,446	16	4.7	----	15.8 (M)
11	Guadalupe	Primavera	1'155,559	14	6.2	2.0	106.4 (S)
12	Guadalupe	Verano	3'639,265	20	6	3.0	67.9 (S)
13	Lynch	Verano	262,000	5	5	----	2.4 (M)
14	Lynch	Invierno	127,000	8.2	2.5	----	5.9(M)
15	Lynch	Verano	262,000	6	ND	1.0	95.8 (S)
16	Hambre	Verano	16,400	19.7	6.2	6.0	66.5 (S)
17	Hambre	Invierno	16,400	19.7	6.2	----	0.8 (M)
18	Hambre	Verano	16,400	19.7	6.2	8.0	51.1 (S)
19	FAK	Verano	7,676	3	1.8	1.0	102.7 (S)
20	Castor	Verano	17,950	3.7	3.0	1.0	68.2 (S)

RWCS: M, mezclado; S, estratificado

Durante los muestreos, 15 lagos estuvieron estratificados y 5 mezclados. La termoclina en los lagos estratificados se localizó entre 1 y 6 metros, siendo el lago #16, el lago con el epilimnio más profundo y la estructura de columna de agua más estratificada. Por otro lado, dos de los lagos menos profundos (menos de 3 metros) estuvieron fuertemente estratificados con una diferencia de temperatura entre la superficie y el fondo, superior a 5.5 y 10 °C (lagos #6 y #5, respectivamente), probablemente como resultado de la baja temperatura de los sedimentos (región subártica, con permafrost). Por otro lado, los lagos #13, #14 y #15, siempre estuvieron mezclados, a pesar de la profundidad de la columna de agua, comportamiento probablemente provocado por los fuertes vientos que azotan la zona (Joyce y Jewell, 2003). La estabilidad térmica de la columna de agua no fue correlacionada con la

profundidad del lago, debido a que este proceso depende de muchos factores, incluyendo; la temperatura de los sedimentos, la velocidad del viento, la temperatura ambiental y otros factores ambientales. El promedio del pH en todos los lagos fue de  $7.5 \pm 0.8$ , valor dentro del rango óptimo para la metanotrofia (Hanson y Hanson, 1996; Witterbury *et al.*, 1970). El pH de los lagos individuales osciló entre  $5.95 \pm 0.45$  y  $9.08 \pm 0.02$  correspondiente a los lagos #3 y #7 respectivamente. Cuando se observó la estratificación térmica, también se observó un gradiente de pH (e.g. lago #16, #10 y #3).

#### 6.3.4.2 Gases disueltos

La concentración de DO por encima de la oxiclina fue altamente variable, oscilando entre  $1.36 \pm 0.53$  y  $11.21 \pm 0.65$  mg L<sup>-1</sup>. En la mayoría de los casos, los lagos estratificados presentaron un hipolimnio anaerobio. El comportamiento del DO en los lagos estratificados evidencio un amplio rango en la velocidad respiratoria, usando el desfase entre la oxiclina y la termoclina como indicador de la actividad respiratoria. En efecto, observamos lagos donde la oxiclina estaba por encima de la termoclina (#12 y # 3), lo cual indica que la velocidad de respiración del ecosistema era suficientemente alta para agotar el O<sub>2</sub> disponible en el epilimnio. También observamos lagos donde la oxiclina estaba por debajo de la termoclina (#18, #15, #4, #2), lo cual indica que la actividad respiratoria era suficientemente baja, para que el DO pudieran rebasar la termoclina, conocida como una barrera física a la difusión. Finalmente, observamos lagos (#9, #20, #19, #8) sin oxiclina, lo cual indica la ausencia de una actividad respiratoria notable.

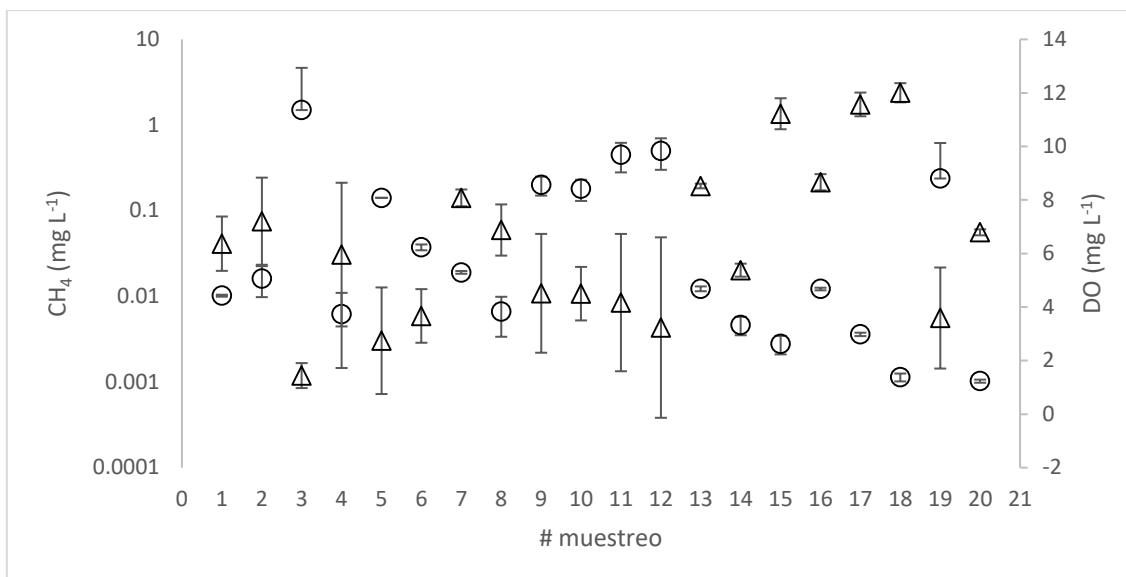


Figura 20. Concentración de DO ( $\Delta$ ) y  $C_{CH_4}$  (O) por encima de la oxiclina.

El  $C_{CH_4}$  medida en los lagos fluctuó varios órdenes de magnitud, desde por debajo del límite de detección del método ( $0.0001 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Gonzalez-Valencia *et al.*, 2014) en la capa inferior inmediata a la oxiclina del lago #4, hasta  $10,150 \mu\text{g L}^{-1}$ , en el fondo del lago #3. Los valores promedio de  $C_{CH_4}$  en los lagos varió en un rango de  $0.997 \mu\text{g L}^{-1}$  (#11) a  $1,496.6 \mu\text{g L}^{-1}$  (#6). Se compararon las medias de la  $C_{CH_4}$ , agrupadas por región, siendo los lagos árticos en verano los más variables ( $CV = 131\%$ ), mientras que el lago con la variación más importante en la columna de agua fue el lago #1. Entre los lagos que se muestrearon varias veces, el lago Hambre fue el que mostró la mayor variabilidad estacional de  $C_{CH_4}$ . Por último, los valores promedio de  $C_{CH_4}$  y DO mostraron una correlación inversa ( $R^2 = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ) implicando que a mayor disponibilidad de OD menor la de  $C_{CH_4}$ . Dos razones podrían explicar este comportamiento; (i) el consumo de OD por las bacterias metanotróficas, en presencia de  $CH_4$  y (ii) el favorecimiento de la metanogénesis en condiciones de bajas concentraciones de OD, tal como se ha observado previamente (Chi *et al* 2012; Martinez-Cruz *et al.*, 2015).

#### 6.3.4.3 Actividad metanotrófica

El método de medición de la actividad metanotrófica real ( $R_{MOR}$ ) nos permitió determinar la velocidad de OM, en condiciones *in situ*, en los lagos estudiados. Debido a que no se añadió ningún nutriente, no hubo ninguna razón para esperar una fase de latencia en la actividad

metanotrófica, por lo que la pendiente inicial de la  $C_{CH_4}$  fue la que se tomó en cuenta para determinar  $R_{MOR}$ . En contraste, durante los ensayos de actividad metanotrófica potencial ( $R_{MOP}$ ) se observó un periodo de latencia de entre 1 y 3 días, es decir, un período de tiempo sin MO aparente. Este comportamiento, denominado inducción de MO, puede interpretarse como un período de adaptación de las bacterias metanotróficas a las condiciones de incubación. La fase de latencia no se tomó en cuenta, por lo que la  $R_{MOP}$  se determinó a partir de la de la disminución de la  $C_{CH_4}$  en el tiempo después de la fase de latencia. En ambos ensayos, cuando no se observó disminución significativa en la  $C_{CH_4}$  durante la incubación (3 días para  $R_{MOR}$  y 7 días para  $R_{MOP}$ ), se consideró la MO igual a cero. La ausencia de MO fue previamente reportada en lagos oligotróficos (Martínez-Cruz *et al.*, 2016), suelos y ecosistemas marinos (Carini *et al.*, 2005). La Figura 21 muestra un ejemplo del comportamiento de la  $C_{CH_4}$  en el tiempo durante ensayos de  $R_{MOR}$  (Panel A) y de  $R_{MOP}$  (Panel B).

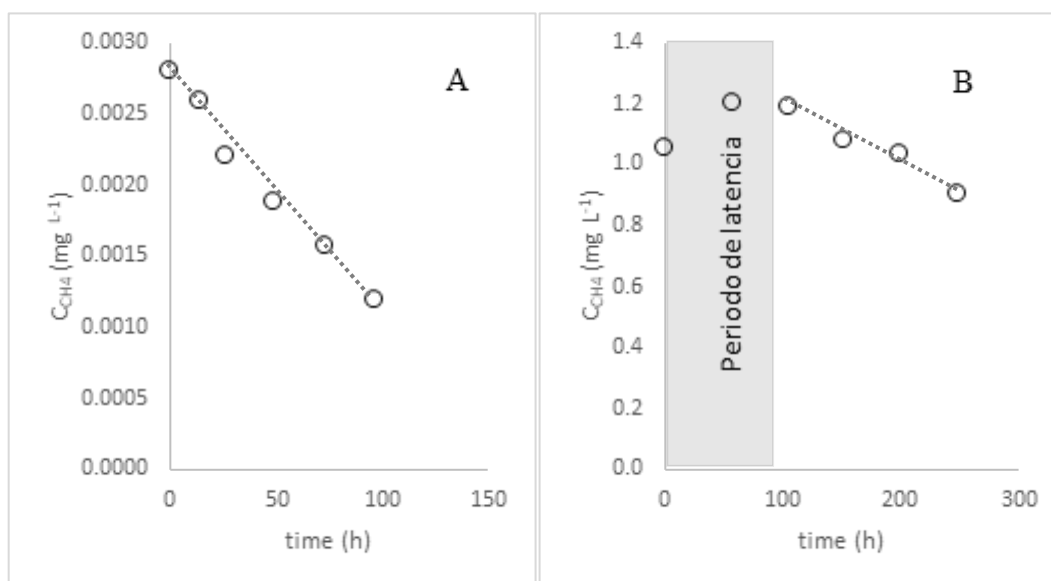


Figura 21. Comportamiento de la  $C_{CH_4}$  en ensayos de MO en condiciones in situ (A) y potenciales (B).

La  $R_{MOR}$  varió de 0.000 (lago #13, #14 y #15) a 2.879  $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  (en el fondo del lago #8). El promedio de  $R_{MOR}$  de cada lago en la columna de agua varió entre 0.000 (lago #13, #14 y #15) y 0.629  $\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$  (lago #6). Por otro lado, se observó una correlación entre la  $C_{CH_4}$  y la



$R_{MOR}$  ( $R^2 > 0.65$ ;  $p < 0.05$ ). Esta observación indica que  $C_{CH_4}$  fue el factor limitante de la actividad metanotrófica, al menos en la mayoría de los casos.

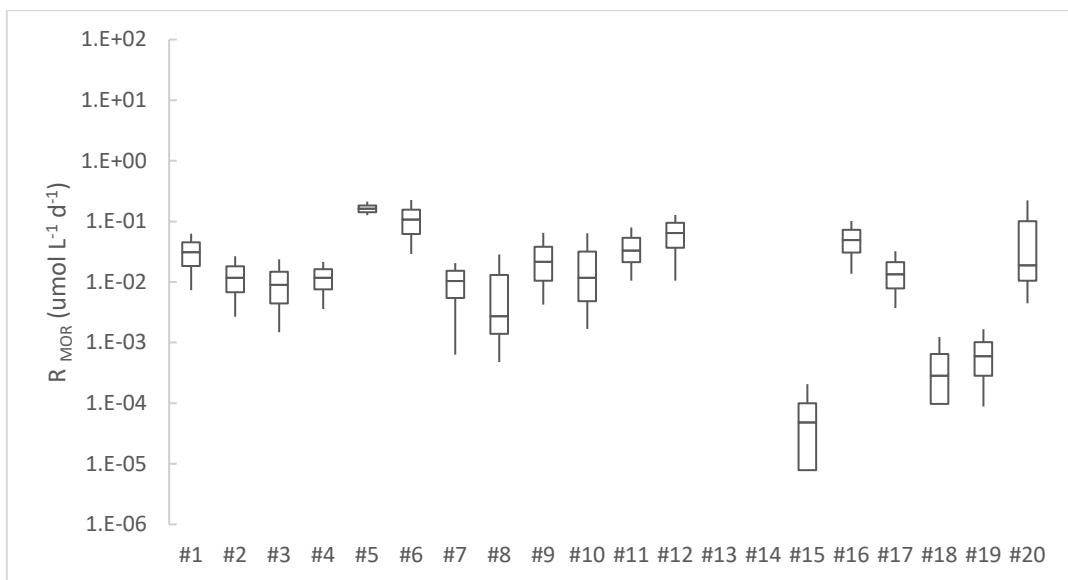


Figura 22. Distribución de  $R_{MOR}$  en lagos.

Los valores de  $R_{MOP}$  estuvieron comprendidos entre 0.00 (lagos #13 y #14) y  $161.85 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (a 8 m de profundidad del lago #20). El promedio de  $R_{MOP}$  en la zona óxica de la columna de agua varió entre  $0.72 \mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (lago #15) y  $107.32 \mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (lago # 11). Las cuales corresponden a la velocidad máxima de MO, reportadas por múltiples autores en un rango de  $0.048$  a  $1,066.88 \mu\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Guérin y Abril, 2007; Serger, 1998).

Por último, se usó un modelo de Monod de doble sustrato para obtener la  $R'_{MOP}$  a partir de la  $R_{MOP}$  (Figura 23), la  $R'_{MOP}$  representa la velocidad de MO “real-teórica”, obtenida a partir de los valores de  $R_{MOP}$  considerados como la velocidad máxima de MO, calculados experimentalmente y los parámetros cinéticos reportados en la literatura ( $K_{SCH_4} 0.110 \pm 0.053 \text{ mg L}^{-1}$ ; Liikanen *et al.*, 2002; Lofton *et al.*, 2014;  $K_{SO_2} 0.624 \pm 0.064 \text{ mg L}^{-1}$ ; Lidstrom y Somers, 1984; Frenzel *et al.*, 1990).

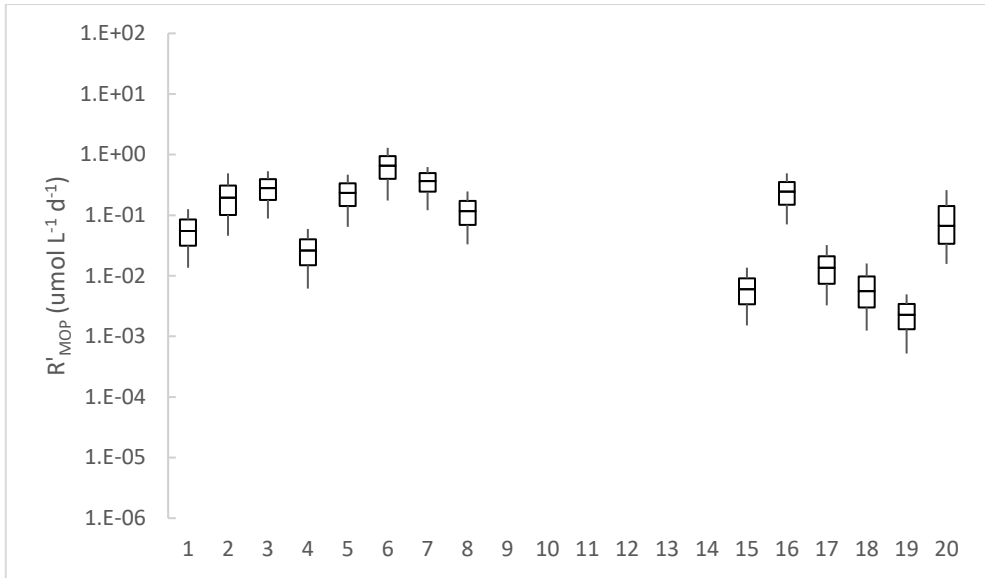


Figura 23. Distribución de  $R'_{MOR}$  en lagos.

La  $R'_{MOR}$  obtenida a partir de  $R_{MOP}$  se correlacionó con la  $C_{CH_4}$  ( $R^2 = 0.805$ ,  $p < 0.05$ ), lo que sugiere que  $C_{CH_4}$  fue el factor limitante. Para comprobar la potencial limitación de la MO por  $CH_4$  o  $DO$ , utilizamos los factores de limitación  $\beta$  y  $\gamma$  definidos por Martinez-Cruz *et al.* (2015) como factor limitante de  $CH_4$  y de  $O_2$ , respectivamente.

$$0\% \leq \beta = \left(1 - \frac{C_{CH_4}}{K_{S_{CH_4}} + C_{CH_4}}\right) \cdot 100 \leq 100\% \quad (15)$$

$$0\% \leq \gamma = \left(1 - \frac{C_{O_2}}{K_{S_{O_2}} + C_{O_2}}\right) \cdot 100 \leq 100\% \quad (16)$$

Un factor de limitación del 100% significa que el 100% de un proceso deja de producirse debido a la ausencia del sustrato, mientras que un factor de limitación del 0% indica que un proceso ocurre a la velocidad máxima ( $R = R_{max}$ ).

La  $R_{MOP}$  fue hasta 3 órdenes de magnitud superior a la  $R_{MOR}$ , mientras que la relación  $R'_{MOP}/R_{MOR}$  varió entre 0.36 y 36. Esta variación es el resultado del métodos de determinación  $R'_{MOP}$ , el cual ha sido reportado ampliamente en literatura (Chi *et al.*, 2015; Bae y Rittmann, 1996; Segers, 1998; Martinez-Cruz *et al.*, 2014), que depende en gran medida de las constantes de afinidad ( $K_{S_{CH_4}}$  y  $K_{S_{O_2}}$ ), las cuales están sujetas a un alto error

por su determinación experimental complicada (Seeger et al., 1998), y que la comunidad metanotrófica es sensible a numerosos factores y cambios espaciotemporales (Carini *et al.*, 2005; He *et al.*, 2012). De acuerdo a nuestros resultados, la  $R'_{MOP}$  podría sobrestimar el proceso en un 1,000%.

#### 6.3.4.4 Balance de metano en lagos.

Con el análisis de batimetría, los datos de fluxes y de  $C_{CH_4}$  se realizó un balance de masa para cada lago con el fin de estimar el  $CH_4$  producido en los sedimentos y por lo tanto el porcentaje de  $CH_4$  producido que es oxidado en la columna de agua. Para establecer ese balance de masa, se hicieron las siguientes suposiciones; (i) se consideró que todo el  $CH_4$  producido en el lago, tanto en los sedimentos como en la columna de agua es consumido por las metanotrofas o emitido a la atmósfera, por lo cual el  $CH_4$  producido es la suma del metano emitido a la atmósfera y del  $CH_4$  oxidado en la columna de agua, (ii) se consideró que la MO se lleva a cabo solo en condiciones aerobias, (iii) no se consideró transporte lateral y/o emisiones por otro modo que intercambio agua/atmósfera, y (iv) se consideró que los lagos están en estado estacionario (i.e., no acumulación de  $CH_4$ ).

La Figura 24 muestra los resultados obtenidos. El porcentaje de  $CH_4$  oxidado en la columna varió entre 0 y 95%. Se observó que el porcentaje de  $CH_4$  oxidado era mayor en lagos con temperaturas bajas en la cercanía de los sedimentos. Este comportamiento podría ser el resultado de la dependencia de la metanogénesis con la temperatura (Negandhi *et al.*, 2016), reduciéndose la actividad metanogénica en los sedimentos, afectando en menor grado la actividad metanotrofica. Por otro lado, los lagos más profundos correspondieron a los lagos donde la actividad metanotrofica fue mayor ( $R^2 > 0.5$ ,  $p > 0.05$ ).

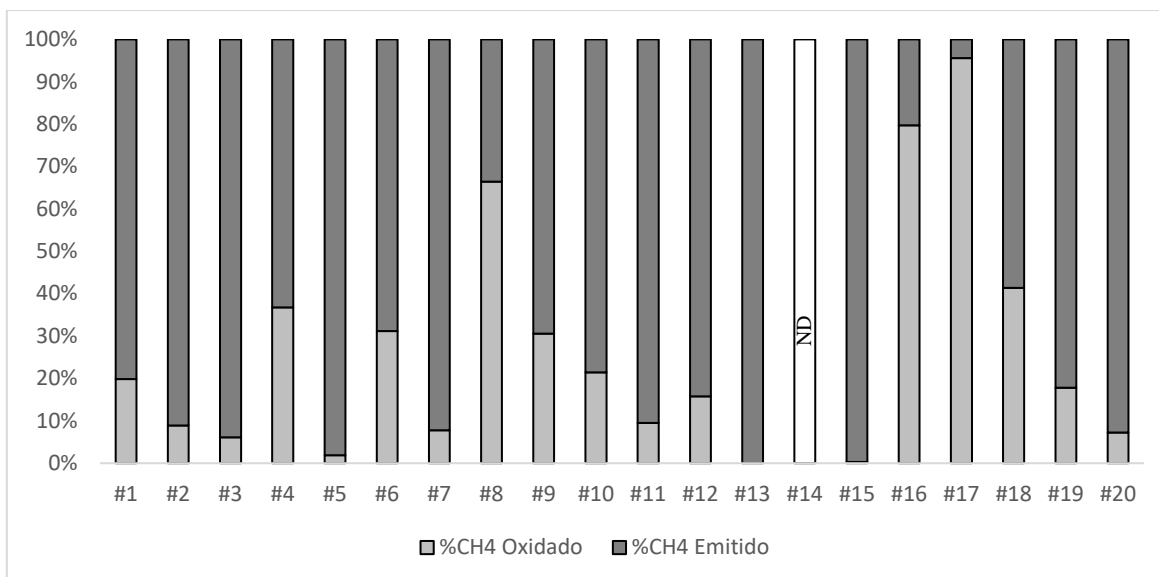


Figura 24. Balance global del ciclo de CH<sub>4</sub>.

### 6.3.5 Conclusiones

La revisión exhaustiva de la literatura nos permitió identificar los principales métodos utilizados, que se pueden dividir en cinco grandes grupos; (i) métodos de difusión, (ii) métodos de asimilación, (iii) métodos de actividad potencial ( $R_{MOP}$ ), (iv) métodos de actividad potencial ajustados ( $R'_{MOP}$ ), y (v) métodos de actividad real ( $R_{MOR}$ ). Gracias a la revisión, pudimos establecer que los métodos de difusión, asimilación, de actividad potencial y actividad potencial ajustada no presentaban diferencia significativa entre ellos, pero si, valores significativamente más altos que los métodos de actividad real. Los métodos de actividad potencial siendo los más utilizados, se confirma nuestra hipótesis de que la actividad metanotrófica está generalmente sobreevaluada. Lo anterior se confirmó mediante la caracterización del ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos cubriendo un amplio rango de latitudes, climas, así como características batimétricas y fisicoquímicas. En esos lagos, determinamos  $R_{MOP}$  y  $R_{MOR}$  y observamos que los valores de actividad potencial ( $R_{MOP}$ ) eran de 5 a 1,000 veces mayores a los valores de actividad real ( $R_{MOR}$ ). Esos resultados nos permiten concluir que la actividad metanotrófica en lagos juega un papel menos importante que el actualmente considerado en el balance del ciclo del CH<sub>4</sub> en lagos.

## 7 Referencias

- APHA, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th edn. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bae, W., Rittmann, B. E.: A structured model of dual-limitation kinetics, *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 683-689, 1996.
- Amaral, J. A., Knowles, R. 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters*, 126 (3): 215–20.
- Bartlett, K. B., Harriss, R.C. 1993. Review and assessments of methane emissions from wetlands. *Chemosphere*, 26: 261–320.
- Bartosiewicz, M., Laurion, I., MacIntyre, S., 2015. Greenhouse gas emission and storage in a small shallow lake. *Hydrobiologia* 757 (1): 101–105.
- Bartosiewicz, M., Laurion, I., Clayer, F., Maranger, R., 2016. Heat-wave effects on oxygen, nutrients, and phytoplankton can alter global warming potential of gases emitted from a small shallow lake. *Environmental Science and Technology*, 50 (12): 6267–6275.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., Tranvik, L.J., 2004. Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, 18 (4): 1–12.
- Bastviken, D., Cole, J.J., Pace, M.L., Van de Bogert, M.C., 2008. Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH<sub>4</sub> emissions. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 113 (2): 1–13.
- Bastviken, D.; Tranvik, L. J.; Downing, J.; Crill, J. A; M, P.; Enrich-Prast, A., 2011. Fresh methane emissions offset the continental carbon sink. *Science*, 331, 50.
- Beal, E J, M W Claire, and C H House. 2011. High Rates of Anaerobic Methanotrophy at Low Sulfate Concentrations with Implications for Past and Present Methane Levels, 131–39.
- Bodelier, Paul L E, and Anne K Steenbergh. 2014. Interactions between Methane and the Nitrogen Cycle in Light of Climate Change. *Current Opinon in Environmental Sustainability* 9–10. Elsevier B.V.: 26–36.

- Borjesson, G., Danielsson, A., Svensson, B.H., 2000. Methane fluxes from a Swedish landfill determined by geostatistical treatment of static chamber measurements. *Environmental Science and Technology* 34 (18): 4044–4050.
- Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.P., Peyret, P., Fonty, G., Lehours, A.C., 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162 (9): 832–847.
- Branco, C.W.C., Kozlowsky-Suzuki, B., Sousa-Filho, I.F., Guarino, A.W.S., Rocha, R.J., 2009. Impact of climate on the vertical water column structure of Lajes reservoir (Brazil): A tropical reservoir case. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 14 (3): 175–191.
- Breuninger, C.; Oswald, R.; Kesselmeier, J.; Meixner, F. X., 2012. The dynamic chamber method: Trace gas exchange fluxes (NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) between plants and the atmosphere in the laboratory and in the field. *Atmos. Meas. Tech.* 5 (5), 955–989.
- Bodegom, P.; Stams, F.; Mollema, L.; Boeke, S.; Leffelaar, P. 2001. Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (8): 3586–97.
- Butorovic, N., 2013. Resumen meteorológico año 2012 estación ‘Jorge C. Schythe.’ *Anales Instituto Patagonia (Chile)* 41 (1): 153–162.
- Carini, S, N Bano, G LeCleur, and S B Joye. 2005. Aerobic Methane Oxidation and Methanotroph Community Composition during Seasonal Stratification in Mono Lake, California (USA). *Environmental Microbiology* 7 (8): 1127–38.
- Casper, P., Maberly, S.C., Hall, G.H., Finlay, B.J., 2000. Fluxes of methane and carbon dioxide from a small productive lake to the atmosphere. *Biogeochemistry* 49 (1): 1–19.
- Chapra, S.C., Tarapchak, S.J., 1976. A chlorophyll a model and its relationship to phosphorus loading plots for lakes. *Water Resources Research* 12 (6): 1260–1264.
- Chi, Zi Fang, Wen Jing Lu, Huai Li, and Hong Tao Wang. 2012. Dynamics of CH<sub>4</sub>oxidation in Landfill Biocover Soil: Effect of O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>ratio on CH<sub>4</sub>metabolism. *Environmental Pollution* 170. Elsevier Ltd: 8–14.

- Clilverd, H., White, D., Lilly, M., 2009. Chemical and physical controls on the oxygen regime of ice-covered Arctic lakes and reservoirs. *Journal of the American Water Resources Association* 45 (2): 500–511.
- Cole, J. J.; Caraco, N. F. 1998. Atmospheric exchange of carbon dioxide in a low-wind oligotrophic lake measured by the addition of SF<sub>6</sub>. *Limnol. Oceanogr.* 43 (4), 647–656.
- Coloso, J.J., Cole, J.J., Pace, M.L., 2010. Short-term variation in thermal stratification complicates estimation of lake metabolism. *Aquatic Sciences* 73 (2): 305–315.
- Conrad, Ralf. 2009. The Global Methane Cycle: Recent Advances in Understanding the Microbial Processes Involved. *Environmental Microbiology Reports* 1 (5): 285–92.
- Crill, P. M.; Bartlett, K. B.; Wilson, J. O.; Sebacher, D. I.; Harriss, R. C., 1988, Tropospheric methane from an Amazonian floodplain lake: *Journal Geophysical Research*, Vol. 93, pp. 1564–1570.
- Deemer, B. R.; Harrison, J. A.; Li, S.; Beaulieu, J. J.; Delsontro, T.; Barros, N.; Bezerra-Neto, J. F.; Powers, S. M.; Dos Santos, M. A.; Vonk, J. A., 2016. Greenhouse gas emissions from reservoir water surfaces: A new global synthesis. *Biosciences.*, 66 (11), 949–964.
- Denmead, O. T., 2008. Approaches to measuring fluxes of methane and nitrous oxide between landscapes and the atmosphere. *Plant Soil.* 309 (1–2), 5–24.
- Deshmukh, C.; Serça, D.; Delon, C.; Tardif, R.; Demarty, M.; Jarnot, C.; Meyerfeld, Y.; Chanudet, V.; Guédant, P.; Rode, W.; Descloux, S.; Guérin, F. 2014. Physical controls on CH<sub>4</sub> emissions from a newly flooded subtropical freshwater hydroelectric reservoir: Nam Theun 2. *Biogeosciences.* 11 (15), 4251–4269.
- DelSontro, T., Kunz, M.J., Kempter, T., Wüest, A., Wehrli, B., Senn, D.B., 2011. Spatial heterogeneity of methane ebullition in a large tropical reservoir. *Environmental Science and Technology* 45 (23): 9866–9873.
- DelSontro, T.; McGinnis, D. F.; Wehrli, B.; Ostrovsky, I., 2015. Size does matter: Importance of large bubbles and small-scale hot spots for methane transport. *Environ. Sci. Technol.* 49 (3), 1268–1276.

- Delwiche, K.; Senft-Grupp, S.; Hemond, H., 2015. A Novel Optical Sensor Designed to Measure methane bubble sizes in situ. *Limnol. Oceanogr. Methods*. 13 (12), 712–721.
- Dodds, W.K., Jones, J.R., Welch, E.B., 1998. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by Chlorophyll, Total Nitrogen, and Phosphorus. *Water Research* 32 (5): 1455–1462.
- Duarte, C. M.; Prairie, Y. T. 2005. Prevalence of Heterotrophy and Atmospheric CO<sub>2</sub> Emissions from Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*. 862–70.
- Duc, N. T.; Silverstein, S.; Lundmark, L.; Reyier, H.; Crill, P.; Bastviken, D., 2013. Automated flux chamber for investigating gas flux at water-air interfaces. *Environ. Sci. Technol.* 47 (2), 968–975.
- Duchemin, E.; Lucotte, M.; Canuel, R., 1998. Comparison of static chamber and thin boundary layer equation methods for measuring greenhouse gas emissions from large water bodies. *Environ. Sci. Technol.* 33 (2), 350–357.
- Edwards, N. T.; Sollins, P., 1973. Continuous measurement of carbon dioxide evolution from partitioned forest floor components. *Ecol. Soc. Am.* 54 (2), 406–412.
- Encinas-Fernández, J., Peeters, F., Hofmann, H., 2014. Importance of the autumn overturn and anoxic conditions in the hypolimnion for the annual methane emissions from a temperate lake. *Environmental Science and Technology* 48 (13): 7297–7304.
- Eugster, W.; Plüss, P., 2010. A fault-tolerant eddy covariance system for measuring CH<sub>4</sub> fluxes. *Agric. For. Meteorol.*, 150 (6), 841–851.
- Fang, C.; Moncrieff, J. B., 1996. An improved dynamic chamber technique for measuring CO<sub>2</sub> efflux from the surface of soil. *Funct. Ecol.* 10 (2), 297–305.
- Frenzel, P., Thebrath, B., Conrad, R. 1990. Oxidation of Methane in the Oxidic Surface Layers of a Deep Lake Sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiology Letters* 73 (2): 149–58.
- Gålfalk, M.; Olofsson, G.; Bastviken, D., 2017. Approaches for hyperspectral remote flux quantification and visualization of GHGs in the environment. *Remote Sens. Environ.* 191, 81–94.



- Galloway, J.N., Levy II, H., Kasibhatla, P.S., 1994. Year 2020: Consequences of population growth and development on deposition of oxidized nitrogen. *Ambio* 23 (2): 889–892.
- Gao, F.; Yates, S. R.; Yates, M. V.; Gan, J.; Ernst, F. F., 1997. Design, fabrication, and application of a dynamic chamber for measuring gas emissions from soil. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1), 148–153.
- Glissmann, K., Chin, K., Casper, P., Conrad, P. 2004. Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow : Effect of Temperature 48 (1): 389–99.
- Gonzalez-Valencia, R.; Sepulveda-Jauregui, A.; Martinez-Cruz, K.; Hoyos-Santillan, J.; Dendooven, L.; Thalasso, F., 2014. Methane Emissions from Mexican Freshwater Bodies: Correlations with Water Pollution. *Hydrobiologia* 721 (1), 9–22.
- Gonzalez-Valencia, R., Magana-Rodriguez, F., Gerardo-Nieto, O., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Walter-Anthony, K., Baer, D., Thalasso, F., 2014. In situ measurement of dissolved methane and carbon dioxide in freshwater ecosystems by Off-Axis Integrated Cavity Output Spectroscopy. *Environmental Science and Technology* 48 (19): 11421–11428
- Granin, N.G., Mizandrontsev, I.B., Obzhirov, A.I., Vereshchagina, O.F., Gnatovskii, R.Y., Zhdanov, A.A., 2013. Oxidation of methane in the water column of Lake Baikal. *Doklady Earth Sciences* 451 (1): 784–786.
- Grinham, A.; Dunbabin, M.; Gale, D.; Udy, J., 2011. Quantification of ebullitive and diffusive methane release to atmosphere from a water storage. *Atmos. Environ.* 45 (39), 7166–7173.
- Guérin, F.; Abril G. 2007. Significance of Pelagic Aerobic Methane Oxidation in the Methane and Carbon Budget of a Tropical Reservoir. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 112: 1–14.
- Hanson, R. S.; Hanson, T. E. 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 60 (2): 439–71.
- Harriss, R.C., Sebach, D.I., 1981. Methane flux in forested freshwater swamps of the southeastern United States. *Geophysical Research Letters* 8 (9): 1002–1004.

- Hedin, L.O., Armesto, J.J. Johnson, A.H., 1995. Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests: Evaluation of Biogeochemical Theory. *Ecological Society of America* 76 (2): 493–509.
- Hendriks, D. M. D.; van Huissteden, J.; Dolman, A. J., 2010. Multi-technique assessment of spatial and temporal variability of methane fluxes in a peat meadow. *Agric. For. Meteorol.* 150 (6), 757–774.
- Hermanns, Y.M.; Biester, H. 2013. A 17,300-year record of mercury accumulation in a pristine lake in southern Chile. *Journal of Paleolimnology* 49 (4): 547–61.
- Hoffmann, M.; Schulz-Hanke, M.; Garcia Alba, J.; Jurisch, N.; Hagemann, U.; Sachs, T.; Sommer, M.; Augustin, J., 2017. A Simple calculation algorithm to separate high-resolution ch<sub>4</sub> flux measurements into ebullition- and diffusion-derived components. *Atmos. Meas. Tech.* 10 (1), 109–118.
- Holgerson, M. A.; Raymond, P. A. 2016. Large Contribution to Inland Water CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> emissions from Very Small Ponds. *Nature Geoscience*. 9 (3): 222–26.
- Hrsak, D.; Begonja, A. 1998. Growth Characteristics and Metabolic Activities of the Methanotrophic-Heterotrophic Groundwater Community. *Journal of Applied Microbiology*. 85 (3): 448–56.
- Jannasch, H. W. 1975. Methane Oxidation in Lake Kivu (Central Africa).” *Limnology and Oceanography*. 20 (5).
- Joyce, J., Jewell, P.W., 2003. Physical controls on methane ebullition from reservoirs and lakes. *Environmental and Engineering Geoscience* 9 (2): 167–78.
- Kankaala, P.; Huotari, J.; Peltomaa, E.; Saloranta, T.; Ojala, A. 2006. Methanotrophic Activity in Relation to Methane Efflux and Total Heterotrophic Bacterial Production in a Stratified, Humic, Boreal Lake. *Limnology and Oceanography*. 51 (2): 1195–1204.
- Kalff, J., 2002. *Limnology: inland water ecosystems*. Prentice-Hall, New Jersey
- Keller, M.; Stallard, R. F., 1994. Methane emission by bubbling from Gatun Lake, Panama. *J. Geophys. Res.* 99 (D4), 8307–8319.
- Koyama, T., 1963. Gaseous metabolism in lakes sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. *Journal of Geophysical Research* 68 (13): 3971–3973.

- Lambert, W., Sommer, U., 2007. *Limnoecology*, second ed. Oxford, New York.
- Lehner, B.; Döll P. 2004. Development and Validation of a Global Database of Lakes, Reservoirs and Wetlands. *Journal of Hydrology*. 296 (1–4): 1–22.
- Lewis, W.M., 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Aquatic Sciences* 40: 1779–1787.
- Lidstrom, M. E.; Somers, L. 1984. Seasonal Study of Methane Oxidation in Lake Washington. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (6): 1255–60.
- Liikanen, A.; Huttunen, J. T.; Valli, K.; Martikainen P. J. 2002. Methane Cycling in the Sediment and Water Column of Mid-Boreal Hyper-Eutrophic Lake Kevaton, Finland. *Archiv Fur Hydrobiologie* 154 (4): 585–603.
- Livingston, G. P.; Hutchinson, G. L., 1995. Enclosure-based measurement of trace gas exchange: Applications and sources of error. In *Biogenic Trace Gases: Measuring Emissions from Soil and Water*. Blackwell Science; Matson, P., Goldstein, A., Eds.; Cambridge pp 14–50.
- Lofton, D.; Whalen, S. C.; Hershey A. E. 2013. Effect of Temperature on Methane Dynamics and Evaluation of Methane Oxidation Kinetics in Shallow Arctic Alaskan Lakes. *Hydrobiologia*. 721 (1): 209–22
- López Bellido, J., Tulonen, T., Kankaala, P., Ojala, A., 2009. CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes during spring and autumn mixing periods in a boreal lake (Pääjärvi, southern Finland). *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 114 (4): 1–12.
- Magen, C.; Lapham, L.; Pohlman, J. W.; Marshall, K.; Bosman, S.; Casso, M.; Chanton J.P. 2014. A Simple Headspace Equilibration Method for Measuring Dissolved Methane. *Limnology and Oceanography: Methods*. 12 (SEP): 637–50.
- Martinez, D.; Anderson, M. A., 2013. Methane production and ebullition in a shallow, artificially aerated, eutrophic temperate lake (Lake Elsinore, CA). *Sci. Total Environ.* 454–455, 457–465.
- Martinez-Cruz, K.; Sepulveda-Jauregui, A.; Escobar-Orozco, N.; Thalasso F. 2012. Methanogenic Activity Tests by Infrared Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 91 (1). Elsevier B.V.: 89–92.

- Martinez-Cruz, K.; Sepulveda-Jauregui, A.; Walter Anthony, K.; Thalasso, F., 2015. Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan lakes. *Biogeosciences* 12 (15): 4595–4606.
- Martinsen, K. T.; Kragh, T.; Sand-Jensen, K., 2018. A simple and cost-efficient automated floating chamber for continuous measurements of carbon dioxide gas flux on Lakes. *Biogeosciences Discuss.* 25 (February), 1–12.
- Mattson, M. D.; Likens, G. E., 1990. Air pressure and methane fluxes. *Nature* 347 (6295), 718–719.
- Matthews, C. J. D.; St. Louis, V. L.; Hesslein, R. H., 2003 Comparison of three techniques used to measure diffusive gas exchange from sheltered aquatic surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 37 (4), 772–780.
- McGinnis, D.F., Kirillin, G., Tang, K.W., Flury, S., Bodmer, P., Engelhardt, C., Casper, P. Grossart, H.P., 2015. Enhancing surface methane fluxes from an oligotrophic lake: exploring the microbubble hypothesis. *Environmental Science and Technology* 49 (2): 873–880.
- Miller, L. G.; Baesman, S. M.; Carlström, C. I; Coates, J. D.; Oremland, R. S. 2014. Methane Oxidation Linked to Chlorite Dismutation. *Frontiers in Microbiology.* 5 (JUN): 1–8.
- Mittermeier, R.A, Mittermeier, C.G., Brooks, T.M., Pilgrim, J.D., Konstant, W.R., da Fonseca, G.A.B., Kormos, C., 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (18): 10309–10313.
- Molongoski, J. J.; Klug, M. J., 1980, Anaerobic metabolism of particulate organic matter in the sediments of a hypereutrophic lake: *Freshwater Biology*, Vol. 10, pp. 507–518.
- Myrbo, A. 2012. *Encyclopedia of Lakes and Reservoirs*.
- Natchimuthu, S.; Sundgren, I.; Gålfalk, M.; Klemedtsson, L.; Crill, P.; Danielsson, Å.; Bastviken, D., 2016. Spatio-temporal variability of lake CH<sub>4</sub> fluxes and its influence on annual whole lake emission estimates. *Limnol. Oceanogr.* 61, S13–S26.

- National Institute of Standards and Technology (NIST): NIST chemistry Web book, 2016.
- Negandhi, K.; Laurion, I.; Lovejoy, C. 2016. Temperature Effects on Net Greenhouse Gas Production and Bacterial Communities in Arctic Thaw Ponds. *FEMS Microbiology Ecology*. 92 (8).
- Nisbet, E. G.; Dlugokencky, E. J.; Bousquet, P. 2014. Methane on the Rise - Again. *Science*. 343 (6170): 493–95.
- Nõges, P., Cremona, F., Laas, A., Martma, T., Rõõm, E.I., Toming, K., Viik, M., Vilbaste, S., Nõges T., 2016. Role of a productive lake in carbon sequestration within a calcareous catchment. *Science of the Total Environment* 550: 225–30.
- Ortiz-Llorente, M. J.; Alvarez-Cobelas, M. 2012. Comparison of biogenic methane emissions from unmanaged estuaries, lakes, oceans, rivers and wetlands. *Atmos. Environ.* 59, 328–337.
- Ostrovsky, I.; McGinnis, D. F.; Lapidus, L.; Eckert, W., 2008. Quantifying gas ebullition with echosounder: The role of methane transport by bubbles in a medium-sized lake. *Limnol. Oceanogr. Methods* 6 (2), 105–118.
- Padisák, J., Barbosa, F., Koschel, R., Krienitz, L., 2003. Deep layer cyanoprokaryota maxima in temperate and tropical lakes. *Advances in Limnology* 58: 175-199.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2018. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rasilo, T.; Prairie, Y. T.; Del Giorgio, P. A., 2015. Large-scale patterns in summer diffusive CH<sub>4</sub> fluxes across boreal lakes, and contribution to diffusive C emissions. *Glob. Chang. Biol.* 21, 1124–1139.
- Rozzi, R., Armesto, J.J., Goffinet, B., Buck, W., Massardo, F., Silander, J., Arroyo, M.T.K., Russell, S., Anderson, C.B., Cavieres, L.A., Callicott, J.B., 2008. Changing lenses to assess biodiversity: patterns of species richness in sub-Antarctic plants and implications for global conservation. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6 (3): 131–137.
- Rozzi, R., Armesto, J.J., Gutiérrez, J.R., Massardo, F., Likens, G.E., Anderson, C.B., Poole, A., Moses, K.P., Hargrove, E., Mansilla, A.O., Kennedy, J.H., Willson, M.,

Jax, K., Jones, C.G., Callicott, J.B. Arroyo, M.T.K., 2012. Integrating ecology and environmental ethics: Earth stewardship in the southern end of the Americas. *BioScience* 62 (3): 226–236.

- Rudd, John W M, and R D Hamilton. 1978. Methane Cycling in a Eutrophic Shield Lake and Its Effect on Whole Lake Metabolism. *Limnology and Oceanography*. 23 (2).
- Rudd, John W M, R D Hamilton, and N E R Campbell. 1974. Measurement of Microbial Oxidation of Methane in Lake Water. *Limnology and Oceanography*. 19 (May): 519–24.
- Saunio, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregon, A., Ciais, P., Canadell, J.G., Dlugokencky, E.J., Etiope, G., Bastviken, D., Houweling, S., Janssens-Maenhout, G., Tubiello, F.N., Castaldi, S., Jackson, R.B., Alexe, M., Arora, V.K., Beerling, D.J., Bergamaschi, P., Blake, D.R., Brailsford, G., Brovkin, V., Bruhwiler, L., Crevoisier, C., Crill, P., Curry, C., Frankenberg, C., Gedney, N., Höglund-Isaksson, L., Ishizawa, M., Ito, A., Joos, F., Kim, H.S., Kleinen, T., Krummel, P., Lamarque, J.F., Langenfelds, R., Locatelli, R., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K.C., Marshall, J., Melton, J.R., Morino, I., O’Doherty, S., Parmentier, F.J.W, Patra, P.K., Peng, C., Peng, S., Peters, G.P., Pison, I., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Riley, W.J., Saito, M., Schroeder, R., Simpson, I.J., Spahni, R., Steele, P., Takizawa, A., Thornton, B.F. Tian, H., Tohjima, Y., Viovy, N., Voulgarakis, A., van Weele, M., van der Werf, G., Weiss, R., Wiedinmyer, C., Wilton, D.J., Wiltshire, A., Worthy, D., Wunch, D.B., Xu, X., Yoshida, Y., Zhang, B., Zhang, Z., Zhu, Q., 2016. The global methane budget : 2000-2012. *Earth System Science Data*, 8: 697-751.
- Schmale, O.; Blumenberg, M.; Kießlich, K.; Jakobs, G.; Berndmeyer, C.; Labrenz, M.; Thiel, V.; Rehder, G. 2012. Aerobic Methanotrophy within the Pelagic Redox-Zone of the Gotland Deep (Central Baltic Sea). *Biogeosciences*. 9 (12): 4969–77.
- Schubert, C. J.; Vazquez, F.; Lösekann-Behrens, T.; Knittel, K.; Tonolla, M.; Boetius, A. 2011. Evidence for Anaerobic Oxidation of Methane in Sediments of a Freshwater System (Lago Di Cadagno). *FEMS Microbiology Ecology*. 76 (1): 26–38.

- Sepulveda-Jauregui, A.; Martinez-Cruz, K.; Strohm, A.; Walter-Anthony, K.; Thalasso, F. 2012. A New Method for Field Measurement of Dissolved Methane in Water Using Infrared Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy. *Limnology and Oceanography: Methods*. 10 (7): 560–67.
- Sepulveda-Jauregui, A.; Hoyos-Santillan, J.; Gutierrez-Mendieta, F. J.; Torres-Alvarado, R.; Dendooven, L.; Thalasso, F., 2013. The Impact of Anthropogenic Pollution on Limnological Characteristics of a Subtropical Highland Reservoir Lago de Guadalupe, Mexico. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* No. 410, 04.
- Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K.M., Martinez-Cruz, K., Greene, S., Thalasso, F., 2015. Methane and carbon dioxide emissions from 40 lakes along a north–south latitudinal transect in Alaska. *Biogeosciences* 12 (11): 3197–3223.
- Shindell, D.T., Faluvegi, G., Koch, D.M., Schmidt, G.A., Unger, N., Bauer, S.E., 2009. Improved attribution of climate forcing to emissions. *Science* 326: 716–718.
- Strayer, R. F.; Tiedje, J. M., 1978, In situ methane production in a small, hypereutrophic hard-water lake: Loss of methane from sediments by vertical diffusion and ebullition. *Limnology and Oceanography*, Vol. 23, pp. 1201–1206.
- Striegl, R.G., Michmerhuizen, C.M., 1998. Hydrologic influence on methane and carbon dioxide dynamics at two north-central Minnesota lakes. *Limnology and Oceanography* 43 (7): 1519–1529.
- Sergers, R. 1998. Methane Production and Methane Consumption : A Review of Processes Underlying Wetland Methane Fluxes. *Biochemistry*. 41 (1): 23–51.
- Tabachow, R. M.; Roelle, P. A.; Peirce, J. J.; Aneja, V. P., 2002. Soil nitric oxide emissions: Lab and field measurements and comparison. *Environ. Eng. Sci.* 19 (4), 205–214.
- Tang, K.W., McGinnis, D.F., Frindte, K., Brüchert, V., Grossart, H.P., 2014. Paradox reconsidered methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnology and Oceanography* 59 (1): 275–284.
- Tranvik, L.J., 2014. A global inventory of lakes based on high-resolution satellite imagery. *Geophysical Research Letters* 41: 6396–6402.
- Tranvik, L.J., Downing, J.A., Cotner, J.B., Loiselle, S.A., Striegl, R.G., Ballatore, T.J., Dillon, P., Findlay, K., Fortino, K., Knoll, L.B., Kortelainen, P.L., Kutser, L.,

- Larsen, S., Laurion, I., Leech, D.M., McCallister, S.L., McKnight, D.M., Melack, J.M., Overholt, E., Porter, J.A., Prairie, Y., Renwick, W.H., Roland, F., Sherman, B.S., Schindler, D.W., Sobek, S., Tremblay, A., Vanni, M.J., Verschoor, A.M., von Wachenfeldt, E., Weyhenmeyer, G.A., 2009. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography* 54 (6 part. 2): 2298–2314.
- Trotsenko, Y. A.; Murrell, J. C. 2008. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy ? *63 (07): 5–6.*
  - Utsumi, M.; Nojiri, Y.; Nakamura, T.; Nozawa, T.; Otsuki, A.; Seki, H. 1998. Oxidation of Dissolved Methane in a Eutrophic, Shallow Lake: Lake Kasumigaura, Japan. *Limnology and Oceanography*. 43 (3): 471–80.
  - Verginelli, I.; Pecoraro, R.; Baciocchi, R., 2018. Using dynamic flux chambers to estimate the natural attenuation rates in the subsurface at petroleum contaminated sites. *Sci. Total Environ.* 619–620, 470–479
  - Verpoorter, C., Kutser, T., Seekell, D.A., Tranvik, L.J., 2014. A global inventory of lakes based on high-resolution satellite imagery. *Geophysical Research Letters* 41: 6396–6402.
  - Walter Anthony, K. M.; Vas, D. A.; Brosius, L.; Chapin III, F. S.; Zimov, S. A.; Zhuang, Q., 2010. Estimating methane emissions from northern lakes using ice-bubble surveys. *Limnol. Oceanogr. Methods* 8, 592–609.
  - Wanninkhof, R., Knox, M., 1996. Chemical enhancement of CO<sub>2</sub> exchange in natural waters. *Limnology and Oceanography* 41 (4): 689–697.
  - Webb, J.; Maher, T.; Santos, I. R. 2016. Automated, in situ measurements of dissolved CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and D<sup>13</sup>C values using cavity enhanced laser absorption spectrometry: Comparing response times of air-water equilibrators *OCEANOGRAPHY: METHODS* no. March.
  - White, D.M., Clilverd, H.M., Tidwell, A.C., Little, L., Lilly, M.R., Chambers, M., Reichardt, D., 2008. A tool for modeling the winter oxygen depletion rate in Arctic lakes. *Journal of the American Water Resources Association* 44 (2): 293–304.



- Wilkinson, J.; Maeck, A.; Alshboul, Z.; Lorke, A., 2015. Continuous seasonal river ebullition measurements linked to sediment methane formation. *Environ. Sci. Technol.* 49 (22), 13121–13129.
- Wik, M., Thornton, B.F., Bastviken, D., Uhlbäck, J., Crill P.M., 2016. Biased sampling of methane release from northern lakes: a problem for extrapolation. *Nature Geoscience* 9: 99–105.
- Willmott, C.J., Matsuura, K., 2006. On the use of dimensioned measures of error to evaluate the performance of spatial interpolators. *International Journal of Geographical Information Science* 20 (1): 89–102.
- Wittenbury, R. Phillips, K. C.; Wilkinson, J. F. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, 61, 205– 218.

# Apéndice 1

## Diagrama de flujo y ecuaciones de balance de masa

El diagrama de flujo del método ODC se muestra en la Figura 25. Nuestro modelo considera que la fase gaseosa está completamente mezclada, tanto en el espacio de cabeza de la cámara como en la cavidad del espectrómetro. Aunque en el presente trabajo utilizamos nitrógeno libre de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  como gas acarreador, el modelo considera una concentración de entrada para una mayor versatilidad.

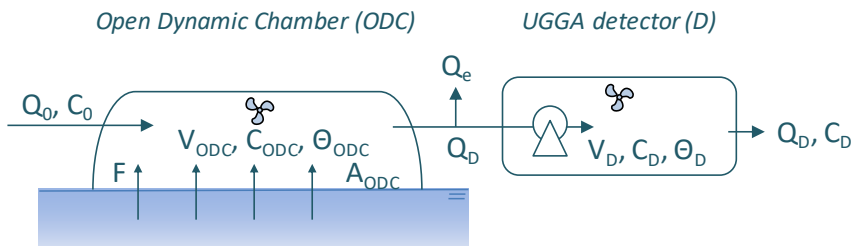


Figura 25. Diagrama de flujo del método de ODC.

Donde:

- F: Flux de  $\text{CH}_4$  ( $\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ),
- $C_0$ : Concentración del gas acarreador ( $\text{g m}^{-3}$ )
- $C_{ODC}$ : Concentración de gas en la ODC ( $\text{g m}^{-3}$ )
- $C_D$ : Concentración medida en el espectrómetro UGGA ( $\text{g m}^{-3}$ )
- $Q_0$ : Flujo de entrada del gas acarreador ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )
- $Q_e$ : Purga del exceso de flujo ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )
- $Q_D$ : Flujo extraído por el espectrómetro ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )
- $A_{ODC}$ : Área de contacto de la ODC con el ecosistema ( $\text{m}^2$ )
- $V_{ODC}$ : Volumen de la ODC ( $\text{m}^3$ )
- $V_D$ : Volumen de la cavidad del espectrómetro ( $\text{m}^3$ )
- $\theta_{ODC}$ : Tiempo de residencia del gas en la ODC (h)
- $\theta_D$ : Tiempo de residencia del gas en la cavidad del espectrómetro (h)

Considerando que la concentración en la cavidad ( $C_D$ ) del espectrómetro es homogénea el balance en la cavidad puede ser descrito por:

$$\frac{dC_D}{dt} = \frac{Q_D}{V_D} \cdot C_{ODC} - \frac{Q_D}{V_D} \cdot C_D \quad (A1)$$

A su vez, considerando que la cavidad del espectrómetro está completamente mezclada, el tiempo de residencia hidráulico ( $\theta_D$ ) puede ser descrito por;

$$\frac{1}{\theta_D} = \frac{Q_D}{V_D} \quad (A2)$$

Por lo que A1 se puede reescribir;

$$\frac{dC_D}{dt} = \frac{1}{\theta_D} \cdot (C_{ODC} - C_D) \quad (A3)$$

$$C_{ODC} = \theta_D \frac{dC_D}{dt} + C_D \quad (A4)$$

La ecuación A4 nos permite determinar  $C_{ODC}$  en cualquier momento, a partir de las mediciones del espectrómetro. De manera similar, considerando que el espacio de cabeza en la ODC esta mezclado completamente, el balance de masa puede ser descrito por;

$$\frac{dC_{ODC}}{dt} = \frac{Q_0}{V_{ODC}} \cdot C_0 - \frac{Q_e}{V_{ODC}} \cdot C_{ODC} - \frac{Q_D}{V_{ODC}} \cdot C_{ODC} + F \cdot \frac{A_{ODC}}{V_{ODC}} \quad (S5)$$

Considerando que el flujo del gas acarreador del influente ( $Q_0$ ) es igual a la suma de los flujos de salida ( $Q_e + Q_D$ ), la Eq. A5 puede ser reescrita de la siguiente forma;

$$\frac{dC_{ODC}}{dt} = \frac{Q_0}{V_{ODC}} \cdot (C_0 - C_{ODC}) + F \cdot \frac{A_{ODC}}{V_{ODC}} \quad (A6)$$

El tiempo de residencia hidráulico de la ODC ( $\theta_{ODC}$ ) esta descrito por;

$$\frac{1}{\theta_{ODC}} = \frac{Q_0}{V_{ODC}} \quad (A7)$$

Reescribiendo la Eq. A6, obtenemos:

$$F = \left( \frac{dC_{ODC}}{dt} + \frac{C_{ODC} - C_0}{\theta_{ODC}} \right) \cdot \frac{V_{ODC}}{A_{ODC}} \quad (A8)$$

Que combinándola con la Eq. A4 obtenemos como resultado;

$$F = \left( \frac{d(\theta_D \frac{dC_D}{dt} + C_D)}{dt} + \frac{\theta_D \frac{dC_D}{dt} + C_D - C_0}{\theta_{ODC}} \right) \cdot \frac{V_{ODC}}{A_{ODC}} \quad (A9)$$

Por lo tanto, la ecuación A9 permite la determinación del flux instantáneo a partir de las mediciones del espectrómetro. Es importante tener en cuenta que el detector UGGA mide las concentraciones de gas en ppm ( $C_D$ , ppm), mientras que en la ecuación A9 las concentraciones se expresan en  $g\ m^{-3}$ . Para convertir  $C_D$ , ppm usamos las Ecuaciones A10 y A11; donde  $M_{CH_4}$  es el peso molar de  $CH_4$  ( $16\ g\ mol^{-1}$ ),  $V_M$  es el volumen molar del gas de interés ( $m^3\ mol^{-1}$ , ecuación A11), 1,000,000 es el factor de conversión de ppm a vol./vol. ,  $P$  es la presión atmosférica durante las mediciones (Atm),  $R$  es la constante de gas universal ( $8.2058 \cdot 10^{-5}\ m^3\ Atm\ K^{-1}\ Mol^{-1}$ ), y  $T$  es la temperatura absoluta durante las mediciones (K),

$$C_D = \frac{C_{D,ppm}}{1,000,000} \cdot \frac{M_{CH_4}}{V_M} \quad (A10)$$

$$V_M = \frac{R \cdot T}{P} \quad (A11)$$

### Caracterización de burbujas

Como se muestra en las secciones de resultados, el flux total instantáneo se determinó con éxito con la ecuación A9. Los eventos ebullitivos fueron claramente detectables por un aumento abrupto y breve del flujo, lo que permite la determinación del flujo total instantáneo y distinguir los fluxes difusivo y ebullitivo. Sin embargo, se observó un ruido significativo

en la determinación del flux instantáneo, particularmente cuando se producían dos eventos ebullitivos en un corto período de tiempo, lo que resulta en un error significativo e impide la determinación precisa de las características de las burbujas. Por lo tanto, se implementó una estrategia diferente, que se basó en la determinación de la concentración máxima observada después de un evento ebullitivo, en lugar de la determinación de flujo instantáneo. La Figura 26 ilustra la concentración observada en el ODC y en la cavidad del detector UGGA durante un evento ebullitivo doble. Esta simulación se realizó utilizando las ecuaciones de balance de masas (ecuación A1 y A6, Figura 26), para ilustrar la estrategia utilizada para la caracterización de burbujas, presentada en el documento principal.

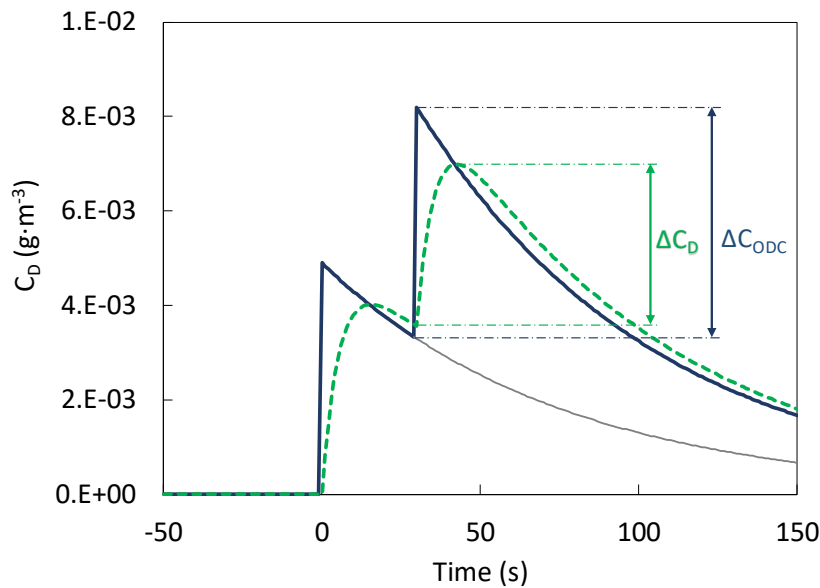


Figura 26. Simulación teórica de la concentración observada en la cámara (CODC; —) y en el detector UGGA ( $C_D$ ;---, que debería ser observada durante un evento ebullitivo doble en un intervalo de 30s. Esta simulación fue obtenida de las ecuaciones de balance de masa, en las siguientes condiciones; diámetro de burbuja, 5mm; composición de burbuja, 100%CH<sub>4</sub>;  $\theta_{ODC}$ , 6s; T, 293.15 K; P, 1 atm.

$$\Delta C_{ODC} = \alpha \cdot \Delta C_D \quad (\text{A12})$$

De esta forma, la masa de CH<sub>4</sub> ( $M_{B,CH_4}$ ) contenida en la burbuja puede ser fácilmente determinada;

$$M_{B,CH_4} = \Delta C_{ODC,CH_4} \cdot V_{ODC} \quad (5, A13)$$

Posteriormente, determinamos el volumen de CH<sub>4</sub> contenido en cada burbuja ( $V_{B,CH_4}$ ), y su diámetro equivalente ( $\phi_{B,CH_4}$ ) de acuerdo con la ley de gases ideales (Eqs. 6–7, S14–S15), donde  $V_M$  es el volumen molar del gas de interes (Eq. A11).

$$V_{B,CH_4} = \left( \frac{M_{B,CH_4}}{16} \right) \cdot V_M \quad (6, S14)$$

$$\phi_{B,CH_4} = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{3}{4} \cdot \frac{V_{B,CH_4}}{\pi}} \quad (7, S15)$$

### Procesamiento de datos.

Durante la aplicación de campo del método de ODC, como se describió anteriormente, establecimos el mejor método para el procesamiento de datos como una combinación de determinación de flux y caracterización de burbujas. La estrategia se describe en la Figura 27, sobre la base de una medición real realizada en una región altamente ebullitiva del LG. Después de la calibración, la ODC se colocó en la superficie del ecosistema. Se necesitaron aproximadamente 30s para que el sistema se estabilizara. Luego, la  $C_D$  se adquirió continuamente con una frecuencia de 1 Hz. El tratamiento de los datos consistió, primero, en la detección del evento ebullitivo y la caracterización de las burbujas, de acuerdo con las Ecuaciones 5–9. Luego, las mediciones de  $C_D$  se convirtieron en fluxes (Ecuación 1), que se suavizaron (Ecuaciones 2, 3).

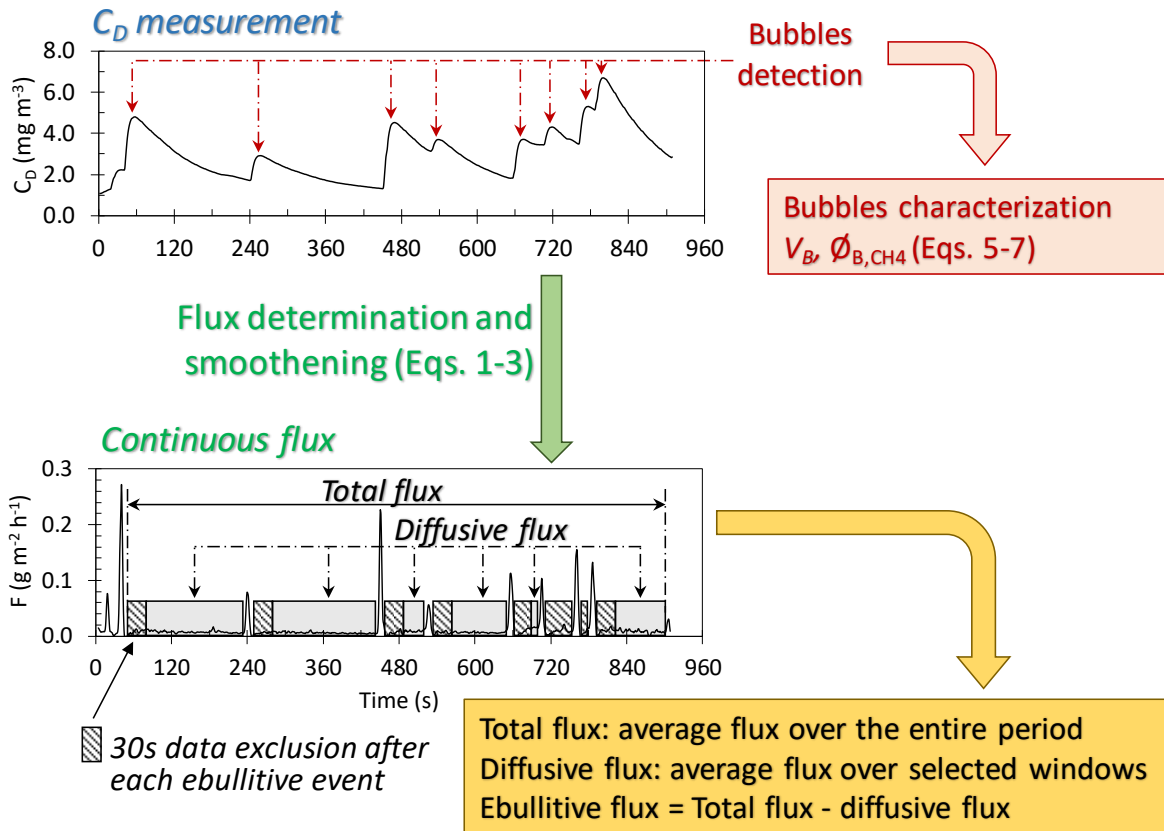


Figura 27. Secuencia de procesamiento de datos.

Como se muestra en la sección Resultados y discusión, justo después de un evento de ebullición, se observó una inestabilidad significativa en los datos de flujo durante 10–15s, que correspondía al período durante el cual la  $C_D$  alcanzaba la concentración máxima y volvía a una tendencia decreciente. En consecuencia, para reducir los errores en los cálculos de flux difusivo, decidimos descartar 30s de datos después de cada evento ebullitivo. Como se muestra en la Figura 27, el flux total se determinó como el promedio del conjunto completo de datos de flux (sin períodos de exclusión), mientras que el flux difusivo se determinó como el promedio del flux difusivo durante los períodos seleccionados, y el flux ebullitivo se determinó a partir de la diferencia entre el flux total y difusivo.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)



## Initial report on methane and carbon dioxide emission dynamics from sub-Antarctic freshwater ecosystems: A seasonal study of a lake and a reservoir



Oscar Gerardo-Nieto <sup>a</sup>, María Soledad Astorga-España <sup>b</sup>, Andrés Mansilla <sup>b,c</sup>, Frederic Thalasso <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN 2508, 07360 México, DF, Mexico

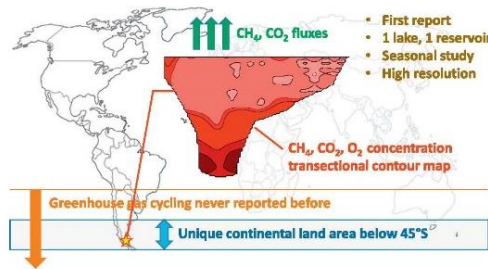
<sup>b</sup> Universidad de Magallanes, Departamento de Ciencias y Recursos Naturales, POB 113-D, Punta Arenas, Chile

<sup>c</sup> Instituto de Ecología y Biodiversidad, Casilla 653, Santiago, Chile

### HIGHLIGHTS

- Greenhouse gas emissions from sub-Antarctic lakes have not yet been reported.
- A sub-Antarctic lake and a reservoir were seasonally characterized.
- CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes and concentrations were similar to those in northern lakes.
- In contrast, ebullition was never observed in these sub-Antarctic lakes.
- Lakes in this region likely contribute a marginal amount to global GHG emissions.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 December 2016  
 Received in revised form 16 February 2017  
 Accepted 17 February 2017  
 Available online xxxx

Editor: Jay Gan

#### Keywords:

CH<sub>4</sub>  
 Carbon dioxide  
 Oxygen  
 Dissolved gas  
 Contour maps

### ABSTRACT

The sub-Antarctic Magellanic ecoregion is a part of the world where ecosystems have been understudied and where the CH<sub>4</sub> cycling and emissions in lakes has not ever been reported. To fill that knowledge gap, a lake and a reservoir located at 53°S were selected and studied during three campaigns equally distributed over one year. Among the parameters measured were CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions, as well their dissolved concentrations in the water column, which were determined with high spatial resolution. No ebullition was observed and the CH<sub>4</sub> flux ranged from 0.0094 to 4.47 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> while the CO<sub>2</sub> flux ranged from -22.95 to 35.68 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Dissolved CH<sub>4</sub> concentrations varied over more than four orders of magnitude (0.025–128.75 μmol L<sup>-1</sup>), and the dissolved carbon dioxide ranged from below the detection limit of our method (i.e., 0.15 μmol L<sup>-1</sup>) to 379.09 μmol L<sup>-1</sup>. The high spatial resolution of the methods used enabled the construction of bathymetric maps, surface contour maps of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes, and transect contour maps of dissolved oxygen, temperature, and dissolved greenhouse gases. Overall, both lakes were net greenhouse gas producers and were not significantly different from temperate lakes located at a similar northern latitudes (53°N), except that ebullition was never observed in the studied sub-Antarctic lakes.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.  
 E-mail address: [thalasso@cinvestav.mx](mailto:thalasso@cinvestav.mx) (F. Thalasso).



## 1. Introduction

Although lakes and reservoirs only cover about 3.7% of the continental surface on Earth (Verpoorter et al., 2014), it has been estimated that they are responsible for about 16% of the total CH<sub>4</sub> emissions to the atmosphere (Bastviken et al., 2011; Saunois et al., 2016). CH<sub>4</sub> emissions from lakes and reservoirs are therefore a major component of the global biogeochemical carbon cycle. CH<sub>4</sub> production in freshwater ecosystems has been well described since the early 1960s (Koyama, 1963), while CH<sub>4</sub> emissions have been the subject of growing interest since the early 1980s (Harriss and Sebach, 1981). Similarly, freshwater ecosystems are an important source of CO<sub>2</sub>, emitting an estimated 1.4 Pg-C y<sup>-1</sup> (Tranvik et al., 2009), of which lakes and reservoirs emit about 0.32 Pg-C y<sup>-1</sup> (Raymond et al., 2013). However, despite a large number of reports on CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling in freshwater ecosystems, little attention has been given to the southern hemisphere. For example, the syntheses by Bastviken et al. (2011) and Saunois et al. (2016) do not report CH<sub>4</sub> emissions from aquatic ecosystems further south than 24°S, and to the best of our knowledge, there are not reports on CO<sub>2</sub> emissions from these southern latitudes, either.

Southern Patagonia, or more precisely the sub-Antarctic Magellanic ecoregion (Rozzi et al., 2012), is a part of the world where ecosystems have been understudied (Rozzi et al., 2008) and from which the CH<sub>4</sub> cycling and emissions in lakes have never been reported. However, this region of 145,000 km<sup>2</sup> is of major importance for several reasons. First, it is a globally unique continental area located between 45 and 55°S, further south than the Cape of Good Hope (Africa, 35°S) and the Bass Strait (Australia, 39°S). Second, this region is one of the twenty-four most conserved areas of the world because of its preserved flora and fauna combined with low population density (72% of the area is protected; Mittermeier et al., 2003). Third, the area is characterized by the cleanest rainwater and streams in the world, mostly because rain originates over the southern Pacific, outside of air streams carrying industrial pollutants (Hedin et al., 1995).

Measuring CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling and emissions in lakes from the sub-Antarctic Magellanic ecoregion is therefore of great importance, because it would fill a knowledge gap and better constrain global estimates of greenhouse gas emissions from aquatic ecosystems. Moreover, it may also serve as a baseline for conditions in temperate pristine environments with which to compare temperate lakes in Europe and North America.

In this context, the objective of the present work was to characterize CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling and emissions with high spatial resolution for a lake and a reservoir in the sub-Antarctic Magellanic ecoregion in three seasonally characteristic months (i.e., for spring, summer, and winter).

The CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling and emissions were characterized through an extensive determination of fluxes and dissolved concentrations in the water column. To complement our understanding of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling, dissolved oxygen (DO) concentrations and several other physico-chemical parameters were also measured. The various parameters of the studied lakes are discussed and compared with those of northern lakes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study sites and campaigns

Two sub-Antarctic lakes were selected. The first was Lake Hambre (LH; 53.6035°S, 70.9526°W; Fig. 1A and Fig. S1A), a natural lake with a round shape located 50 km south of Punta Arenas (53.16°S, 70.92°W) and 60 m above sea level (ASL). This lake is in a protected area with limited access and operated by "Parque del Estrecho de Magallanes." The second was Lake Lynch (LL; 53.1757°S, 71.0076°W; Fig. 1B, C, and Fig. S1B), which is a natural lake that was modified in 1925 and 1940 with a constructed dam to increase its capacity. That reservoir is located 12 km west of Punta Arenas at 220 m ASL and within another protected area—"Reserva Nacional de Magallanes." There is no current anthropogenic use of the water in LH, while LL is a primary source of drinking water for Punta Arenas City, the water services of which are operated by "Aguas de Magallanes." The selection of these lakes was based on several criteria, specifically remoteness from anthropogenic activities, boat accessibility, communication ability, and the presence of natural sub-polar forests (the dominant ecosystem of the region) in the lake surroundings. Moreover, we selected relatively small lakes (Table 1) because small lakes are a common feature of the region as well as the major type of lake worldwide (Cael and Seekell, 2016). Small lakes are also more dynamic than large lakes (Cael and Seekell, 2016; Holgersson and Raymond, 2016), making them a good model for this first approach study.

Weather in the Punta Arenas region is cold, with an annual average temperature of 6.5 °C and a range in monthly average temperatures of 10 °C, with July and January being the coldest and hottest months at average temperatures of 1.8 and 11.0 °C, respectively (Butorovic, 2013). The region is characterized by heavy wind, with an average wind speed of 5.2 m s<sup>-1</sup> and frequent gusts up to 30 m s<sup>-1</sup> (Butorovic, 2013). No reliable data on the weather at LH is available, although it is assumed that the weather is similar to that at Punta Arenas because of their proximity. However, LL is at an elevation 160 m higher than that of LH and more exposed to winds, which would cause moderately

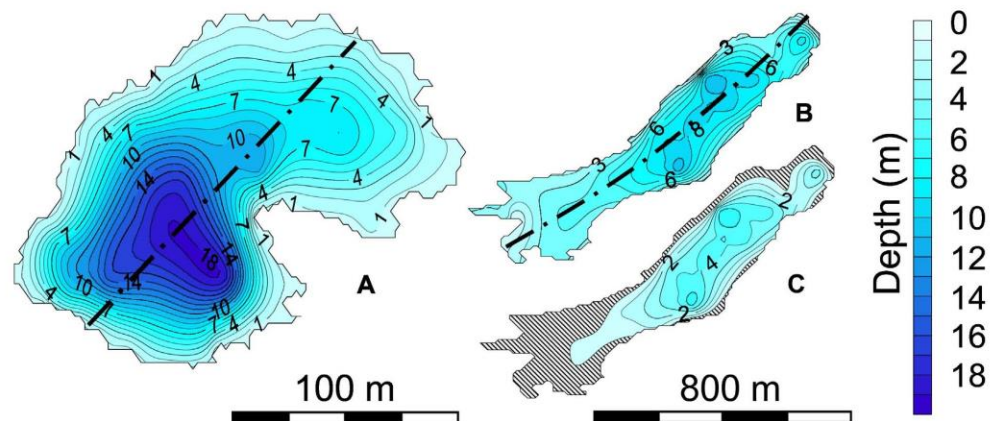


Fig. 1. Bathymetric maps of Lake Hambre, LH (A), and Lake Lynch, LL, during spring (B) and summer (C); discontinuous lines show the longitudinal transects used for transection mapping.

**Table 1**

Lake properties and physicochemical parameters of Lake Hambre and Lake Lynch (Magellanic region, Chile).  $A_w$  – surface area;  $Z_m$  – mean depth;  $Z_{max}$  – maximum depth;  $V$  – volume;  $D_L$  – shoreline development;  $L_T$  – longitudinal transect length; RWCS – relative water column stability;  $T$  – temperature; DO – dissolved oxygen; TN – total nitrogen; SD – Secchi depth; Chla – chlorophyll “a”; SRP – soluble reactive phosphorus; ND – not determined.

Lake	Hambre (LH)			Lynch (LL)		
	Spring	Summer	Winter	Spring	Summer	Winter
$A_w$ (m <sup>2</sup> )	16,400	16,400	16,400	262,000	127,000	262,000
$Z_m$ (m)	6.2	6.2	6.2	5	2.5	ND
$Z_{max}$ (m)	19.7	19.7	19.7	8.2	5.0	ND
$L_T$ (m)	173	173	173	1120	965	ND
$V$ (m <sup>3</sup> )	101,680	101,680	101,680	1,310,000	317,500	ND
$D_L$ (–)	1.33	1.33	1.33	2.02	1.67	1.81
RWCS <sup>a</sup>	25.11 (PS)	86.65 (S)	1.56 (M)	0.92 (M)	2.41 (M)	5.87 (M)
$T$ (°C)	7.47 ± 2.25	11.23 ± 2.79	2.94 ± 0.34	5.27 ± 0.21	11.10 ± 0.14	1.17 ± 0.45
DO <sup>b</sup> (μmol L <sup>-1</sup> )	381.7 ± 67.8	267.6 ± 26.8	355.3 ± 35.8	227.3 ± 20.6	264.6 ± 10.8	162.4 ± 4.7
pH (–)	7.8 ± 0.4	7.3 ± 0.4	8.1 ± 0.8	8.6 ± 0.8	8.6 ± 0.2	7.8 ± 0.2
TN (mg L <sup>-1</sup> )	0.30 ± 0.20	ND	ND	0.18 ± 0.02	ND	ND
SD (m)	2.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3
Chla (μg L <sup>-1</sup> )	6.7 ± 0.4	8.1 ± 0.3	6.2 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.5 ± 0.3	1.5 ± 0.2
SRP (mg L <sup>-1</sup> )	0.023 ± 0.005	0.047 ± 0.003	0.025 ± 0.005	0.032 ± 0.004	0.054 ± 0.007	0.023 ± 0.006

<sup>a</sup> RWCS: M, mixed; PS, partially stratified; S, stratified.

<sup>b</sup> DO above oxycline.

colder weather at LL than at LH. Both lakes were characterized during three campaigns at 4-month intervals and in seasonally characteristic months: October 2014 (early spring), February 2015 (mid-summer), and June 2015 (early winter). Each campaign lasted for approximately one month.

## 2.2. Lake morphometry and physicochemical characteristics

In each field campaign and each lake, the depth was measured at 50 to 70 locations using a portable sounder (Depthmate Portable Sounder, Speedtech, USA). Locations were determined with a global positioning system (eTrex 20, Garmin, USA). The water surface area ( $A_w$ ) was obtained through image analysis of aerial photographs. Lake volume ( $V$ ) was determined from depth and area measurements. Two morphometric parameters, i.e., the average depth ( $Z_m$ ) and the shoreline development ( $D_L$ ), were determined by Eqs. (1) and (2), where  $L$  is the shoreline length of the lake.

$$Z_m = \frac{V}{A_w} \quad (1)$$

$$D_L = \frac{L}{2\sqrt{\pi A_w}} \quad (2)$$

From 8 to 13 sampling and monitoring stations were selected along the longest transect of each lake (Fig. 1). At each sampling station, temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) were measured from the surface to the sediments at depth intervals of 1 m using a multi-parametric probe (HI 9828, Hanna Instrument, Mexico). In addition, surface water samples were taken (1 m depth) with a horizontal 2.2-L Van Dorn bottle (Wildco, Mexico) for determination of total nitrogen (TN), total organic carbon (TOC), inorganic carbon (IC), chlorophyll *a* (Chla), and Soluble Reactive Phosphorus (SRP). Water samples were handled according to standard methods (APHA, 1989). TN, TOC, and TC were determined using a total carbon and nitrogen analyzer (Shimadzu-Vcsm + TN1 module, Shimadzu, Mexico). Chla and SRP concentrations were determined according to standard methods (APHA, 1989).

Water densities derived from surface and bottom water temperatures were used to determine the relative water column stability (RWCS; Padisák et al., 2003) by calculation with Eq. (3), where  $D_B$  is the density of bottom water,  $D_S$  is the density of surface water, and  $D_4$  and  $D_5$  are the densities of water at 4 °C and 5 °C, respectively (Kalff, 2002). Lakes with an RWCS > 56.5 were considered fully stratified, lakes, those with RWCS < 16.3 were considered fully mixed, and those with intermediate RWCS were considered partially stratified (Branco

et al., 2009). The depth of the thermocline was determined from the water column stability, according to the method of Coloso et al. (2010).

$$RWCS = \frac{D_B - D_S}{D_4 - D_5} \quad (3)$$

## 2.3. Dissolved greenhouse gas concentrations

Dissolved CH<sub>4</sub> ( $C_{CH_4}$ ) and CO<sub>2</sub> ( $C_{CO_2}$ ) concentrations in the water column were determined using membrane-integrated cavity output spectrometry (M-ICOS) previously developed by Gonzalez-Valencia et al. (2014). Briefly, this method consists of a counter flow of CH<sub>4</sub>- and CO<sub>2</sub>-free nitrogen to the flow of water continuously extracted from the desired depth. The two fluids cross in a gas/liquid exchange module (PDMSXA-1000, Medarray Inc., USA). This module was composed of an array of silicone hollow fibers, with a total exchange area of 1000 cm<sup>2</sup>. The water flowed outside of the hollow fibers and inside of the module shell, while the CH<sub>4</sub>- and CO<sub>2</sub>-free nitrogen flowed inside the hollow fibers. Because of diffusive forces, the dissolved CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> contained in the water were transferred to the gas phase, where they were detected using an ultraportable greenhouse gas analyzer (UGGA, Los Gatos Research, USA). The water was continuously extracted at the desired depth with a peristaltic pump (12 V, Solinst, Mexico) at a flow rate of 1.2 L min<sup>-1</sup>, while the CH<sub>4</sub>- and CO<sub>2</sub>-free nitrogen was flowing at a constant flow rate of 0.75 L min<sup>-1</sup> controlled by a mass flow controller (GFC-17, Aalborg, Mexico).

A sample of the lake water was taken and measured using the M-ICOS and standard headspace equilibration methods in parallel for calibration at the beginning and end of each measurement day. The headspace equilibration method consisted of taking 40 mL of the water sample in a 60-mL disposable syringe, adding 20 mL of CH<sub>4</sub>- and CO<sub>2</sub>-free nitrogen, and then vigorously shaking for 20 s to allow for gas/liquid equilibration. The mixed liquid was evacuated and 20 mL of the syringe headspace was injected into the gas line of the UGGA, which caused a peak response that was integrated to determine the headspace CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations. The CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations in the water sample were determined from the headspace concentrations by applying Henry's law as given in Eq. (4) where  $T$  is the water temperature (K),  $H_{298.15}$  is the standard Henry constant (at 298.15 K), and  $\tau$  is the temperature dependence constant. The values for  $H_{298.15}$  and  $\tau$  were obtained from the literature (NIST, 2016). Details on this procedure can be found in

Gonzalez-Valencia et al. (2014).

$$H_T = H_{298.15} \cdot e^{\gamma \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right)} \quad (4)$$

The procedure for determining the  $C_{CH_4}$  and  $C_{CO_2}$  profiles involved first placing the water extraction probe a few centimeters below the water surface for about 60 s. The probe was then lowered slowly and steadily to the bottom of the lake, where it stayed for an additional 30 s. A controlled diving speed was maintained (about  $1 \text{ m min}^{-1}$ ). With this procedure, about 60 measurements of dissolved gases were acquired for each m of water column depth.

#### 2.4. Greenhouse gas fluxes

$CH_4$  and  $CO_2$  fluxes were determined in 30 to 40 locations for each lake during each field campaign with a floating static chamber (SC) connected to an UGGA in closed circuit. To reduce turbulence effects, the design of the SC minimized the penetration depth ( $<1 \text{ cm}$ ) while still ensuring an effective seal. The locations for flux measurements were selected in the following order of priority: (i) transect lines where all parameters were determined (8 to 10 locations in each lake and campaign), (ii) measurements in the littoral zone (13 to 17 locations) to ensure that the boundary conditions for data interpolation and contour mapping were well established, and (iii) measurements at medium distances between the littoral zone and the transect line (9 to 13 locations). We checked after each measurement day that the sampling points were well-distributed over the entire lake surface and that the number of measurements was adequate following the method suggested by Wik et al. (2016). Flux was determined using Eq. (5) where  $F$  is the flux ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ),  $\Delta C$  is the change in  $CH_4$  or  $CO_2$  concentration observed in the SC over the time interval ( $\Delta t$ ),  $V_{SC}$  is the SC volume (7.8 L), and  $A_{SC}$  is the area of the SC in contact with the water surface ( $0.096 \text{ m}^2$ ).

$$F = \frac{\Delta C}{\Delta t} \cdot \frac{V_{SC}}{A_{SC}} \quad (5)$$

The SC method measures the total flux at the surface of a lake and includes both diffusive and ebullitive fluxes. Because this method included continuous measurements of  $CH_4$  and  $CO_2$  concentrations at a frequency of 1 Hz, it allowed for a distinction between the two emission modes. Diffusive fluxes are typified by a linear increase of  $CH_4$  or  $CO_2$  concentrations in the SC, while during ebullition a bubble reaching the SC causes a sudden step increase in the concentration. Prior to the flux measurements, visual observations of the area were performed and long-term (15 min) flux measurements were taken in the littoral zones of the lakes—where ebullition is more frequently observed (Natchimuthu et al., 2015)—to determine if this flux mode was present. When no ebullition was observed prior to or during the flux measurements, emissions were determined from  $CH_4$  and  $CO_2$  concentration measurements 30 s after positioning the SC on the water surface and for 3 min of continuous measurement. When ebullition was observed, SCs were maintained in position for a much longer period, i.e., until enough data were collected to determine a linear slope with a linear correlation coefficient better than 0.8. Each flux determination was done in triplicate.

#### 2.5. Data treatment and statistics

From the data obtained during the field campaigns, bathymetric maps and surface contour maps of  $CH_4$  and  $CO_2$  fluxes were established. Transect contour maps were also established for DO, T,  $C_{CH_4}$ , and  $C_{CO_2}$ . Fluxes were interpolated with the Surfer 11.0 software (Golden Software, USA). The selection of the best interpolation method, out of the 10 methods included in the Surfer software, was based on two criteria: the mean absolute error (MAE) and the mean bias error (MBE; Willmott

and Matsuura, 2006). The total  $CH_4$  and  $CO_2$  emissions from each lake were determined by integrating the interpolated fluxes over the spatial distribution (Borjesson et al., 2000). Greenhouse gas fluxes ( $C_{CH_4}$  and  $C_{CO_2}$ ), DO, T, and pH distributions were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. When data were not normally distributed, they were  $\log_{10}$  transformed for comparison purposes. Significant differences among data sets (e.g., lake, season, and water column depths) were also tested. All statistical analyses were done with the NCSS 2000 Statistical Analysis System software (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Lake morphology

Morphometric data of LH and LL are summarized in Table 1 and bathymetric maps are shown in Fig. 1. The water level in LH was unchanged over the three campaigns at an average depth of 6.2 m, a maximum depth of 19.7 m, and an average volume of  $101,680 \text{ m}^3$ . The water level in LL changed considerably over time due to operation of the reservoir. During spring, the maximum depth was 8.2 m and the reservoir volume was  $1,310,000 \text{ m}^3$  while in summer the water level, volume, and area of the reservoir were reduced by 62, 75, and 52%, respectively, from the corresponding spring values. During the winter campaign, LL was frozen, which significantly reduced sampling and lake characterization. During that campaign, only three locations could be reached, approximately at the center of the lake. The LH shoreline development ( $D_L$ ) was 1.33 in all seasons, while for LL the  $D_L$  varied from 1.67 in spring to 2.02 in summer.

#### 3.2. Physicochemical characterization

Fig. 2 shows the temperature transect contour maps from data recorded during the three periods. According to the RWCS, LH was partially stratified during spring (Table 1) with a thermocline located at approx. 4 m. During summer, LH was fully stratified with a thermocline located at approx. 6 m, while during winter, LH was fully mixed. In LL, the water column was mixed during all three seasons, probably due to high winds. Wind creates frictional stress at the water surface, forming waves and currents that are propagated throughout the water column (Joyce and Jewell, 2003). During summer, the water level in LL was substantially reduced (maximum depth 5.0 m), making it more prone to wind mixing. During winter, the surface water temperature in both lakes was slightly lower than the bottom water temperature, with gradients of 0.9 and  $1.3 \text{ }^\circ\text{C}$  for LH and LL, respectively. However, the RWCS was low and the water column for both lakes was considered mixed. The average temperature over the entire transection in LH was  $7.47 \pm 2.25 \text{ }^\circ\text{C}$  in spring,  $11.23 \pm 2.79 \text{ }^\circ\text{C}$  in summer, and  $2.94 \pm 0.34 \text{ }^\circ\text{C}$  in winter. For LL, the mean temperature was  $5.27 \pm 0.21 \text{ }^\circ\text{C}$  in spring,  $11.10 \pm 0.14 \text{ }^\circ\text{C}$  in summer, and  $1.17 \pm 0.45 \text{ }^\circ\text{C}$  in winter. Based on the measured RWCS, LH and LL were classified as monomictic and polymictic lakes, respectively (Lewis, 1983).

Table 1 shows the physicochemical parameters measured in both lakes. In both lakes and in all seasons, the average pH was basic, ranging from  $7.3 \pm 0.4$  to  $8.6 \pm 0.8$ . When thermal stratification was observed (i.e., LH in summer), a pH gradient was also observed ( $7.7 \pm 0.1$  in the epilimnion and  $6.9 \pm 0.2$  in the hypolimnion). A chemocline was also observed at the same depth as the thermocline (6 m). The Secchi depths ranged from  $1.3 \pm 0.3$  to  $3.2 \pm 0.2 \text{ m}$ , which corresponds to eutrophic conditions in lakes (OECD, 1982). The concentration of Chla ranged from  $1.5 \pm 0.2$  to  $8.1 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , which corresponds to concentrations generally found in mesotrophic lakes (Chapra and Tarapchak, 1976). The surface concentration of total nitrogen measured during spring was  $0.30 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$  in LH and  $0.18 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$  in LL, which corresponds to an oligotrophic range (Dodds et al., 1998). Using the Carlson (1977) classification, when combining Secchi depth with

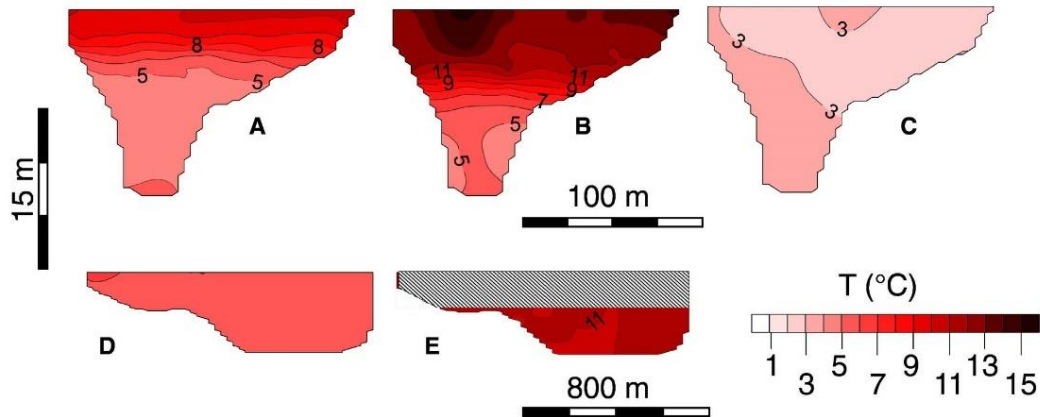


Fig. 2. Transect temperature profiles of Lake Hambre, LH, during spring (A), summer (B), and winter (C), and of Lake Lynch, LL, during spring (D) and summer (E).

concentrations of Chla and total nitrogen, both LL and LH were classified as mesotrophic lakes.

### 3.3. Dissolved gas dynamics

Fig. 3 shows the DO transect contour maps for LH and LL. In both lakes and in all seasons, the water column was fully oxygenated, except during summer in LH when a strong stratification was observed and anoxic conditions were found under the oxycline (Table 1, Fig. 3B). Overall, the DO concentrations were close to saturation values, except in LL during winter where the DO concentration was only about 48% of saturation. This relatively low DO concentration was probably caused by the ice cover, which impeded oxygen transfer from the atmosphere and substantially reduced light penetration and oxygen production by photosynthesis (Clilverd et al., 2009; White et al., 2008). As with the temperature profiles, no DO longitudinal trends were observed in every season.

The  $C_{CH_4}$  observed in the lakes varied over more than four orders of magnitude, from  $0.025 \mu\text{mol L}^{-1}$  (in the surface water of LL during spring) to  $128.75 \mu\text{mol L}^{-1}$  (at the bottom of LH during summer) (Fig. 4). The average  $C_{CH_4}$  observed for the entire water column of the transect of LH was  $0.069 \pm 0.043 \mu\text{mol L}^{-1}$  in spring,  $9.61 \pm 21.14 \mu\text{mol L}^{-1}$  in summer,

and  $0.21 \pm 0.13 \mu\text{mol L}^{-1}$  in winter. In LL the mean transect  $C_{CH_4}$  was  $0.057 \pm 0.015 \mu\text{mol L}^{-1}$  in spring,  $0.68 \pm 0.11 \mu\text{mol L}^{-1}$  in summer, and  $0.24 \pm 0.07 \mu\text{mol L}^{-1}$  in winter. The order of magnitude difference observed between LH and LL in summer was due to the stratification of LH, with average surface concentrations of  $0.843 \pm 0.003$  and  $0.638 \pm 0.105 \mu\text{mol L}^{-1}$  along the transects of LH and LL, respectively. Overall, the  $C_{CH_4}$  data was of the same order of magnitude as data reported for lakes located at a similar northern latitudes (i.e., between  $53$  and  $55^\circ\text{N}$ ; Bartlett and Harriss, 1993; Casper et al., 2000; Tang et al., 2014). During winter in LL, only three  $C_{CH_4}$  profiles were measured at the approximate center of the lake because the lake was covered by an ice-sheet of approximately 1 cm, and because no longitudinal gradient was observed in previous campaigns. The average  $C_{CH_4}$  values for these winter profiles were significantly higher than those taken during spring ( $p < 0.05$ ). Combined with the lower DO concentration, the higher  $C_{CH_4}$  suggests that the ice cover impeded gas exchange with the atmosphere and therefore promoted an accumulation of  $\text{CH}_4$  and a decrease of DO concentration, as is commonly observed in northern lakes (Bartosiewicz et al., 2016; Encinas-Fernández et al., 2014; Martínez-Cruz et al., 2015; Sepulveda-Jauregui et al., 2015; Striegl and Michmerhuizen, 1998). In both lakes, the lowest observed  $C_{CH_4}$  was four orders of magnitude above the atmospheric saturation for  $\text{CH}_4$  of 1.8 ppmv, which was the

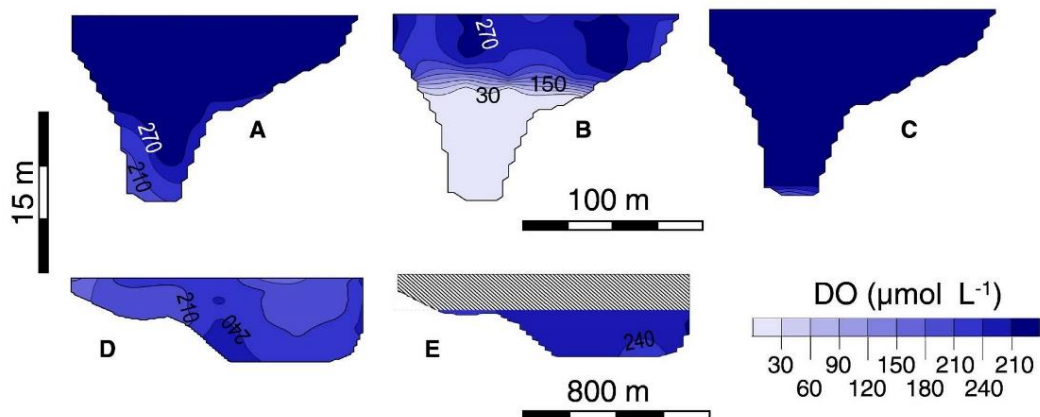


Fig. 3. Transect DO profiles of Lake Hambre, LH, during spring (A), summer (B) and winter (C), as well as of Lake Lynch, LL, during spring (D) and summer (E).

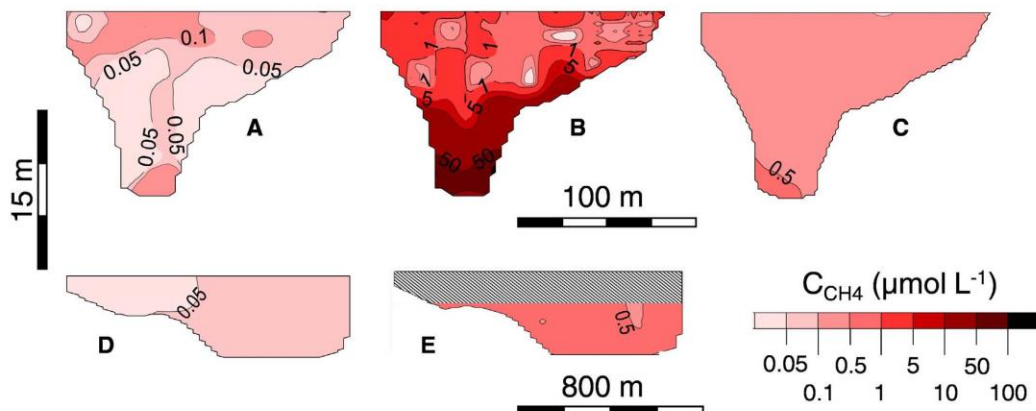


Fig. 4. Transect  $C_{CH_4}$  profiles of Lake Hambre, LH, during spring (A), summer (B), and winter (C), as well as of Lake Lynch, LL, during spring (D) and summer (E).

average concentration measured 1 m above the surface of each lake.  $C_{CH_4}$  values greater than atmospheric equilibrium are a clear indication that both lakes were  $CH_4$  sources, as will be discussed further on.

In a manner similar to that of the DO profile, a major  $C_{CH_4}$  depth gradient was observed during summer stratification in LH, when the  $C_{CH_4}$  in the bottom layer was up to 300 times higher than that at the surface, due to  $CH_4$  accumulation in the anoxic hypolimnion.  $CH_4$  accumulation in the hypolimnion of stratified lakes has been widely reported in the literature (Bartosiewicz et al., 2016; Bastviken et al., 2004; Borrel et al., 2011; Encinas-Fernández et al., 2014; Granin et al., 2013; López Bellido et al., 2009; Striegl and Michmerhuizen, 1998). This commonly observed vertical  $CH_4$  gradient is typically the result of the following three factors: (i) methanogenesis in lake sediments and subsequent accumulation in bottom water following consumption of oxygen, (ii) the existence of a strong thermocline preventing mixing, and (iii) methanotrophic conditions occurring at the resulting oxycline in which  $CH_4$  is readily consumed by the oxygen in the water above (Bastviken et al., 2004). The existence of aerobic  $CH_4$  oxidation by methanotrophs is supported by  $C_{CH_4}$  profiles being inversely proportional to DO concentrations (Figs. 3 and 4), as previously reported (Lambert and Sommer, 2007; Martínez-Cruz et al., 2015), although we did not measure oxidation rates in this study.

During summer, the average  $C_{CH_4}$  below the thermocline of LH was  $24.11 \pm 29.08 \mu\text{mol L}^{-1}$  and the total mass of  $CH_4$  accumulated in the hypolimnion was estimated to be 16.8 kg for the entire lake, or  $0.131 \text{ mol m}^{-2}$  when considering only the area of the lake where  $CH_4$  accumulation was observed. This accumulated  $CH_4$  would eventually be released during autumn turnover, as will be discussed in the next section. No longitudinal  $C_{CH_4}$  trend was found in any lake or in any season.

Fig. 5 shows the  $C_{CO_2}$  transection contour maps of LH and LL for the three seasons. During spring at LH, the dissolved  $CO_2$  was below the detection limit of our method, i.e.,  $0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Gonzalez-Valencia et al., 2014), at any position or depth along the transect of the lake. To rule out some failure in our measurement method, samples of drinking water in equilibrium with atmospheric  $CO_2$  were measured using our instruments, which gave positive readings. It was concluded that our instruments were functioning and that  $C_{CO_2}$  was below the detection limit, which is well below saturation equilibrium with the atmosphere ( $23 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The latter was confirmed by measurement of negative  $CO_2$  fluxes to the atmosphere, which will be discussed in Section 3.4. In LH during summer and winter, the  $C_{CO_2}$  ranged from  $379.1 \pm 419.0$  to  $101.3 \pm 24.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ , with a clear depth gradient observed during summer. That gradient was observed at the same depth as the thermocline, the oxycline, and the  $C_{CH_4}$  profile. In LL,  $C_{CO_2}$  ranged from  $41.5 \pm$

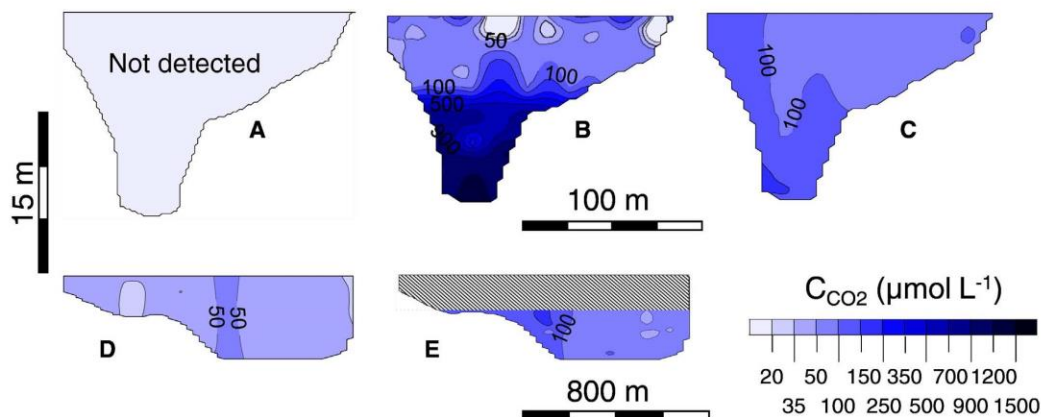


Fig. 5. Transect  $C_{CO_2}$  profiles of Lake Hambre, LH, during spring (A), summer (B), and winter (C), as well as of Lake Lynch, LL, during spring (D) and summer (E).

8.2 to  $144.0 \pm 21.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  without any depth gradient, which is in accordance with the mixed water column observed in all seasons. Excluding spring data in LH,  $C_{\text{CO}_2}$  was from three to four orders of magnitude above saturation, with an atmospheric concentration of 410 ppmv, which was the average atmospheric concentration measured 1 m above the lake surfaces.

During summer in LH, the average  $C_{\text{CO}_2}$  below the thermocline was  $815.0 \pm 276.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The total mass of  $\text{CO}_2$  accumulated in the hypolimnion was estimated to be 1277 kg for the entire lake, or  $3.6 \text{ mol m}^{-2}$  when considering only the area of the lake where  $\text{CO}_2$  accumulation was observed. As with  $\text{CH}_4$ , this accumulated  $\text{CO}_2$  would eventually be released during autumn turnover, as will be discussed further on. No longitudinal  $C_{\text{CO}_2}$  trend was found in any lake during any season.

### 3.4. Greenhouse gas emissions

Interestingly, in both lakes and in all campaigns, no evidence of ebullition was observed, either by visual observation or during SC measurements. Over a total of approximately 630 flux measurements (which corresponded to a cumulated measurement time of 30 h) peak increases in the  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  concentrations were never observed. Assuming bubble sizes from 1 to 10 mm (DelSontro et al., 2015) and a  $\text{CH}_4$  content in the bubbles of 70% (Walter Anthony et al., 2010), any bubble reaching the SC would have generated a step increase in the measured  $\text{CH}_4$  concentrations from 0.047 to 47 ppm. An increase in  $\text{CH}_4$  concentration of that magnitude would have been detected by the UGGA, which measured  $\text{CH}_4$  concentrations with a frequency of 1 Hz, sensitivity of 1 ppb, and noise of approximately 10 ppb. As our flux measurements included the littoral zones of the lakes where ebullition is more frequently observed (Keller and Stallard, 1994; Natchimuthu et al., 2015), it was concluded that ebullition was not a significant emission mode and that diffusion dominated.

Fig. 6 shows  $\text{CH}_4$  flux contour maps, which ranged from 0.009 to  $4.47 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . In LH the mean  $\text{CH}_4$  flux was  $0.26 \pm 0.13 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in spring,  $1.44 \pm 0.99 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in summer,

and  $0.097 \pm 0.095 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in winter. Summer  $\text{CH}_4$  fluxes in LH were significantly higher than those observed during spring or winter ( $p < 0.05$ ), while no significant difference was found between spring and winter emissions. Assuming that each of the three campaigns was equally representative of one third of the year, the average  $\text{CH}_4$  emissions from LH were  $0.57 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , and the total annual  $\text{CH}_4$  emissions from LH were  $0.219 \text{ mol m}^{-2}$  (54.8 kg for the entire lake surface). A storage component of 16.1 kg  $\text{CH}_4$  must be included in the total  $\text{CH}_4$  emissions (as previously estimated from the  $\text{CH}_4$  accumulation during summer in the hypolimnion), giving total emissions of 71.6 kg  $\text{CH}_4$ , of which 23% would be emitted from storage during the autumn turnover. This percentage is relatively low compared to previously reported values in temperate lakes (i.e., 45–80%; Bartosiewicz et al., 2016; Encinas-Fernández et al., 2014; Striegl and Michmerhuizen, 1998). The storage component estimated in the present work is subject to some potential significant errors. For one, the summer  $\text{CH}_4$  accumulation at the time of the measurement was probably not the absolute maximum. For another, our estimations did not include a quantification of  $\text{CH}_4$  oxidation by methanotrophic consumption.

In LL, the mean  $\text{CH}_4$  flux was  $0.101 \pm 0.061 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in spring and  $1.32 \pm 0.75 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in summer. During winter, when the lake was covered by ice, no flux was detected, undoubtedly because the ice-sheet acted as a hermetic gas barrier. Surface ice on LL is occasional and not usually observed over long periods. This suggests that winter storage (i.e., dissolved  $\text{CH}_4$  accumulation and storage under the hermetic ice cover) is probably not a significant component of the annual emissions. The annual mean emissions were therefore estimated assuming that the winter mean emissions were not significantly different from the spring emission, as observed in LH. From that assumption, the average  $\text{CH}_4$  emissions in LL were estimated to be  $0.508 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , corresponding to a total annual flux of  $0.186 \text{ mol m}^{-2}$ , which was close to the annual flux from LH of  $0.208 \text{ mol m}^{-2}$ .

Fig. 7 shows the  $\text{CO}_2$  flux contour maps. In LH, the mean  $\text{CO}_2$  flux was  $-22.95 \pm 14.42 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in spring,  $35.68 \pm 29.77 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in summer, and  $50.45 \pm 51.36 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in winter. Spring  $\text{CO}_2$

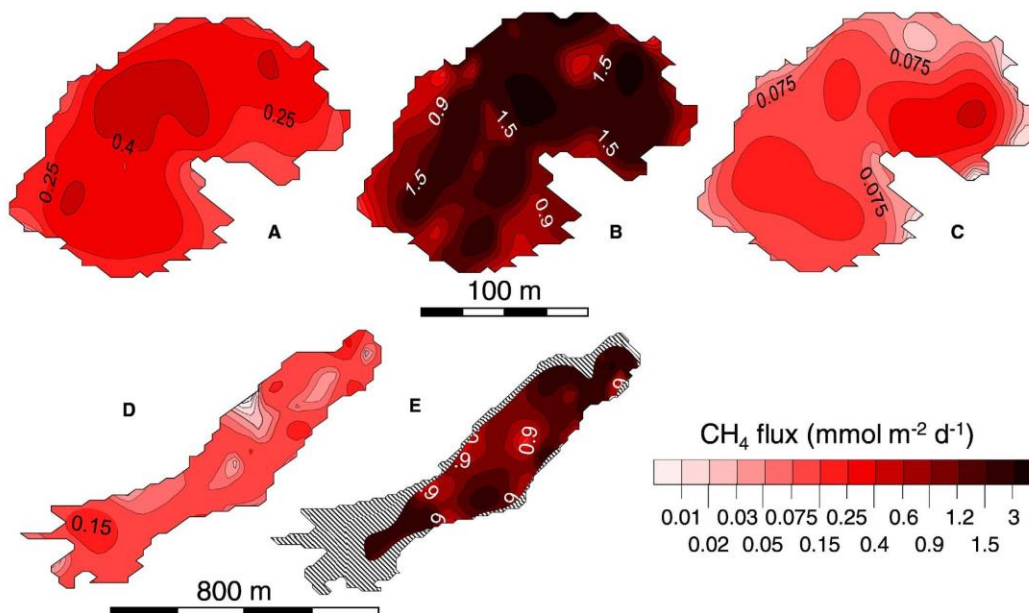


Fig. 6.  $\text{CH}_4$  fluxes of Lake Hambre, LH, during spring (A), summer (B), and winter (C), as well as of Lake Lynch, LL, during spring (D) and summer (E).

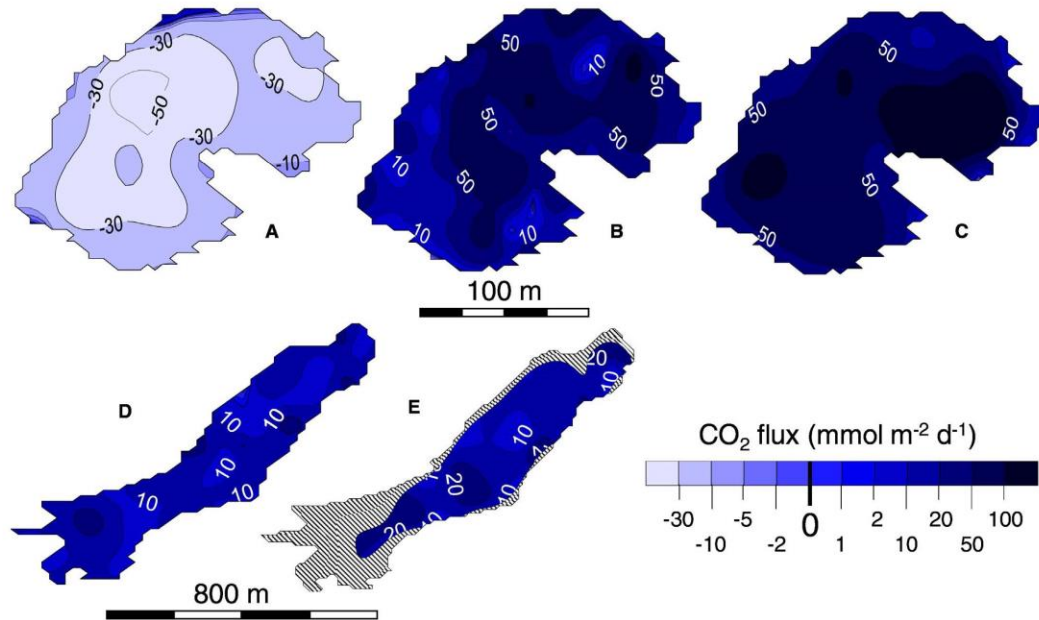


Fig. 7. CO<sub>2</sub> fluxes of Lake Hambre: LH during spring (A), summer (B) and winter (C); as well as of Lake Lynch: LL during spring (D), and summer (E).

flux in LH was significantly lower than those observed during summer or winter ( $p < 0.05$ ), while no significant difference was found between summer and winter emissions. The negative CO<sub>2</sub> fluxes observed during spring matched the measured  $C_{CO_2}$  values that were below the atmospheric concentration (Fig. 5). During spring, LH was therefore a sink of CO<sub>2</sub>, which has been previously reported in other lakes with alkaline pH and under-saturated  $C_{CO_2}$  (Bartosiewicz et al., 2015; McGinnis et al., 2015). The CO<sub>2</sub> uptake observed in LH might be explained by intensive phytoplankton growth (Nöges et al., 2016) or CO<sub>2</sub> conversion to soluble bicarbonate/carbonate and the subsequent precipitation (Wanninkhof and Knox, 1996). Assuming that each of the three campaigns was equally representative of one third of the year, the average CO<sub>2</sub> emissions in LH were estimated to be  $21.14 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , with total annual CO<sub>2</sub> emissions of  $7.68 \text{ mol m}^{-2}$  (5547 kg for the entire lake surface). As with CH<sub>4</sub>, a storage component of 1277 kg CO<sub>2</sub> must be added to the total CO<sub>2</sub> emissions (as previously estimated from the CO<sub>2</sub> accumulation in the hypolimnion during summer) giving total emissions of 6824 kg CO<sub>2</sub>, 19% of which would be emitted from storage during the autumn overturn.

In LL, the mean CO<sub>2</sub> fluxes were  $11.79 \pm 6.66 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  during spring and  $13.75 \pm 7.34 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  during summer. During winter, no CO<sub>2</sub> flux was detected due to ice cover. By assuming that storage under the ice cover was not a significant component of the annual CO<sub>2</sub> emissions in LL, and assuming that winter mean emissions were not significantly different from spring emissions, the average CO<sub>2</sub> emissions in LL were estimated to be  $12.58 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . This value corresponds to an annual flux of  $4.59 \text{ mol m}^{-2}$ , 40% less than the annual CO<sub>2</sub> flux estimated for LH. In LH, the storage component accounted for 19% of the total annual flux, suggesting that the absence of CO<sub>2</sub> storage in LL explains about half of the difference in annual fluxes observed between LL and LH.

Flux measurements in lakes are usually performed using an SC or wind-based models (Cole and Caraco, 1998). The literature suggests that an SC modifies the surface boundary conditions at the water/atmosphere interface, inducing turbulence in low-wind conditions but reducing it in windy conditions (Matthews et al., 2003). However, there

is no current consensus on the best method, and while Vachon et al. (2010) indicated large overestimation of fluxes measured by SC (as compared to wind-based methods), Bartosiewicz et al. (2015) obtained similar results from both methods. Undoubtedly, the presence of a floating structure modifies the lake surface locally, but wind-based methods require frequent calibration for the determination of the gas exchange coefficient, which is usually done with an SC (Schilder et al., 2016). In this work, the SC method was preferred because it allows for detection of ebullition, which is not possible with wind-based methods. Additionally, the Magellanic region is characterized by high winds that are very changeable in direction and intensity and have frequent gusts up to  $30 \text{ m s}^{-1}$ , making wind-based methods less certain. Nonetheless, we acknowledge that in the windy conditions during sampling, the SC method may have underestimated the CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes.

### 3.5. Greenhouse gas dynamics and comparisons with northern lakes

Overall, the total emissions expressed in CO<sub>2</sub> equivalents (CO<sub>2</sub> eq;  $25 \text{ g-CO}_2\text{-eq g}^{-1} \text{ CH}_4$ ; Shindell et al., 2009) was  $0.52 \text{ kg-CO}_2\text{-eq m}^{-2} \text{ y}^{-1}$  in LH and  $0.28 \text{ kg-CO}_2\text{-eq m}^{-2} \text{ y}^{-1}$  in LL, of which the contributions from CH<sub>4</sub> were 20 and 25% in LH and LL, respectively. This percentage is lower than that previously estimated by Tranvik et al. (2009), who suggested that CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> are equally responsible for greenhouse gas emissions from lakes (in CO<sub>2</sub> eq). However, Bastviken et al. (2011) estimated that about 30% of the total greenhouse gas emissions are from CH<sub>4</sub> (in CO<sub>2</sub> eq). Holgerson and Raymond (2016) suggested that the contribution of CH<sub>4</sub> (in CO<sub>2</sub> eq) in diffusive fluxes depends on the lake area and ranges from 6% to 37% for lakes with areas from 0.1 to 1 km<sup>2</sup> and for lakes of an area inferior to 0.001 km<sup>2</sup>, respectively.

Comparisons of the fluxes observed in the present work with those reported for lakes and reservoirs located in other regions of the world are difficult, mostly because of the unique oceanic climate found in the Magellanic sub-Antarctic region. Indeed, the main climate attribute of the region is the relatively small range of monthly average temperatures, with the difference between the coldest and hottest month of the year being only 10 °C. By comparison, at similar northern latitudes

(53°N), the temperature range is 31 °C in the Edmonton (Canada) region, 27 °C along the coasts of Newfoundland and Labrador, and 19 °C in Central Germany (Met Office Hadley Centre observations datasets, 2017). In the northern hemisphere, the comparatively large range for monthly average temperatures results in long winters when lakes are covered by ice, substantially modifying the lake biogeochemical cycles (Hampton et al., 2017). The short but warm summers also have an influence. According to the Köppen weather classification, the subpolar oceanic climate of the Magellanic region is only comparable to the climatic conditions found in Northern Scotland, Tasmania, and some Alaskan islands (Peel et al., 2007). Greenhouse gas emissions from lakes have not been reported for any of these areas.

Despite the climatic differences, the average CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes measured in the present work (i.e., 0.54 and 16.8 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively) were below or within the lower average range reported for northern lakes (i.e., from 1.6 to 6.9 and from 4.8 to 2900 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively) (Casper et al., 2000; McGinnis et al., 2015; Chu et al., 2015; Encinas-Fernández et al., 2014; Prairie and del Giorgio, 2013; St. Louis et al., 2000; St. Louis et al., 2000; Wang et al., 2013). According to Bastviken et al. (2011), the CH<sub>4</sub> fluxes observed in the present work were lower than the diffusive fluxes reported for lakes between 25 and 54°N, but higher than those observed in lakes located between 54 and 66°N. The fluxes measured in the present work were also in the same range as those reported by Rasilo et al. (2015) (i.e., 0.003 to 20.5, and from -65.92 to 339.42 mmol m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively), who presented an extensive summer survey of 224 lakes located between 46 and 55°N in Québec.

Similarly, when excluding the hypolimnion summer concentrations in LH, the C<sub>CH4</sub> (0.1 to 13.4 μmol L<sup>-1</sup>) was within the range previously reported for northern lakes (2 to 18 μmol L<sup>-1</sup>) (Casper et al., 2000; McGinnis et al., 2015; Encinas-Fernández et al., 2014; Rasilo et al., 2015; Tang et al., 2014). The dissolved CO<sub>2</sub> concentrations, again when excluding the hypolimnion of LH in summer, ranged from 0 to 143 μmol L<sup>-1</sup>, and was also within the range reported for northern lakes (Casper et al., 2000; Halbedel and Koschorreck, 2013; Rasilo et al., 2015).

In contrast, the absence of ebullitive fluxes in the sub-Antarctic lakes is a significant difference from northern lakes. Indeed, despite technical limitations of the existing methods for properly quantifying ebullitive fluxes (DelSontro et al., 2011; Wik et al., 2016), Bastviken et al. (2011) estimated that ebullition is by far the most important emission component of the total flux from northern lakes. The reason why ebullition was not observed in southern lakes is not clear. The major difference between northern and southern latitudes is climatic, with northern latitudes presenting a more contrasted climate. A second difference is in the type of forest ecosystem surrounding the lakes. The Magellanic sub-polar forests are dominated by *Nothofagus* species, which are very different to the boreal forests of *Picea* and *Betula* species found at similar latitudes in northern America and also to the mixed forests of Europe. The climatic and ecosystem differences between the northern and southern hemispheres are large enough to imply that significant differences could be found in the functioning of their respective lakes, although no theory can be currently put forward.

In all seasons and in both lakes, a linear correlation between CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes was found, with coefficients of determination (R<sup>2</sup>) for LH of 0.87, 0.59, and 0.98, in spring, summer, and winter, respectively, and for LL of 0.77 and 0.79 in spring and summer, respectively. Fig. S2 shows, as an example, the correlation observed in LH and LL during summer. Except in LH during spring, which gave a negative correlation (i.e., higher CH<sub>4</sub> fluxes were associated with higher negative CO<sub>2</sub> fluxes), all of the correlations pointed to an increase in CO<sub>2</sub> fluxes when CH<sub>4</sub> fluxes were increasing. The flux ratio of CO<sub>2</sub> to CH<sub>4</sub> was highly variable, ranging from 4 to 720 mmol-CO<sub>2</sub> mmol-CH<sub>4</sub><sup>-1</sup>. The higher ratios were observed in LH during winter, while the lower ratios were observed in LH during spring. The higher winter ratios could be

explained by the temperature sensitivity of methanogens, which are mesophilic archaea with an optimum temperature in the range of 35 to 42 °C (Zeikus and Winfrey, 1976).

The spatiotemporal distributions of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes were quantified using the coefficient of variation (CV), which is the ratio of the standard deviation to the mean. The CV indicates the amount of dispersion around the mean in a set of data values. In LH, the CV of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes were respectively 50.3 and 62.2% in spring, 70.7 and 83.5% in summer, and 102.9 and 101.8% in winter. In LL, the CV of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes were respectively 60.9 and 56.5% in spring and 56.5 and 51.8% in summer. When combining flux data from all seasons in a given lake, the CV values (which represent the spatiotemporal distribution) for CH<sub>4</sub> were 119.2% in LH and 153.7% in LL. Similarly, the spatiotemporal CV values for CO<sub>2</sub> were 174.4% in LH and 98.7% in LL. By comparison, Bastviken et al. (2011) reported an average CV of 150% for CH<sub>4</sub> emissions among lakes located within a given latitude range, and Rasilo et al. (2015) reported a CV of 227% among CH<sub>4</sub> diffusive fluxes in 224 northern lakes. This drastic difference in the CV values indicates that the variation in the fluxes within a given lake is much smaller than the variation between lakes.

To further explore the spatiotemporal variation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes, correlations between the fluxes and lake depth were tested. In our case, no correlation was found in any lake during any campaign. This can be explained by the absence of ebullition in the studied lakes, as Wik et al. (2016), West et al. (2016), Bastviken et al. (2004) and Keller and Stallard (1994) showed an increase in the ebullition probability with decreasing depth, causing higher ebullitive fluxes in the littoral zones of lakes. The absence of correlation between fluxes and depth suggests that the changes in water level at LL had no effect on the CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes.

As mentioned previously, we report here for the first time the CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> cycling in a lake and a reservoir located in the Magellanic region, a unique continental area at latitudes between 45 and 55°S. The area of the region is 461,212 km<sup>2</sup> (IGM, 2008), of which 9.02% is covered by lakes (Verpoorter et al., 2014) or a total lake area of approximately 41,600 km<sup>2</sup>. Assuming that the emissions observed in the present work are representative of the region, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> annual emissions from lakes in the area would equal 0.13 and 11.2 Tg of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively. According to current estimates (Bastviken et al., 2011; Tranvik et al., 2009), these annual emissions would represent only about 0.13% and 0.80% of the worldwide freshwater emissions of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively. Greenhouse gas emissions from the sub-Antarctic Magellanic region are therefore marginal in the global context.

#### 4. Conclusions

The sub-Antarctic Magellanic ecoregion, which is a globally unique continental area between the latitudes 45 and 55°S, has been poorly studied and lakes of this region have not been accounted for in global greenhouse gas emission estimates. This seasonal survey of CH<sub>4</sub> cycling in a lake and a reservoir revealed that these lakes were not significantly different than temperate lakes located at similar northern latitudes. The two sub-Antarctic lakes were net sources of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Their dissolved greenhouse gas concentrations and emissions to the atmosphere were within the medium range previously reported for northern lakes. Specifically, it was observed that the shallower lake was polymictic, probably as a result of the high winds in the region, while the deeper lake was monomictic and subject to extreme stratification during summer. The mixing regime had no clear effect on the diffusive flux, but did have an effect on storage emissions. About one quarter of the total annual greenhouse gas flux was emitted via the storage pathway in the monomictic lake. The sub-Antarctic lakes are not clearly different from their northern analogues, and might be included in the lake database without significant changes to previous global estimates of greenhouse gas emissions from aquatic ecosystems.



## Acknowledgements

We acknowledge the “Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica” (Conicyt, Chile) for the financial support received (MEC-2014-80140028). We also acknowledge the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT, Mexico) for the financial support to F. Thalasso (sabbatical grant #233719) and for the financial support to O. Gerardo-Nieto (grant #277238). The authors are thankful to “Parque del Estrecho de Magallanes” and “Aguas Magallanes S.A.” for their support and to Victoria T. Velázquez-Martínez and Juan Corona-Hernández for their technical assistance.

The following are the supplementary data related to this article. Fig. S1. Site pictures of LH (A) and IL (B).

Fig. S2. Correlations between CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> fluxes observed during summer in LH (A) and IL (B). Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.144>.

## References

- APHA. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bartlett, K.B., Harriss, R.C., 1993. Review and assessments of methane emissions from wetlands. *Chemosphere* 26, 261–320.
- Bartosiewicz, M., Laurion, I., MacIntyre, S., 2015. Greenhouse gas emission and storage in a small shallow lake. *Hydrobiologia* 757 (1), 101–105.
- Bartosiewicz, M., Laurion, I., Clayer, F., Maranger, R., 2016. Heat-wave effects on oxygen, nutrients, and phytoplankton can alter global warming potential of gases emitted from a small shallow lake. *Environ. Sci. Technol.* 50 (12), 6267–6275.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., Tranvik, L.J., 2004. Methane emissions from lakes: dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Glob. Biogeochem. Cycles* 18 (4), 1–12.
- Bastviken, D., Tranvik, L.J., Downing, J.A., Crill, P.M., Enrich-Prast, A., 2011. Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science* 331, 1.
- Borjesson, G., Danielsson, A., Svensson, B.H., 2000. Methane fluxes from a Swedish landfill determined by geostatistical treatment of static chamber measurements. *Environ. Sci. Technol.* 34 (18), 4044–4050.
- Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.P., Peyret, P., Fonty, G., Lehours, A.C., 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res. Microbiol.* 162 (9), 832–847.
- Branco, C.W.C., Kozłowski-Suzuki, B., Sousa-Filho, I.F., Guarino, A.W.S., Rocha, R.J., 2009. Impact of climate on the vertical water column structure of Lajes reservoir (Brazil): a tropical reservoir case. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 14 (3), 175–191.
- Butorovic, N., 2013. Resumen meteorológico año 2012 estación Jorge C. Schythe'. Vol. 41 (1). Anales Instituto Patagonia, Chile, pp. 153–162.
- Cael, B.B., Seekell, D.A., 2016. The Size-Distribution of Earth's Lakes. *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group, pp. 1–5.
- Carlson, R.E., 1977. A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22 (2).
- Casper, P., Maberly, S.C., Hall, G.H., Finlay, B.J., 2000. Fluxes of methane and carbon dioxide from a small productive lake to the atmosphere. *Biogeochemistry* 49 (1), 1–19.
- Chapra, S.C., Taraphak, S.J., 1976. A chlorophyll *a* model and its relationship to phosphorus loading plots for lakes. *Water Resour. Res.* 12 (6), 1260–1264.
- Chu, H., Gottgens, J.F., Chen, J., Ankur, G.S., Desai, R., Ouyang, Z., Shao, C., Czajkowski, K., 2015. Climatic variability, hydrologic anomaly, and methane emission can turn productive freshwater marshes into net carbon sources. *Glob. Chang. Biol.* 21 (3), 1165–1181.
- Clilverd, H., White, D., Lilly, M., 2009. Chemical and physical controls on the oxygen regime of ice-covered Arctic lakes and reservoirs. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 45 (2), 500–511.
- Cole, J.J., Caraco, N.F., 1998. Atmospheric exchange of carbon dioxide in a low-wind oligotrophic lake measured by the addition of SF<sub>6</sub>. *Limnol. Oceanogr.* 43 (4), 647–656.
- Coloso, J.J., Cole, J.J., Pace, M.L., 2010. Short-term variation in thermal stratification complicates estimation of lake metabolism. *Aquat. Sci.* 73 (2), 305–315.
- DelSontro, T., Kunz, M.J., Kempton, T., Wüest, A., Wehrli, B., Senn, D.B., 2011. Spatial heterogeneity of methane ebullition in a large tropical reservoir. *Environ. Sci. Technol.* 45 (23), 9866–9873.
- DelSontro, T., McGinnis, D.F., Wehrli, B., Ostrovsky, I., 2015. Size does matter: importance of large bubbles and small-scale hot spots for methane transport. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1268–1276.
- Dodds, W.K., Jones, J.R., Welch, E.B., 1998. Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Res.* 32 (5), 1455–1462.
- Encinas-Fernández, J., Peeters, F., Hofmann, H., 2014. Importance of the autumn overturn and anoxic conditions in the hypolimnion for the annual methane emissions from a temperate lake. *Environ. Sci. Technol.* 48 (13), 7297–7304.
- Gonzalez-Valencia, R., Magana-Rodriguez, F., Gerardo-Nieto, O., Sepulveda-Jauregui, A., Martinez-Cruz, K., Walter-Anthony, K., Baer, D., Thalasso, F., 2014. In situ measurement of dissolved methane and carbon dioxide in freshwater ecosystems by off-axis integrated cavity output spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 48 (19), 11421–11428.
- Granin, N.G., Mizandrontsev, I.B., Obzhirnov, A.I., Vereshchagina, O.F., Gnatovskii, R.Y., Zhdanov, A.A., 2013. Oxidation of methane in the water column of Lake Baikal. *Dokl. Earth Sci.* 451 (1), 784–786.
- Halbedel, S., Koschorreck, M., 2013. Regulation of CO<sub>2</sub> emissions from temperate streams and reservoirs. *Biogeosciences* 10 (11), 7539–7551.
- Hampton, S.E., Galloway, A.W.E., Powers, S.M., Ozersky, T., Woo, K.H., Batt, R.D., Labou, S.G., O'Reilly, C.M., Sharma, S., Lottig, N.R., Stanley, E.H., North, R.L., Stockwell, J.D., Adrian, R., Weyhenmeyer, G.A., Arvola, L., Baulch, H.M., Bertani, I., Bowman Jr., L.L., Carey, C.C., Catalan, J., Colom-Montero, W., Domine, L.M., Felip, M., Granados, I., Gries, C., Grossart, H.-P., Haberman, J., Haldna, M., Hayden, B., Higgins, S.N., Jolley, J.C., Kahilainen, K.K., Kaup, E., Kehoe, M.J., MacIntyre, S., Mackay, A.W., Mariash, H.L., McKay, R.M., Nixdorf, B., Nöges, P., Nöges, T., Palmer, M., Pierson, D.C., Post, D.M., Pruett, M.J., Rautio, M., Read, J.S., Roberts, S.L., Rucker, J., Sadro, S., Silow, E.A., Smith, D.E., Sterner, R.W., Swann, G.E.A., Timofeyev, M.A., Toro, M., Twiss, M.R., Vogt, R.J., Watson, S.B., Whiteford, E.J., Xenopoulos, M.A., 2017. Ecology under lake ice. *Ecol. Lett.* 20, 98–111.
- Harriss, R.C., Sebach, D.L., 1981. Methane flux in forested freshwater swamps of the southeastern United States. *Geophys. Res. Lett.* 8 (9), 1002–1004.
- Hedin, L.O., Armesto, J.J., Johnson, A.H., 1995. Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests: evaluation of biogeochemical theory. *Bull. Ecol. Soc. Am.* 76 (2), 493–509.
- Holgerson, M.A., Raymond, P.A., 2016. Large contribution to inland water CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> emissions from very small ponds. *Nat. Geosci.* 9, 222–226.
- Instituto Geográfico Militar (IGM), 2008. «VIII Chile: Unidad». Atlas Mundial Santiago: Instituto Geográfico Militar (IGM), p. 120 (ISBN 956-202-068-1).
- Joyce, J., Jewell, P.W., 2003. Physical controls on methane ebullition from reservoirs and lakes. *Environ. Eng. Geosci.* 9 (2), 167–178.
- Kalff, J., 2002. *Limnology: Inland Water Ecosystems*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Keller, M., Stallard, R.F., 1994. Methane emission by bubbling from Gatun Lake, Panama. *J. Geophys. Res.* 99 (D4), 8307–8319.
- Koyama, T., 1963. Gaseous metabolism in lakes sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen. *J. Geophys. Res.* 68 (13), 3971–3973.
- Lambert, W., Sommer, U., 2007. *Limnology*. Second ed. Oxford, New York.
- Lewis, W.M., 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Aquat. Sci.* 40, 1779–1787.
- López Bellido, J., Tulonen, T., Kankaala, P., Ojala, A., 2009. CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes during spring and autumn mixing periods in a boreal lake (Pääjärvi, southern Finland). *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 114 (4), 1–12.
- Martinez-Cruz, K., Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K., Thalasso, F., 2015. Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan lakes. *Biogeosciences* 12 (15), 4595–4606.
- Matthews, C.J.D., St. Louis, V.L., Hesslein, R.S., 2003. Comparison of three techniques used to measure diffusive gas exchange from sheltered aquatic surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 37 (4), 772–780.
- McGinnis, D.F., Kirillin, G., Tang, K.W., Flury, S., Bodmer, P., Engelhardt, C., Casper, P., Grossart, H.P., 2015. Enhancing surface methane fluxes from an oligotrophic lake: exploring the microbubble hypothesis. *Environ. Sci. Technol.* 49 (2), 873–880.
- Met Office Hadley Centre observations datasets, 2017. [www.metoffice.gov.uk/hadobs](http://www.metoffice.gov.uk/hadobs) (accessed 17-02-02).
- Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Brooks, T.M., Pilgrim, J.D., Konstanz, W.R., da Fonseca, G.A.B., Kormos, C., 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (18), 10309–10313.
- Natchimuthu, S., Sundgren, I., Galfalk, M., Klemetsson, L., Crill, P., Danielsson, A., Bastviken, D., 2015. Spatio-temporal variability of lake CH<sub>4</sub> fluxes and its influence on annual whole lake emission estimates. *Limnol. Oceanogr.* 61.
- National Institute of Standards and Technology (NIST), 2016. NIST Chemistry Web Book.
- Nöges, P., Cremona, F., Laas, A., Martma, T., Rööm, E.I., Tõming, K., Viik, M., Vilbaste, S., Nöges, T., 2016. Role of a productive lake in carbon sequestration within a calcareous catchment. *Sci. Total Environ.* 550, 225–230.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1982. *Eutrophication of Waters. Monitoring Assessment and Control. Final Report. OECD Cooperative Programme on Monitoring of Inland Waters (Eutrophication Control)*. Environment Directorate, OECD, Paris (154 pp.).
- Padisák, J., Barbosa, F., Koschel, R., Krienitz, L., 2003. Deep layer cyanoprokaryota maxima in temperate and tropical lakes. *Adv. Limnol.* 58, 175–199.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 1633–1644.
- Prairie, Y., Del Giorgio, P., 2013. A new pathway of freshwater methane emissions and the putative importance of microbubbles. *Inland Waters* 3 (3), 311–320.
- Rasilo, T., Prairie, Y., Del Giorgio, P., 2015. Large-scale patterns in summer diffusive CH<sub>4</sub> fluxes across boreal lakes, and contribution to diffusive C emissions. *Glob. Chang. Biol.* 21, 1124–1139.
- Raymond, P.A., Butman, D., Striegl, R., Mayorga, E., Humborg, C., Kortelainen, P., Dürr, H., Meybeck, M., Ciais, P., Guth, P., 2013. Global carbon dioxide emissions from inland waters. *Nature* 503 (355), 5–10.
- Rozzi, R., Armesto, J.J., Goffinet, B., Buck, W., Massardo, F., Silander, J., Arroyo, M.T.K., Russell, S., Anderson, C.B., Cavieres, L.A., Callcott, J.B., 2008. Changing lenses to assess biodiversity: patterns of species richness in sub-Antarctic plants and implications for global conservation. *Front. Ecol. Environ.* 6 (3), 131–137.
- Rozzi, R., Armesto, J.J., Gutiérrez, J.R., Massardo, F., Likens, G.E., Anderson, C.B., Poole, A., Moses, K.P., Hargrove, E., Mansilla, A.O., Kennedy, J.H., Willson, M., Jax, K., Jones, C.G., Callcott, J.B., Arroyo, M.T.K., 2012. Integrating ecology and environmental ethics: earth stewardship in the southern end of the Americas. *Bioscience* 62 (3), 226–236.
- Saunio, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregon, A., Ciais, P., Canadell, J.G., Dlugokencky, E.J., Etiope, G., Bastviken, D., Houweling, S., Janssens-Maenhout, G., Tubiello, F.N., Castaldi, S., Jackson, R.B., Alexe, M., Arora, V.K., Beerling, D.J., Bergamaschi, P., Blake, D.R., Brailsford, G., Brovkov, V., Bruhwiler, L., Crevoisier, C., Crill, P., Curry, C., Frankenberg, C., Gedney, N., Höglund-Isaksson, L., Ishizawa, M., Ito, A., Jöns, F., Kim, H.S., Kleinen, T., Krummel, P., Lamarque, J.F., Langenfelds, R., Locatelli, R., Machida,

- T, Maksyutov, S., McDonald, K.C., Marshall, J., Melton, J.R., Morino, I., O'Doherty, S., Parmentier, F.J.W., Patra, P.K., Peng, C., Pengl, S., Peters, G.P., Pisoni, I., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Riley, W.J., Saito, M., Schroeder, R., Simpson, I.J., Spahn, R., Steele, P., Takizawa, A., Thornton, B.F., Tian, H., Tohjima, Y., Viovy, N., Voulgarakis, A., van Weele, M., van der Werf, G., Weiss, R., Wiedinmyer, C., Wilton, D.J., Wilshire, A., Worthy, D., Wunch, D.B., Xu, X., Yoshida, Y., Zhang, B., Zhang, Z., Zhu, Q., 2016. The global methane budget: 2000–2012. *Earth Syst. Sci. Data* 8, 697–751.
- Schilder, J., Bastviken, D., Van Hardenbroek, M., Heiri, O., 2016. Spatio-temporal patterns in methane flux and gas transfer velocity at low wind speeds: implications for upscaling studies on small lakes. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 121, 1456–1467.
- Sepulveda-Jauregui, A., Walter Anthony, K.M., Martinez-Cruz, K., Greene, S., Thalasso, F., 2015. Methane and carbon dioxide emissions from 40 lakes along a north–south latitudinal transect in Alaska. *Biogeosciences* 12 (11), 3197–3223.
- Shindell, D.T., Faluvegi, G., Koch, D.M., Schmidt, G.A., Unger, N., Bauer, S.E., 2009. Improved attribution of climate forcing to emissions. *Science* 326, 716–718.
- St. Louis, V.L., Kelly, C.A., Duchemin, E., Rudd, J.W.M., Rosenberg, D.M., 2000. Reservoir surfaces as sources of greenhouse gases to the atmosphere: a global estimate. *Bioscience* 50 (9), 766.
- Striegl, R.G., Michmerhuizen, C.M., 1998. Hydrologic influence on methane and carbon dioxide dynamics at two north-central Minnesota lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43 (7), 1519–1529.
- Tang, K.W., McGinnis, D.F., Frindte, K., Brüchert, V., Grossart, H.P., 2014. Paradox reconsidered methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnol. Oceanogr.* 59 (1), 275–284.
- Tranvik, L.J., Downing, J.A., Cotner, J.B., Loiselle, S.A., Striegl, R.G., Ballatore, T.J., Dillon, P., Findlay, K., Fortino, K., Knoll, L.B., Kortelainen, P.L., Kutser, L., Larsen, S., Laurion, I., Leech, D.M., McCallister, S.L., McKnight, D.M., Melack, J.M., Overholt, E., Porter, J.A., Prairie, Y., Renwick, W.H., Roland, F., Sherman, B.S., Schindler, D.W., Sobek, S., Tremblay, A., Vanni, M.J., Verschoor, A.M., von Wachenfeldt, E., Weyhenmeyer, G.A., 2009. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnol. Oceanogr.* 54 (6 part 2), 2298–2314.
- Vachon, D., Prairie, Y.T., Cole, J.J., 2010. The relationship between near-surface turbulence and gas transfer velocity in freshwater systems and its implications for floating chamber measurements of gas exchange. *Limnol. Oceanogr.* 55 (4), 1723–1732.
- Verpoorter, C., Kutser, T., Seekell, D.A., Tranvik, L.J., 2014. A global inventory of lakes based on high-resolution satellite imagery. *Geophys. Res. Lett.* 41, 6396–6402.
- Walter Anthony, K.M., Vas, D.A., Brosius, L., Chapin III, F.S., Zimov, S.A., Zhuang, Q., 2010. Estimating methane emissions from northern lakes using ice-bubble surveys. *Limnol. Oceanogr. Methods* 8, 592–609.
- Wang, J.M., Murphy, J.G., Geddes, J.A., Winsborough, C.I., Basiliko, N., Thomas, S.C., 2013. Methane fluxes measured by eddy covariance and static chamber techniques at a temperate forest in Central Ontario, Canada. *Biogeosciences* 10 (6), 4371–4382.
- Wanninkhof, R., Knox, M., 1996. Chemical enhancement of CO<sub>2</sub> exchange in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 41 (4), 689–697.
- West, W.E., Creamer, K.P., Jones, S.E., 2016. Productivity and depth regulate lake contributions to atmospheric methane. *Limnol. Oceanogr. Methods* 61.
- White, D.M., Clilverd, H.M., Tidwell, A.C., Little, L., Lilly, M.R., Chambers, M., Reichardt, D., 2008. A tool for modeling the winter oxygen depletion rate in Arctic lakes. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 44 (2), 293–304.
- Wik, M., Thornton, B.F., Bastviken, D., Uhlbäck, J., Crill, P.M., 2016. Biased sampling of methane release from northern lakes: a problem for extrapolation. *Nat. Geosci.* 9, 99–105.
- Willmott, C.J., Matsuura, K., 2006. On the use of dimensioned measures of error to evaluate the performance of spatial interpolators. *Int. J. Geogr. Inf. Sci.* 20 (1), 89–102.
- Zeikus, J.G., Winfrey, M.R., 1976. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (1), 99–107.