

Protocolo para estimar la contribución de los BCEs de Galicia – norte de Portugal al secuestro de CO₂

Entregable: E.2.7

Acción: A.2.3

Interreg



Cofinanciado por
la Unión Europea
Cofinanciado pela
União Europeia

España – Portugal

CAPTA



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Objetivo general	5
1.2. Alcance del protocolo	5
2. PLAN DE MEDICIÓN EN EL CAMPO	6
2.1. Límites del proyecto	7
2.2. Estratificación del área de muestreo	8
2.3. Reservorios de carbono a medir	8
3. MUESTREO DE SUMIDERO DE CARBONO VEGETAL (BIOMASA) EN MARISMA	10
3.1. Consideraciones iniciales	11
3.2. Material necesario	11
3.3. Estimación de biomasa	12
3.4. Determinación relaciones isotópicas	13
3.5. Determinación del carbono	14
4. MUESTREO DE SUMIDERO DE CARBONO VEGETAL (BIOMASA) EN PRADERA MARINA	15
4.1. Consideraciones iniciales	16
4.2. Material necesario	16
4.3. Estimación de biomasa	16
4.4. Determinación del carbono	18
5. MUESTREO DE CARBONO EN SEDIMENTO (MARISMAS Y PRADERAS MARINAS)	19
5.1. Consideraciones iniciales	20
5.2. Material necesario	20
5.3. Estimación de carbono	20
6. REFERENCIAS	25

SIGLAS

BCE	Ecosistemas de Carbono Azul
CIT	Carbono Inorgánico Total
COT	Carbono Orgánico Total
FC	Factor de Compactación
IPCC	Panel Intergubernamental para el Cambio Climático
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
MOG	Materia Orgánica Gruesa
MOT	Materia Orgánica Total

1

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL

El **proyecto CAPTA** tiene como objetivo establecer las bases para el desarrollo de políticas e instrumentos de planificación conjuntas para el Área de Cooperación Galicia-Norte de Portugal para que faciliten alcanzar la neutralidad climática y que permitan fortalecer los servicios ecosistémicos del litoral, mejorando su resiliencia.

El objetivo de este **protocolo** es establecer métodos estandarizados para medir en el campo y analizar las existencias de carbono azul en los Ecosistemas de Carbono Azul (BCEs por sus siglas en inglés) de Galicia y norte de Portugal (marismas y praderas de fanerógamas) (entregable E.2.7 de la acción A.2.3 de CAPTA).

1.2. ALCANCE DEL PROTOCOLO

Este manual está diseñado para ser utilizado por los miembros del equipo de CAPTA encargados de obtener los datos de campo para evaluar las existencias de carbono azul en las zonas de trabajo del proyecto. Aunque está enfocado a cubrir las necesidades establecidas para el proyecto CAPTA, este protocolo puede adaptarse a las necesidades de áreas específicas según la disponibilidad de recursos. Con el fin de obtener estimas que satisfagan los estándares del IPCC para inventarios de carbono de nivel 2 y 3, este protocolo se basa en el manual *“Carbono Azul. Métodos para evaluar las existencias y los factores de emisión de carbono en manglares, marismas y pastos marinos”* de la organización *Conservation International*, la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Howard et al. 2014).

2

PLAN DE MEDICIÓN EN EL CAMPO

2.1. LÍMITES DEL PROYECTO

El primer paso para preparar un plan sólido de medición de carbono en el campo es definir los **límites espaciales** del proyecto, que dependerán del alcance y de los objetivos del mismo. En el **proyecto CAPTA**, las áreas de muestreo serán 3 (**Fig. 1**):

- *Marisma de Betanzos.*
- *Marisma de A Ramallosa.*
- *Estuario del río Lima.*



Fig. 1. Aspecto de las tres zonas húmedas del proyecto CAPTA; Betanzos (A), Lima (B) y A Ramallosa (C).

El objetivo de esta parte del proyecto CAPTA es obtener una estima del carbono azul acumulado en los sumideros principales de estos sistemas húmedos costeros: marisma y praderas marinas. Esto implicará hacer estimas tanto del carbono azul acumulado en la biomasa (aérea y subterránea) y en el sedimento de ambos hábitats.

2.2. ESTRATIFICACIÓN DEL ÁREA DE MUESTREO

La **estratificación** se utiliza para dividir el área del proyecto en áreas secundarias o “estratos” que son relativamente homogéneos en términos ecológicos (ej. composición de especies y geomorfología). Convencionalmente, la estratificación parte de imágenes aéreas de la zona de estudio en las que se definen los principales tipos de vegetación observables. En **CAPTA**, la definición se basará en el estudio de imágenes de satélite a determinar por los miembros del equipo CAPTA encargados del análisis de imágenes. Seguidamente, los tipos de vegetación observables definidos a partir de dichas imágenes se corroborarán con visitas de campo a las zonas de estudio para determinar las especies dominantes en cada tipo de vegetación. Durante las visitas, se realizarán recorridos lineales perpendiculares al canal de marisma o a la orilla para obtener una visión representativa de la variabilidad en cada área de muestreo. Como resultado de todo ello, se tendrá un listado de tipos de vegetación observables—con su composición de especies dominantes—en cada una de las tres áreas de muestreo.

2.3. RESERVORIOS DE CARBONO A MEDIR

Existen directrices para determinar qué sumideros concretos de carbono azul se deben medir en cada sustrato (Howard et al. 2014). En principio, solo es necesario centrarse en los sumideros que previsiblemente tendrán más peso en la estima final de cada área de muestreo. En general, un sumidero **debe medirse**:

- Si representa una porción significativa del carbono total del estrato (>5 %).
- Si hay altas posibilidades de que cambie o haya cambiado significativamente de manera natural o por impactos antrópicos.
- Si es un sumidero desconocido.

En general, un sumidero de carbono **podrá excluirse** o ser muestreado con menos frecuencia:

- Si es pequeño.
- Si hay bajas posibilidades de ser afectado por un cambio.

La contabilidad de carbono a nivel internacional requiere de cuatro mediciones básicas de sumideros de carbono: biomasa aérea viva, biomasa aérea muerta, biomasa subterránea viva y carbono del sedimento. El **proyecto CAPTA** se centra en dos ecosistemas clave: marismas y praderas marinas. El secuestro de carbono azul en ambos hábitats se ha analizado con frecuencia en muchos estudios, de manera que existe un buen conocimiento previo de qué sumideros concretos son importantes y cuáles pueden obviarse en una evaluación. De este conocimiento previo se deduce que, tanto en marismas como en praderas marinas, los principales sumideros de carbono que se deben medir son:

- Biomasa aérea viva.

- Biomasa subterránea viva.
- Sedimento.

De los tres, los componentes subterráneos (biomasa subterránea viva y carbono del sedimento en marismas y carbono del sedimento en praderas marinas) suelen ser los sumideros que almacenan la mayor parte del carbono azul. Con frecuencia, estos dos sumideros son difíciles de separar, por lo que muchas veces se consideran como un único sumidero de carbono. La biomasa aérea muerta suele excluirse de las estimas de carbono azul tanto de las marismas como de las praderas marinas, ya que periódicamente es arrastrada por las mareas o se descompone rápidamente.

3

MUESTREO DE SUMIDEROS DE CARBONO VEGETAL (BIOMASA) EN MARISMA

3.1. CONSIDERACIONES INICIALES

Siguiendo el *Plan de Medición en Campo* descrito en el Capítulo 2, para el **proyecto CAPTA** habrá que tener en cuenta que:

- Los sumideros de carbono a medir en las marismas serán la biomasa aérea viva, la biomasa subterránea viva y el carbono del sedimento. Este capítulo 3 se centra solo en biomasa.
- Las estimas de biomasa y carbono en marismas se realizarán entre mediados y finales de verano, cuando la biomasa esté en su punto máximo, durante la marea baja.
- Previamente al trabajo de campo, se definirán los tipos de vegetación observables dentro de cada marisma basándose en imágenes de Google Earth y en el conocimiento previo de las marismas seleccionadas.

3.2. MATERIAL NECESARIO

Trabajo de campo:

- Foto aérea de la zona.
- Cámara fotográfica o teléfono con cámara.
- Rotulador permanente.
- Piquetas.
- Nucleador metálico (8 cm diam. y 50 cm long.) con mango.
- Brújula.
- Cuadrado de muestreo (0.3 x 0.3 m).
- Tijeras de podar (manuales o eléctricas).
- GPS de alta resolución.
- Bolsas plásticas grandes.
- Pala y cuerda (para liberar el nucleador).
- Etiquetas para la recogida de muestras.

Trabajo de laboratorio

- Agua destilada.
- Bolsas de papel y crisoles (para secar biomasa en estufa).
- Espátula plástica.
- Balanza de precisión.
- Etanol.
- Tubos Eppendorf (para enviar submuestras a servicio de análisis).
- Estufa de tiro forzado.
- Molino de café.
- Tijeras.
- Tamiz 1 mm.
- Tubos de plástico 5-10 ml (para guardar material molido).
- (Opcional) molino de bolas (tipo TissueLyser LT o equivalente).

3.3. ESTIMACIÓN DE BIOMASA

Muestreo de campo

El muestreo de campo está diseñado para proporcionar los datos de biomasa *in situ* necesarios para calibrar un modelo de estima de biomasa a partir de imágenes de alta resolución de la biomasa de los BCEs estudiados en CAPTA recogidas con un dron equipado con cámara multispectral y posicionamiento de precisión (acción A.2.2.). El muestreo de campo se hará **inmediatamente después** de que el dron haya completado el registro de las imágenes aéreas del BCE e incluye los siguientes pasos:

1. Seleccionar en total 25 cuadrados (cuadrados de muestreo de 0.3 x 0.3 m) de cada tipo de vegetación para recogida de biomasa aérea. Estos cuadrados deben estar ocupados solo por la especie objetivo y distribuidos de manera que cubran la mayor heterogeneidad aparente de densidades de dicha especie.
2. Usar la brújula para orientar uno de los lados de cada cuadrado Norte-Sur.
3. Fotografiar y georreferenciar cada uno de los cuadrados anotando el código de la muestra.
4. Medir la altura de la planta más alta de cada uno de los cuadrados. Esta información servirá para estimar el volumen de las plantas a partir del modelo digital de elevación que posteriormente se extraerá de las imágenes del dron.
5. Recoger la **biomasa aérea** cosechando la parte aérea de toda la vegetación presente dentro de cada cuadrado con la ayuda de las tijeras de podar. En el caso de plantas de porte alto, tener cuidado en cortar solo la biomasa que contenida dentro de los límites del cuadrado de muestreo. Utilizar tijeras de podar eléctricas puede facilitar este trabajo en algunas plantas (ej. plantas de porte arbustivo que forman una masa continua como *Halimione portulacoides*).
6. Almacenar la biomasa en una bolsa de plástico etiquetada con el código de la muestra.
7. **En 5 de los 25 cuadrados**, una vez retirada la biomasa aérea y eliminado cualquier resto orgánico muerto de la superficie del sustrato del cuadrado, insertar el nucleador metálico de 8 cm diámetro para obtener una muestra de **biomasa subterránea**. Durante la inserción, mantener una velocidad de descenso baja para minimizar la compactación del núcleo.
8. Una vez alcanzada la profundidad deseada, girar el nucleador para cortar cualquier resto de raíces.
9. Extraer el nucleador. Durante la extracción puede ayudar girar el nucleador. Caso de ser difícil la extracción, ayudarse fijando una cuerda o una llave de cadena alrededor de la parte superior del nucleador o excavar con una pala el sedimento alrededor del nucleador para liberarlo.
10. Vaciar el contenido de los últimos 30 cm del nucleador en una bolsa plástica debidamente etiquetada.

11. Repetir los pasos 7-10 para recoger una segunda muestra de biomasa subterránea en cada uno de los 5 cuadrados.
12. Almacenar el contenido de los 2 núcleos recogidos de cada cuadrado en una única bolsa plástica para tratarlos posteriormente como una única muestra de biomasa subterránea.
13. Completado el muestreo, todas las muestras se transportan al laboratorio donde se almacenará abiertas en un sitio seco y protegido de la luz solar directa hasta su procesado.

Procedimiento de laboratorio

Muestras de **biomasa aérea**:

1. **Aviso: Antes de proceder con los siguientes pasos**, es necesario recoger muestras para la estima de las relaciones isotópicas de C y N en el material vegetal fresco de **10 de las 25 muestras** de biomasa aérea de cada tipo de vegetación siguiendo lo que se detalla en el apartado 3.4 abajo.
2. En todas las muestras, dividir cada muestra en varias submuestras para facilitar su lavado y secado.
3. Lavar las muestras de **biomasa aérea** con agua del grifo.
4. Dependiendo del volumen del material lavado, colocarlo en un crisol (poco volumen) o en bolsas de papel (gran volumen) previamente taradas y secar a 60 °C hasta peso constante.
5. Pesar y estimar el peso seco en kg/m² sumando la biomasa de todas las submuestras y dividiéndola por el área del cuadrado de muestreo (0.09 m²).

Muestras de **biomasa subterránea**:

1. Dividir la biomasa recogida con el nucleador en segmentos para facilitar su lavado.
2. Lavar las muestras sobre un tamiz de 1 mm y separar visualmente los fragmentos orgánicos (raíces, rizomas, detritos).
3. Dependiendo del volumen del material lavado, colocarlo en un crisol (poco volumen) o en bolsas de papel (gran volumen) previamente taradas y secar a 60 °C hasta peso constante.
4. Pesar y estimar el peso seco en kg/m² sumando la biomasa de todos los segmentos y dividiéndola por el área de la sección del nucleador multiplicada por dos (0.01 m²).

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS RELACIONES ISOTÓPICAS DE CARBONO Y NITRÓGENO EN LAS PLANTAS DE MARISMA

Las relaciones isotópicas de C y N en la biomasa fresca de las plantas de marisma pueden servir para identificar posteriormente las fuentes del C acumulado en el sedimento de la marisma. En CAPTA, dichas relaciones isotópicas se estimarán utilizando (i) **10 de las 25 muestras de biomasa aérea** y (ii) **las 5 muestras de biomasa subterránea recogidas para cada tipo de vegetación** (apartado 3.4 arriba) mediante el siguiente protocolo:

1. En cada una de esas **muestras de biomasa aérea**, seleccionar las partes verdes apicales (~5 cm apicales) de 15 plantas diferentes descartando tejido epifitado o dañado.
2. En cada una de las muestras de **biomasa subterránea**, seleccionar 15 fragmentos representativos de raíces/rizomas (~5 cm) desechando raíces sueltas y material muerto.
3. Lavar todo el material con agua destilada.
4. Secar a 60 °C hasta peso constante (aprox. 96h).
5. Introducir las muestras en un molinillo de café y homogeneizar cada una hasta obtener un polvo con partículas de tamaño uniforme. **Importante:** Limpiar la cubeta del molino con etanol entre muestras para minimizar la contaminación cruzada.
6. Pasar la muestra triturada a un tubo de 2 ml con una bola de acero en su interior y homogeneizar otros 15 minutos en un molino de bolas (ej. TissueLyser LT o equivalente) para conseguir un polvo más fino y una mezcla más homogénea¹. En el caso de que no se haya homogeneizado de manera uniforme, remover la muestra para evitar la compactación del fondo y repetir el proceso otros 15 minutos.
7. Almacenar las muestras molidas en viales debidamente etiquetados que se mantendrán en un recipiente hermético o en una bolsa zip con gel de sílice a temperatura ambiente para garantizar que se mantengan totalmente deshidratadas hasta su envío al servicio de análisis externo.

3.5. DETERMINACIÓN DEL CARBONO

Tanto para la biomasa aérea como para la subterránea:

¹ De no disponer de un molino de bolas, esta molienda adicional puede encargarse al servicio de análisis que va a encapsular las muestras para estimar los isótopos de C y N.

1. Mezclar bien toda la muestra de biomasa seca. Si el material son fragmentos grandes, cortar en fragmentos más pequeños con tijeras para facilitar una mezcla homogénea de las diferentes partes de las plantas (tallos de diferente grosor, hojas, raíces y rizomas de diferente grosor).
2. Tomar 3 submuestras, cada una de un tamaño suficiente como para llenar la cubeta del molinillo de café, y picarlas con tijeras en fragmentos todavía más pequeños de aproximadamente 1-2 cm.
3. Introducir secuencialmente cada una de las 3 submuestras en un molinillo de café y homogeneizar cada una hasta obtener un polvo con partículas de tamaño uniforme. **Importante:** Una vez procesadas las 3 submuestras, limpiar el molino con etanol antes de procesar el siguiente grupo de 3 submuestras para minimizar la contaminación cruzada.
4. Pasar la muestra triturada a un tubo de 2 ml con una bola de acero en su interior y homogenizar otros 15 minutos en un molino de bolas (ej. TissueLyser LT o equivalente) para conseguir un polvo más fino y una mezcla más homogénea¹. En el caso de que no se haya homogeneizado de manera uniforme, remover la muestra para evitar la compactación del fondo y repetir el proceso otros 15 minutos.
5. Almacenar las muestras molidas en viales debidamente etiquetados que se mantendrán en un recipiente hermético o en una bolsa zip con gel de sílice a temperatura ambiente para garantizar que se mantengan totalmente deshidratadas hasta su envío al servicio de análisis externo.
6. Enviar una alícuota del material molido a servicio de análisis externo para la estima del contenido total de C.
7. Utilizar las estimas de contenido de C para convertir las estimas de kg de peso seco por m² en estimas de kg de C por m².

4

MUESTREO DE SUMIDERO DE CARBONO VEGETAL (BIOMASA) EN PRADERA MARINA

4.1. CONSIDERACIONES INICIALES

Siguiendo el *Plan de Medición en Campo* descrito en el Capítulo 2, para el proyecto CAPTA habrá que tener en cuenta que:

- Los sumideros de carbono a medir en las praderas marinas serán la biomasa aérea viva, la biomasa subterránea viva y el carbono del sedimento. Este capítulo 4 se centra solo en biomasa.
- Las estimas de biomasa y carbono en praderas marinas se realizarán durante la marea baja entre mediados y finales de verano, cuando la biomasa esté en su punto máximo.

4.2. MATERIAL NECESARIO

Trabajo de campo:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| - Foto aérea de la zona. | - GPS de alta resolución |
| - Cuadrado de muestreo (0.3 x 0.3 m). | - Tijeras pequeñas. |
| - Cámara fotográfica o teléfono con cámara. | - Piquetas. |
| - Rotulador permanente. | - Brújula. |
| - Bolsas plásticas grandes. | - Pala (para liberar el nucleador). |
| - Nucleador metálico (8 cm diam. y 50 cm long.) con mango. | |

Trabajo de laboratorio

- | | |
|--|---|
| - Agua destilada. | - Estufa de tiro forzado. |
| - Crisoles (para secar biomasa). | - Balanza de precisión. |
| - Molino de café. | - Etanol. |
| - Tamiz 1 mm. | - Tijeras. |
| - Tubos Eppendorf (para enviar submuestras a servicio de análisis. | - Tubos de plástico 5-10 mL (para guardar material molido). |
| - (Opcional) molino de bolas (tipo TissueLyser LT o equivalente). | - |

4.3. ESTIMACIÓN DE BIOMASA

Muestreo de campo

El muestreo de campo incluye los siguientes pasos:

1. Seleccionar en total 25 cuadrados (cuadrados de muestreo de 0.3 x 0.3 m) dentro de la pradera distribuidos de manera que cubran la mayor heterogeneidad aparente de densidades de la planta.

2. Usar la brújula para orientar uno de los lados de cada cuadrado Norte-Sur.
3. Fotografiar y georreferenciar cada uno de los cuadrados anotando el código de la muestra.
4. Recoger la **biomasa aérea** cosechando la parte aérea de toda la vegetación presente dentro de cada cuadrado con la ayuda de tijeras.
5. Almacenar la biomasa en una bolsa de plástico etiquetada con el código de la muestra.
6. **En 5 de los 25 cuadrados**, una vez retirada la biomasa aérea y eliminado cualquier resto orgánico muerto de la superficie del sustrato del cuadrado, insertar el nucleador metálico para obtener una muestra de **biomasa subterránea**.
7. Una vez alcanzada la profundidad deseada, girar el nucleador para cortar cualquier resto de raíces.
8. Extraer el nucleador y vaciar el contenido de los últimos 30 cm en una bolsa de plástica debidamente etiquetada.
9. Completado el muestreo, todas las muestras se transportan al laboratorio donde se almacenará abiertas en un sitio seco y protegido de la luz solar directa hasta su procesado.

Procedimiento de laboratorio

1. En el caso de la **biomasa subterránea**, poner el núcleo de sedimento recogido con el nucleador en un tamiz y eliminar la mayor cantidad de sedimento posible bajo el grifo. En el caso de las muestras de **biomasa aérea**, pasar directamente al paso 2.
2. Lavar las muestras de **biomasa** con agua destilada.
3. Pasar la biomasa a un crisol previamente tarado y secar a 60 °C hasta peso constante.
4. Pesar y estimar el peso seco de cada componente en kg/m².

4.3. DETERMINACIÓN DEL CARBONO

Tanto para la **biomasa aérea** como para la **subterránea**:

1. Mezclar bien toda la muestra de biomasa seca y fragmentarla en fragmentos pequeños de aproximadamente 1-2 cm.
2. Introducir el material en un molinillo de café y homogeneizar hasta obtener un polvo con partículas de tamaño uniforme. **Importante:** Limpiar el molino con etanol entre muestras para minimizar la contaminación cruzada.
3. Pasar la muestra triturada a un tubo de 2 ml con una bola de acero en su interior y homogeneizar otros 15 minutos en un molino de bolas (ej. TissueLyser LT o equivalente) para conseguir un polvo más fino y una mezcla más homogénea¹. En el caso de que no se haya homogeneizado de manera uniforme, remover la muestra para evitar la compactación del fondo y repetir el proceso otros 15 minutos.
4. Almacenar las muestras molidas en viales debidamente etiquetados que se mantendrán en un recipiente hermético o en una bolsa zip con gel de sílice a temperatura ambiente para garantizar que se mantengan totalmente deshidratadas hasta su envío al servicio de análisis externo.
5. Enviar una alícuota del material molido a servicio de análisis externo para estima del contenido total de C².
6. A mayores, enviar una submuestra de cada *parcela* a servicio de análisis externo para estimar las relaciones isotópicas de C y N.

² El C inorgánico puede ser una fracción apreciable del C total presente en praderas marinas, pero **NO SE INCLUYE EN LAS ESTIMAS DE CARBONO AZUL**. Por tanto, puede ser recomendable corregir las estimas de contenido de C de la biomasa de praderas marinas descontando el C inorgánico. Esto puede hacerse o (i) pidiendo al servicio de análisis que haga la corrección o (ii) estimando nosotros el contenido de C inorgánico aplicando el método de la acidificación a una submuestra de biomasa seca y molida. La acidificación implica:

1. Pesar con precisión de mg una submuestra de biomasa de alrededor de 1 g.
2. Tarar un tubo de centrifuga de 50 ml y añadirle la muestra junto con HCl 1N hasta cubrir bien la muestra.
3. Agitar 15 min.
4. Dejar reposar 18-24 hr.
5. Añadir más HCl 1N y comprobar si hay burbujeo.
6. Si hay burbujeo: repetir los pasos 3 y 4.
7. Si no hay burbujeo: centrifugar y decantar con cuidado el sobrenadante.
8. Añadir agua destilada, revolver y volver a centrifugar-decantar.
9. Repetir el paso 8 una vez.
10. Secar a 60 °C una noche.
11. Pesar y estimar el peso de la muestra restando la tara del tubo.
12. Calcular la diferencia entre la masa de la muestra antes y después de la acidificación.
13. Multiplicar la diferencia por 0.12 y dividir por el peso de la muestra antes de acidificar para estimar el contenido de C inorgánico en %.
14. Restar el contenido de C inorgánico al contenido de C total proporcionado por el servicio de análisis.

7. Utilizar las estimas de contenido de C para convertir las estimas de kg de peso seco por m² en estimas de kg de C por m².

5

MUESTREO DE CARBONO EN SEDIMENTO (MARISMAS Y PRADERAS MARINAS)

5.1. CONSIDERACIONES INICIALES

El *Plan de Medición en Campo* descrito en el Capítulo 2 incluye la estima del carbono del sedimento. Para estimar el carbono del sedimento se propone **recoger tres núcleos adicionales a los descritos arriba (secciones 3 y 4) de cada tipo de vegetación (marismas) y de cada pradera (praderas marinas)**. Estos núcleos se procesarán según lo explicado en este capítulo 5 para estimar el contenido de carbono del sedimento.

5.2. MATERIAL NECESARIO

Trabajo de campo:

- Foto aérea de la zona.
- Cámara fotográfica.
- Tijeras de podar.
- Maza y taco de madera para proteger el nucleador mientras se clava.
- Cinta adhesiva impermeable.
- GPS
- Cinta métrica 2 m (para medir compactación del núcleo)
- Nucleador PVC (5 cm diam. exterior, 4.5 cm diam. interior, 1.40 m long.) con borde afilado.
- Pala (para liberar el nucleador).
- Cuerda (para liberar el nucleador).
- Goma-espuma o estopa y varilla de madera o PVC de < 1m de long. (para transportar nucleador en horizontal).
- (Opcional) tapones para nucleador.

Trabajo de laboratorio

- Placas de Petri de plástico
- Crisoles.
- Espátula plástica.
- Balanza de precisión.
- Horno mufla.
- Tubos Eppendorf (para enviar submuestras a servicio de análisis).
- Centrífuga.
- Agua destilada.
- Estufa de tiro forzado.
- Herramienta eléctrica (ej. Dremel 3000) con un disco de corte para plástico.
- Tamiz 2 mm.
- HCl 1N.
- Tubos de plástico 5-10 ml (para guardar el sedimento tamizado y seco).
- Tubos de centrífuga de 50 ml.
- Desecador.

5.3. ESTIMACIÓN DE CARBONO

Muestreo de campo

1. Seleccionar los tres lugares dentro de cada tipo de vegetación/pradera donde se van a tomar la muestras y georreferenciarlos.
2. Eliminar la biomasa aérea de una superficie de aproximadamente 20 x 20 cm.

3. Insertar un nucleador de PVC. Mantener una velocidad de descenso baja martillando ligeramente para minimizar la compactación del núcleo. Intentar alcanzar la máxima profundidad posible³.
4. Girar el nucleador periódicamente para cortar cualquier resto de raíces.
5. Anotar la distancia desde la parte superior del nucleador hasta la superficie del sedimento tanto por la cara externa del nucleador (**Dist_ext**) como por la cara interna (**Dist_int**) para estimar la compactación provocada por el nucleador. Si la compactación es excesiva, desechar la muestra y tomar una nueva⁴.
6. Introducir un trozo de goma-espuma o estopa por la parte superior y empujarla con la varilla hasta la superficie del sedimento.
7. Cerrar y sellar la parte superior para que haga vacío usando un tapón y cinta adhesiva impermeable.
8. Extraer el nucleador. Durante la extracción puede ayudar girar el nucleador. Si la extracción es difícil, ayudarse fijando una cuerda alrededor de la parte superior del nucleador o excavando con una pala el sedimento alrededor del nucleador para liberarlo.
9. Tapar y sellar el fondo del nucleador con cinta adhesiva.
10. Almacenar refrigerado.

Procedimiento de laboratorio

1. Situar el nucleador con la muestra horizontalmente y asegurarlo con unas sargentas.
2. Cortar longitudinalmente la cubierta de plástico del nucleador a lo largo de caras opuestas controlando la profundidad de corte y la dirección para evitar que queden partículas de plástico en la muestra⁵. Si se utiliza una herramienta eléctrica con un disco de corte, es muy importante tener presente que el disco de corte libera una gran cantidad de PVC en la dirección contraria a su sentido de rotación. El corte debe hacerse de tal modo que el sentido de rotación del disco lance las partículas de PVC hacia la zona de la pared del nucleador que todavía no se ha cortado, evitando así que los residuos no se cuelen por la ranura ya cortada contaminando la muestra.

³ Las estimas de carbono azul se hacen siempre con referencia al carbono acumulado hasta al menos 1 m de profundidad. De no poder penetrar 1 m, será necesario estimar el contenido de carbono de ese espesor mediante extrapolación.

⁴ Incluso con las mejores técnicas, son habituales compactaciones de hasta un 30% (Howard et al. 2014). Sin embargo, factores de compactación mucho mayores pueden indicar que el nucleador se atasó durante la penetración provocando un “efecto clavo” y, por tanto, la muestra no es representativa.

⁵ Puede usarse una herramienta eléctrica tipo Dremel (ej. Dremel 3000) con un disco de corte para plástico. [DREMEL® 3000 Herramientas con cable | Dremel](#)

3. Levantar la mitad superior de la pared del nucleador poniendo cuidado en que no se lleve adherido sedimento, dejando todo el núcleo de sedimento depositado sobre la mitad inferior del nucleador.
4. Medir la longitud total de núcleo para estimar la compactación de la muestra en el momento de su procesado en el laboratorio⁶.
5. Dividir el núcleo en segmentos. Uno de los tres núcleos de cada tipo de vegetación en segmentos de 1 cm de potencia y los otros dos núcleos en segmentos de 5 cm de potencia.
6. Trasladar el sedimento de cada segmento a una placa de Petri de plástico previamente tarada.
7. Secar a 60 °C hasta peso constante (aprox. 24-48h, disgregar la muestra puede ayudar al secado y el tamizado).
8. Enfriar en un desecador.
9. Pesar y registrar el peso del sedimento descontando el peso de la placa de Petri.
10. Disgregar la muestra seca y tamizarla con un tamiz de 2 mm.
11. Separar y pesar por separado: (i) los fragmentos orgánicos que no pasan por el tamiz (Materia Orgánica Gruesa, MOG) y (ii) el material inorgánico que no pasa el tamiz (conchas, gravas).
12. Poner en el crisol previamente tarado aproximadamente 3 g del sedimento tamizado y pesar el conjunto con precisión de mg.
13. Introducir el crisol en un horno mufla y dejar 5 hr a 450 °C.
14. Enfriar en un desecador.
15. Pesar y registrar el peso del sedimento descontando el peso del crisol.
16. Calcular la diferencia de peso del sedimento antes y después de introducirlo en el horno mufla.
17. Calcular la Materia Orgánica Total (**MOT**, en %) dividiendo la diferencia por el peso del sedimento antes de introducirlo en el horno mufla.
18. En 10-12 segmentos por núcleo, tomar 1 g del sedimento tamizado y ponerlo en un tubo de centrífuga de 50 ml previamente tarado.
19. Pesar el conjunto con precisión de mg.

⁶ Dependiendo del tiempo que haya estado almacenado el nucleador con la muestra hasta su procesado, el núcleo de sedimento puede haberse encogido al perder humedad. Es necesario calcular el Factor de Compactación utilizando la longitud del núcleo de sedimento en el momento de procesado para que las estimas de densidad aparente del sedimento sean correctas.

20. Añadir HCl 1N hasta cubrir bien el sedimento.
21. Agitar 15 min.
22. Dejar reposar 18-24 hr.
23. Añadir más HCl 1N y comprobar si hay burbujeo.
24. Si hay burbujeo: repetir los pasos 21 a 23.
25. Si no hay burbujeo, centrifugar y decantar con cuidado el sobrenadante.
26. Añadir agua destilada, revolver y volver a centrifugar-decantar.
27. Repetir el paso 26 una vez.
28. Transferir el contenido del tubo de centrífuga a un portafiltros para matraces de kitasato equipado con un filtro de celulosa de 0.45 μm previamente tarado y numerado (con lápiz). Para garantizar la transferencia completa del sedimento, enjuagar el tubo con agua destilada y verter el enjuague sobre el filtro. Asegurarse de que no quedan restos de sedimento adheridos a las paredes del portafiltros lavando las mismas con agua destilada de ser necesario. **Importante:** los filtros deben acondicionarse antes de usarlos, dejándolos en estufa a 60 °C durante 24 horas.
29. Secar en estufa de tiro forzado a 60 °C una noche. Pesar y estimar el peso de la muestra restando la tara del filtro.
30. Calcular la diferencia entre la masa de la muestra antes y después de la acidificación.
31. Estimar el contenido de Carbono Inorgánico Total (CIT, en %) dividiendo la diferencia por el peso de la muestra antes de acidificar y multiplicando el resultado por 0.12.
32. De las mismas 10-12 muestras utilizadas para estimar CIT, enviar una submuestra del sedimento **sin digerir** a servicio externo de análisis para medir el contenido de C y N, así como las relaciones isotópicas de C y N⁷.

Procedimientos numéricos

Cálculo del Factor de Compresión del núcleo de sedimento

Siguiendo a Howard et al. (2014), asumiremos un factor de compresión lineal a lo largo de todo el núcleo. Por tanto:

1. Calcular la *profundidad de penetración* que alcanzó el nucleador restando el valor de Dist_ext (ver paso 5 en “Procedimiento de campo” arriba) a la longitud total del nucleador.

⁷ Los isótopos se estiman en muestras no acidificadas para evitar que la acidificación altere las relaciones isotópicas (Schlacher and Connolly 2014).

2. Calcular el Factor de Compresión (**FC**) dividiendo la longitud del núcleo por la profundidad de penetración calculada en el paso 1.

Estima del contenido de carbono orgánico total (COT) a partir de los valores de MOT en los segmentos en los que no se analizó COT⁸

1. Para cada núcleo de sedimento, usar los datos de las 10-12 en las que se estimó CIT y el contenido total de C (pasos 31 y 32 de "Procedimiento de laboratorio") para estimar el **COT** restando el valor de CIT al contenido total de C estimado por el servicio externo de análisis.
2. Ajustar una regresión lineal entre los valores de **COT** (paso 32 de "Procedimiento de laboratorio") y los valores de **MOT** (paso 17 de "Procedimiento de laboratorio") medidos en los 10-12 segmentos seleccionados para las estimas de COT.
3. Usar la regresión del paso anterior para **estimar** el **COT** en el resto de segmentos a partir de sus valores de **MOT**.

Estima del stock de carbono orgánico total (COT) por unidad de superficie

IPCC fija como **objetivo estimar el COT acumulado en el sedimento hasta una profundidad de 1 m** en forma de masa de COT por unidad de superficie (g/cm^2). Para estimarlo:

1. Calcular el volumen original de sedimento de cada segmento del núcleo multiplicando el área interna de la sección del nucleador por la potencia del segmento corregida por el **FC** estimado en el paso 2 de "Cálculo del Factor de Compresión del núcleo de sedimento".
2. Calcular la densidad aparente de sedimento en cada segmento (g/cm^3) dividiendo el peso seco de la muestra del segmento (paso 9 en "Procedimiento de laboratorio") por el volumen de sedimento (paso 1 anterior).
3. Calcular la densidad de COT por unidad de volumen de sedimento (g/cm^3) de cada segmento multiplicando la densidad aparente (paso 2) por la estima de COT (en %) del mismo y dividiendo el resultado por 100.
4. Calcular el stock de COT del segmento por unidad de superficie ($\text{g C}/\text{cm}^2$) multiplicando la densidad de COT del paso anterior por la potencia (cm) del segmento corregida por el **FC**.
5. Repetir los pasos 1 a 4 para todos los segmentos.
6. Registrar la profundidad total real (i.e. corregida por el **FC**) de todo el núcleo.
7. **Si la profundidad total real del núcleo es ≥ 1 m**, sumar el stock de carbono (en $\text{g C}/\text{cm}^2$) de todos los segmentos hasta alcanzar la profundidad objetivo de 1 m.
8. **Si la profundidad total real del núcleo es < 1 m**, estimar el stock de carbono (en $\text{g C}/\text{cm}^2$) correspondiente a una profundidad de 1 m con el método de extrapolación del **Anexo 1**.

⁸ Para más detalles sobre el ajuste por regresión, ver el [Anexo 4](#) a este protocolo.

8. REFERENCIAS

- Cunha, J., E. Cabecinha, S. Villasante, J. A. Gonçalves, S. Balbi, M. Elliott, and S. Ramos. 2024. Quantifying the role of saltmarsh as a vulnerable carbon sink: A case study from Northern Portugal. *Science of the Total Environment* 923:171443.
- Howard, J., S. Hoyt, K. Isensee, E. Pidgeon, and M. Telszewski, editors. 2014. *Carbono Azul: Métodos para evaluar las existencias y los factores de emisión de carbono en manglares, marismas y pastos marinos*. Conservation International, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, International Union for Conservation of Nature, Arlington, Virginia, USA.
- Macreadie, P. I., Q. R. Ollivier, J. J. Kelleway, O. Serrano, P. E. Carnell, C. J. Ewers Lewis, T. B. Atwood, J. Sanderman, J. Baldock, R. M. Connolly, C. M. Duarte, P. S. Lavery, A. Steven, and C. E. Lovelock. 2017. Carbon sequestration by Australian tidal marshes. *Scientific Reports* 7:44071.
- Schlacher, T. A., and R. M. Connolly. 2014. Effects of acid treatment on carbon and nitrogen stable isotope ratios in ecological samples: a review and synthesis. *Methods in Ecology and Evolution* 5:541-550.

Extrapolación de stock de C en sedimento hasta 1 metro de profundidad y cálculo de valores medios para cada tipo de hábitat

Documento: E.2.7 (Anexo 1)

Acción: A.2.3

Interreg



Cofinanciado por
la Unión Europea
Cofinanciado pela
União Europeia

España – Portugal

CAPTA

Cuando un núcleo de sedimento no alcanzó una profundidad total real de 1 metro, es necesario estimar la densidad de Carbono Orgánico Total (COT) por unidad de superficie (g C/cm^2) extrapolando las medidas obtenidas hasta dicha profundidad. Para ello, se propone aplicar un modelo lineal que relacione la profundidad con la densidad de COT acumulada hasta dicha profundidad. Se emplean los valores acumulados con la profundidad porque muestran una relación más lineal y fácil de modelar (Fig. 1).

Para ello:

1. **Recopilar** los datos de stock de COT (g/m^2) y de potencial real (i.e. corregida por el FC) de todos los segmentos del núcleo (ver “Procedimientos numéricos” en la sección 5 del protocolo).
2. Con los datos del paso 1 ordenados desde el segmento más superficial hasta el más profundo, **calcular los valores acumulados de ambas variables** sumando para cada segmento los valores del mismo y los valores de todos los segmentos que están por encima de este.
3. **Estimar la relación** entre profundidad stock de COT acumulado hasta esa profundidad utilizando un paquete estadístico. A partir de la relación, **estimar el stock de COT acumulado hasta una profundidad de 100 cm y el error** de esa estima. El Material Suplementario de este Anexo incluye un *script* para ajustar un modelo lineal y estimar el valor predicho para 100 cm de profundidad con R.
4. Repetir los pasos 1-3 para cada uno de los núcleos de un mismo tipo de hábitat.
5. Con la estima (y su error estándar) del stock de C hasta 100 cm de cada uno de los núcleos de un mismo tipo de hábitat, **estimar el valor medio de stock de C por unidad de superficie de ese tipo de hábitat con su correspondiente intervalo de confianza**. Para ello, utilizar los cálculos de propagación de incertidumbre para tener en cuenta el error estándar de la estima de cada núcleo.

El Material Suplementario de este Anexo y la hoja de Excel adjunta contiene un ejemplo detallado de los pasos a llevar a cabo en este método.

Para facilitar los cálculos, se adjunta un **script de RStudio** y una **hoja de Excel** con los comandos detallados. Realizar el cálculo en Rstudio y completar la hoja Excel con los valores obtenidos. (En caso de que el modelo no se ajuste a los datos, se recomienda el uso de otro modelo, como el modelo GAM, entre otros...)

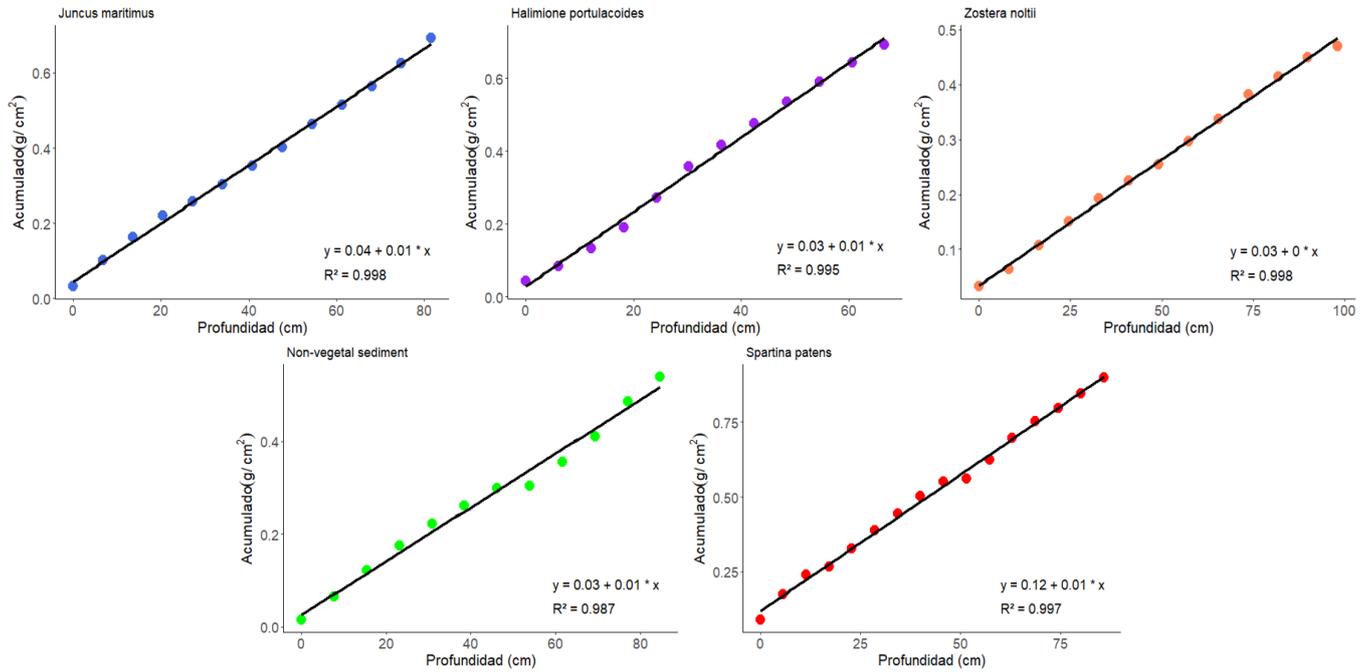


Figura 1. Ejemplos de regresión lineal entre la profundidad del sedimento y el stock de C por unidad de superficie acumulado hasta esa profundidad en cada uno de los hábitats muestreados en CAPTA.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Script de Rstudio para calcular un modelo lineal entre profundidad y stock de C acumulado

```
##### Script extrapolación sediment a 1m de profundidad #####  
library(readxl)  
library(dplyr)  
  
# Cargar datos  
data <- read_excel("C:/Ubicación del directorio/datos.xlsx")  
  
# Filtrar los datos para el código (CODE) del corer deseado.  
datos <- data %>%  
  filter(CODE == "BeSp1_SED")  
  
# Ajustar el modelo lineal  
modelo_lineal <- lm(Acumulado ~ Profundidad, data = datos) # 'Acumulado'  
son los valores de gC/cm2 acumulados  
  
# Mostrar resumen del modelo  
summary(modelo_lineal) #Comprobar que se obtiene un alto valor de R2,  
asegurando un correcto funcionamiento del modelo.  
  
# Calcular la predicción y el error estándar para Profundidad = 100  
nueva_prof <- data.frame(Profundidad = 100)  
prediccion_100 <- predict(modelo_lineal, newdata = nueva_prof, se.fit =  
TRUE)  
  
# Extraer la estimación y su error estándar  
valor_predicho <- prediccion_100$fit  
error_estandar <- prediccion_100$se.fit  
  
# Mostrar la predicción y su error  
print("Predicción para profundidad 100 y su error estándar:")  
print(data.frame(Profundidad = 100, Predicción = valor_predicho,  
Error_Estandar = error_estandar))
```

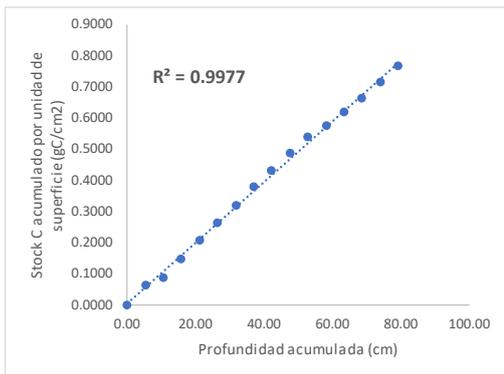
Ejemplo de estima del stock de C hasta 1m de profundidad y del valor medio para un tipo de hábitat con su correspondiente incertidumbre.

CÁLCULO stock de C por unidad de superficie (gC/cm²) acumulados

Sustituir valores

Especie	Código	Datos originales por segmento		Estima de datos acumulados con la profundidad	
		Potencia real del segmento (cm)	Stock C por unidad de superficie (gC/cm ²)	Profundidad acumulada (cm)	Stock C acumulado por unidad de superficie (gC/cm ²)
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED			0.00	0.0000
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0648	5.28	0.0648
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0255	10.56	0.0902
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0607	15.84	0.1509
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0574	21.11	0.2083
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0568	26.39	0.2651
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0563	31.66	0.3215
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0586	36.94	0.3801
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0531	42.22	0.4331
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0561	47.49	0.4892
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0498	52.77	0.5391
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0396	58.05	0.5787
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0428	63.32	0.6215
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0451	68.60	0.6665
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0489	73.87	0.7155
<i>Spartina patens</i>	BeSp1_SED	5.28	0.0522	79.15	0.7677

ESTIMA del stock de C (gC/cm²) para un núcleo con una potencia total de 1 m



1. Utilizando un paquete estadístico (ej. R) calcular un modelo lineal para la relación entre Profundidad acumulada y Stock de C acumulado.
2. Con el modelo, estimar el Stock de C acumulado hasta una profundidad de 100 cm y su error estándar.
3. Repetir el cálculo para cada uno de los 3 núcleos recogidos en el mismo tipo de vegetación.
4. Trasladar los valores a la tabla de abajo.

ESTIMA del stock de C (gC/cm²) medio del sedimento para una potencia total de 1 m y su incertidumbre en un tipo de hábitat

Sustituir valores

Añadir nivel de significación deseado

	Stock C estimado para una potencia de 1 m (gC/cm ²)			Error de la media	t-valor	Margen de error de la media
	Estima	Error estándar	Media			
Núcleo 1	0.922	0.0031				
Núcleo 2	1.034	0.0116	0.996	0.0062	4.3027	0.0266
Núcleo 3	1.031	0.0141				

Resultado final
0.996 ± 0.0266 g C/cm²

Método de extrapolación del contenido C y N en sedimento a partir de estimas de pérdida por ignición

Documento: E.2.7 (Anexo 2)

Acción: A.2.3

Interreg



Cofinanciado por
la Unión Europea
Cofinanciado pela
União Europeia

España – Portugal

CAPTA

INTRODUCCIÓN

Este anexo detalla el procedimiento empleado para estimar el contenido de carbono orgánico total (COT, en %) a partir de los valores de materia orgánica total (MOT, en %) estimados con el método de pérdida por ignición (ver sección de “Procedimientos numéricos” del apartado “5.3 Estimación de Carbono” del protocolo).

PROCEDIMIENTO

La relación entre COT y MOT se estimó empleado un modelo polinómico de segundo grado, forzado a pasar por el origen (0). Aunque estimar el contenido y stock de N no era un objetivo prioritario de CAPTA, se utilizó la misma aproximación para estimar la relación entre contenido de nitrógeno (N) y MOT.

La elección de un modelo polinómico en lugar de otros enfoques se basa en su excelente correlación con nuestros datos ($R^2 > 0.95$, excepto *Zostera noltii*) (Fig. 1). Un modelo similar ha sido utilizado en estudios previos (Craft et al., 1991). Sin embargo, cabe señalar que el ajuste de Craft et al. sobreestima las concentraciones de carbono en nuestros datos (Fig. 2).

En base a lo anterior, se recomienda seguir los siguientes pasos:

1. **Recopilar** los datos de carbono inorgánico total (CIT) y MOT (como pérdida por ignición) de las muestras de sedimento **de un mismo tipo de hábitat** (pasos 17 y 31 de “Procedimiento de laboratorio” del apartado “5.3 Estimación de Carbono” del protocolo).
2. **Recopilar** los datos de **contenido total de carbono** de esas mismas muestras de proporcionados por el servicio externo de análisis (paso 32 de “Procedimiento de laboratorio” del apartado “5.3 Estimación de Carbono” del protocolo).
3. **Corregir los valores de contenido total de carbono (C) para convertirlos en estimas de COT**. Los valores de contenido de C del sedimento deben ser corregidos para descontar la presencia de carbono inorgánico total (CIT) restando el porcentaje de CIT al valor de C (%): $C (\%) - CIT (\%) = C \text{ corregido } (\%)$
4. **Ajustar el modelo**: Estimar la relación entre MOT (%), como variable independiente, y C corregido (%), como variable dependiente. El modelo polinómico de segundo grado, forzado a pasar por el origen, es el que se ajusta mejor y evita la obtención de valores negativos para valores bajos MOT. El ajuste se puede hacer de manera simple con Excel o R (se adjunta script para R).
5. **Estimar el COT a partir de MOT con el modelo** para los segmentos del núcleo en los que solo se midió MOT.

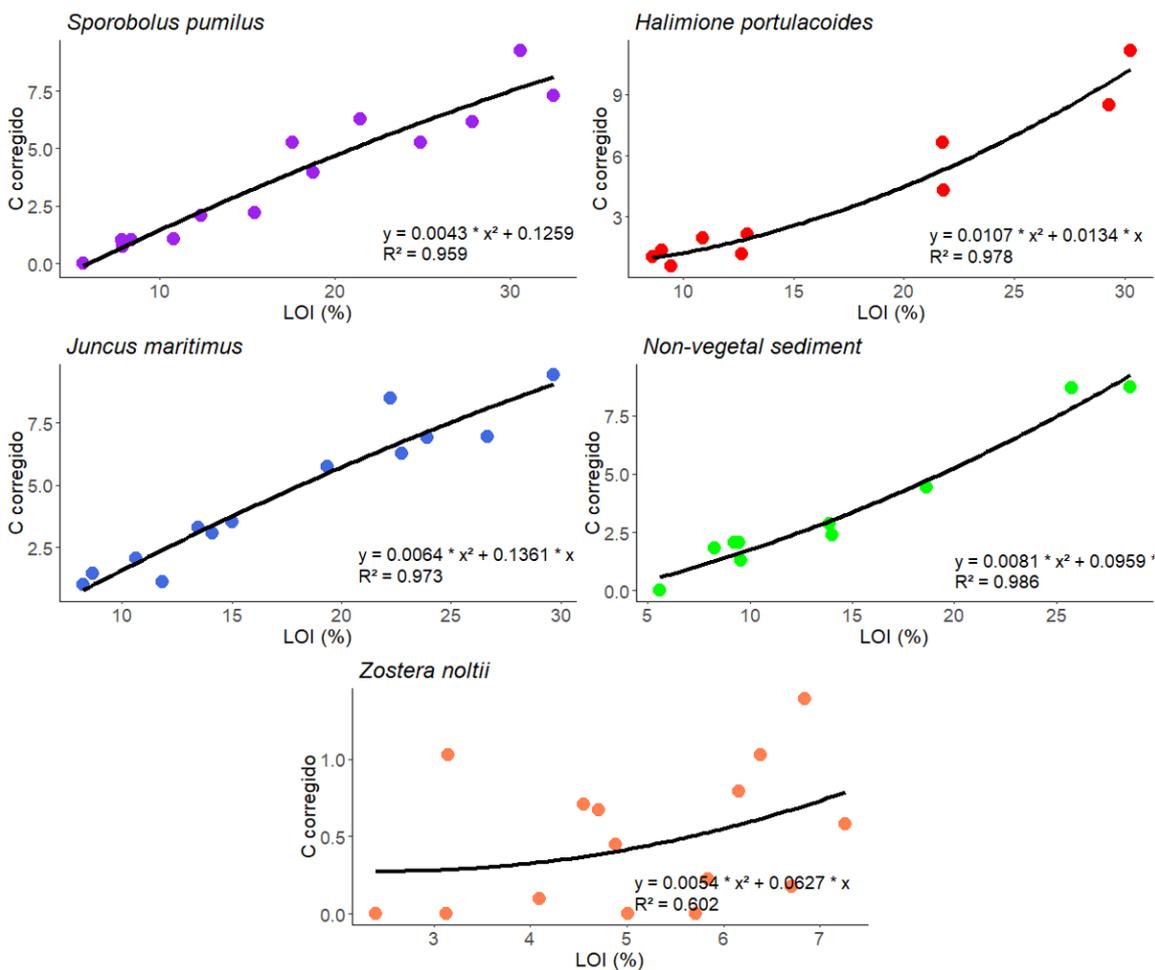


Figura 1. Modelos polinómicos entre la Materia Orgánica Total (como LOI en %) y el contenido de C orgánico (%) en el sedimento de los núcleos recogidos en cada una de las cuatro plantas muestreadas para CAPTA y en sedimento de núcleos recogidos en zonas sin vegetación.

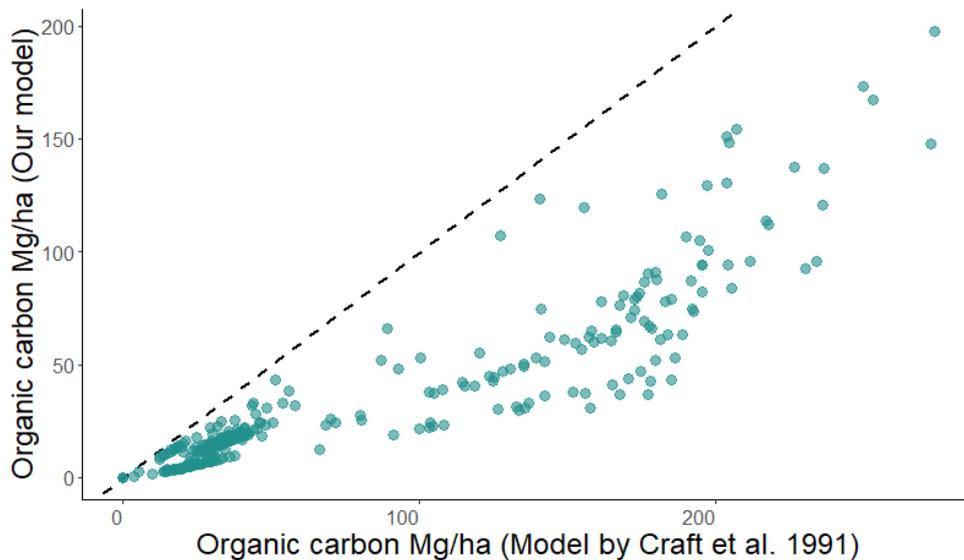


Figura 2. Comparación entre la estima de contenido de Carbono orgánico del sedimento (gC·cm2) a partir del contenido de materia orgánica total con la ecuación de Craft. Et al (1991) y con los modelos ajustados a nuestros datos según este anexo (Our model). La línea de puntos correspondería a una correlación perfecta entre ambas estimas.

```

##### Script anexo 4 #####

# Ajustar el modelo polinómico de grado 2

# Importar los datos de carbono orgánico corregido (C_correg) y materia
orgánica total (LOI) desde un archivo EXCEL. Comprobar que las columnas del archivo
EXCEL tienen los mismos nombres que los que aparecen a continuación, en caso
contrario, deben cambiarse

sedc<-read_excel("Añadir directorio") #Cargamos el archivo

datos_especie<-subset(sedc, Specie=="Halimione portulacoides") #Cambiar
Halimione portulacoides la especie/hábitat para la que se quiera calcular

modelo_especie <- lm(C_correg ~ 0 + poly(LOI, 2, raw = TRUE), data =
datos_especie) #Ajustamos el modelo con la LOI y C corregido

# Resumen del modelo
summary(modelo_especie)

# Obtener los coeficientes del modelo
coeficientes <- coef(modelo_especie)

# Los coeficientes para el polinomio de grado 2 (sin término independiente)
coef_x2 <- round(coeficientes[2], 4) # Coeficiente de x2
coef_x <- round(coeficientes[1], 4) # Coeficiente de x

# Crear la ecuación como texto
ecuacion <- paste("y =", coef_x2, "* x2 +", coef_x, "* x")

# Imprimir la ecuación
print(ecuacion)

```

REFERENCIAS:

Craft, C. B., E. D. Seneca, and S. W. Broome, Loss on ignition and Kjeldahl digestion for estimating organic carbon and total nitrogen in estuarine marsh soils: Calibration with dry combustion, Estuaries, 14, 175 – 179, 1991.