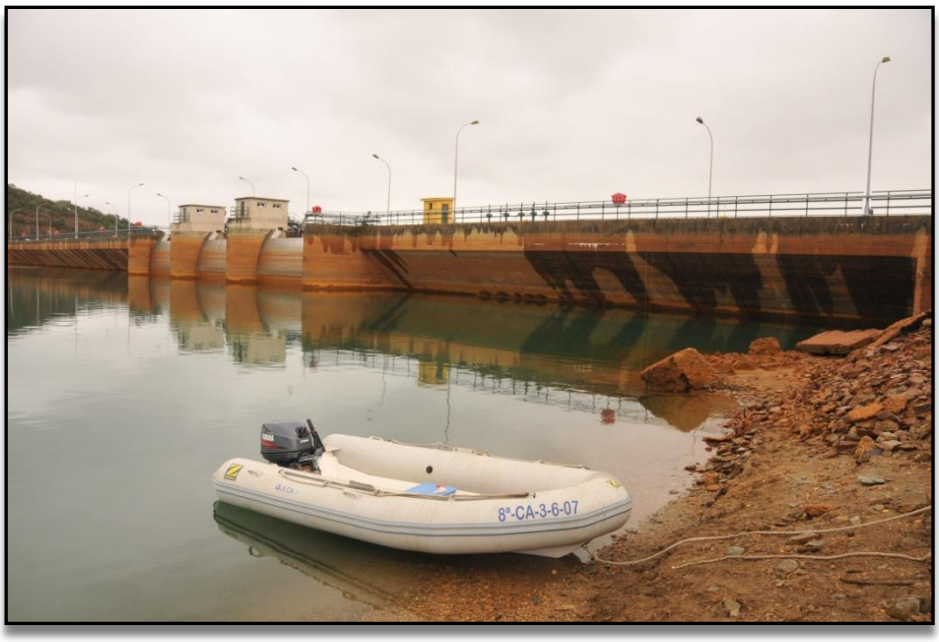
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Trabajo de Fin de Grado / Grado en Ciencias Ambientales

Dinámica estacional de los nutrientes intersticiales del sedimento de un embalse ácido

Presentado por: **Javier Arce Álamo**

Tutores: **Juan Luis Jiménez Arias & Sokratis Papaspyrou**

Puerto Real, Cádiz 2015

AGRADECIMIENTOS

Sin la tutorización, revisión y apoyo continuos del Dr. Alfonso Corzo, Juan Luis Jiménez-Arias, Sokratis Papaspyrou y Julio Bohórquez, este Trabajo de fin grado no hubiera sido posible. La paciencia y comprensión depositada son de enorme agradecimiento.

Agradezco el apoyo incondicional de mi familia, amigos, compañeros, y de todos aquellos que han estado a mi lado en todo en momento.

El Trabajo de fin de Grado que se presenta a continuación ha sido financiado con cargo al proyecto de excelencia de la Junta de Andalucia “Interacción de los procesos microbianos y geoquímicos en la atenuación natural de la contaminación por drenaje ácido de minas en embalses y estuarios” (P11-RNM-7199) al proyecto del Plan Nacional “Microecología y biogeoquímica de los sedimentos intermareales de la Bahía de Cádiz: Forzamiento físico por el ciclo mareal y el fotoperiodo” (CTM2013-43857-R).

RESUMEN

Los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno son escasamente conocidos en medios acuáticos contaminados por drenaje ácido de minas (AMD), lo que hace comprensible que la contribución del sedimento a la regeneración de dichos nutrientes durante el ciclo anual lo sea del mismo modo. En este Trabajo se han analizado las concentraciones de distintos compuestos inorgánicos de nitrógeno disuelto (Nitrato, Nitrito y Amonio) y de Carbono orgánico y Nitrógeno orgánico disueltos (COD y NOD, respectivamente) en muestras de agua intersticial extraídas de testigos de sedimentos del embalse ácido El Sancho (Gibraleón, Huelva). Por lo general, las concentraciones en el sedimento aumentaron con la profundidad, siendo casi siempre mayores que en la columna de agua. La forma convexa de los perfiles de la mayoría de los compuestos (COD, NOD, NH_4^+) sugiere un flujo neto desde el sedimento a la columna de agua. En estratificación, la concentración en el sedimento fue siempre mayor que en mezcla para la mayoría de las variables, lo que se asocia a una mayor tasa de remineralización de la materia orgánica (MO). La elevada concentración de NO_3^- encontrada en las capas anóxicas del sedimento podría indicar la importancia en este tipo de ambientes de un proceso microbiano novedoso como es la nitrificación anaeróbica con Fe(III) como aceptor terminal de electrones.

Palabras clave: ciclo del carbono, ciclo del nitrógeno, drenaje ácido de minas, ciclo anual, carbono orgánico disuelto, nitrógeno orgánico disuelto, agua intersticial, flujo neto, período de estratificación, nitrificación.

ABSTRACT

Both carbon and nitrogen biochemical cycles within acid mine drainage (AMD) - polluted aquatic acidic environments are scarcely known, therefore it is understandable that contribution to sediment regeneration during annual cycling of these nutrients is so as well. Different inorganic dissolved nitrogen compounds (nitrate, nitrite and ammonium) together with dissolved organic carbon (DOC) and nitrogen (DON) concentrations have been measured from pore water samples that had been extracted from sediment cores that had been previously taken from El Sancho acidic reservoir (Gibraleón, Huelva). On a general basis, sediment concentrations enlarged with

reference to depth, which were usually larger than those that could be found in water column. Profiles showed convex shapes owing to the majority of compounds (DOC, DON, NH_4^+) that suggest the existence of a net flux from the sediment towards the water column. Over stratification period, sediment concentration regarding almost every variable was always larger in comparison to mix period, which can be related to a larger organic matter (OM) remineralisation rate. Elevated NO_3^- concentration that was found within anoxic sediment layers could denote how relevant a novel microbial process so-called anaerobic nitrification coupled to Fe(III) as final electron sink could be.

Key words: carbon cycle, nitrogen cycle, acid mine drainage, annual cycling, dissolved organic carbon, dissolved organic nitrogen, pore water, net flux, stratification period, nitrification.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. LAGOS ÁCIDOS 1
1.2. REMINERALIZACIÓN BENTÓNICA DE NUTRIENTES 3
1.3. DINÁMICA DE NUTRIENTES EN LAGOS ÁCIDOS 6
1.4. OBJETIVOS 7

2. MATERIAL Y MÉTODOS 8

2.1. LUGAR DE ESTUDIO 8
2.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS 8
2.3. SECCIONAMIENTO DE LOS TESTIGOS DE SEDIMENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 10
2.4. ANÁLISIS DE CARBONO ORGÁNICO DISUELTO (COD) Y NITRÓGENO TOTAL DISUELTO (NTD) 11
2.5. ANÁLISIS DE NO_3^-, NO_2^- Y NH_4^+ EN EL AGUA INTERSTICIAL 11

3. RESULTADOS 15

3.1. CARBONO ORGÁNICO DISUELTO 15
3.2. NITRÓGENO TOTAL DISUELTO 15
3.3. NITRATO 16
3.4. NITRITO 17
3.5. AMONIO 18
3.6. NITRÓGENO ORGÁNICO DISUELTO 19
3.7. COMPARACIÓN CUANTITATIVA DE LOS CONSTITUYENTES DEL NITRÓGENO TOTAL DISUELTO 19

4. DISCUSIÓN 22

4.1. DISTRIBUCIONES VERTICALES DE NUTRIENTES EN EL SEDIMENTO 22
4.2. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN EN EL SEDIMENTO EN ESTRATIFICACIÓN Y MEZCLA 25
4.3. ACOPLAMIENTO BENTÓNICO-PELÁGICO 27

5. CONCLUSIÓN 30

REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Lagos ácidos

Un lago ácido se caracteriza por presentar un pH inferior al habitual, que normalmente se halla en torno al valor de 6 (Wetzel, 2001). Un ejemplo natural lo constituyen los lagos de cráter u originados por actividad volcánica, los cuales contienen altas concentraciones de metales debido a la interacción de dicha actividad con el agua y presentan una elevada acidez, con valores de pH desde 0.7 a 5.5. Además, existen lagos ácidos por causas antropogénicas, como aquellos generados por la lluvia ácida o por el fenómeno denominado drenaje ácido de minas (AMD, de su sigla en inglés).

El AMD tiene tener lugar cuando los residuos de minería se ponen en contacto con el oxígeno de la atmósfera y el agua de lluvia o la escorrentía. La oxidación de los sulfuros de Fe acumulados en escombreras origina la acidez en las aguas de lixiviado, que es acelerada mediante la actividad bacteriana. Como resultado, las aguas ácidas resultantes contienen altas cantidades de sulfatos, hierro, metales y metaloides (Al, Cu, Pb, Zn, As, ...).

De los sulfuros de Fe presentes en los residuos mineros, la pirita es el más abundante. La oxidación de la pirita (FeS_2) con O_2 en presencia de agua da lugar a la formación de ácido sulfúrico y Fe(II). El ión ferroso liberado es oxidado a su vez con O_2 a Fe(III). Como ambas reacciones producen H^+, acidifican el medio. La ecuación neta es (Galván et al., 2007):

$$FeS_2 + 15/4O_2 + 7/2H_2O \rightarrow 2SO_4^{2-} + Fe(OH)_3(s) + 4H^+$$

La presencia de bacterias acidófilas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* incrementan la tasa de oxidación del ión ferroso hasta dos órdenes de magnitud, aumentando de este modo la acidificación.

El lixiviado altamente concentrado y tóxico que representa el AMD está sujeto a una serie de procesos de atenuación natural que incluyen procesos físicos, químicos y biológicos. La dispersión y dilución del AMD al mezclarse con aguas neutras, las reacciones de hidrólisis o la coprecipitación y/o absorción de distintos metales con los hidróxidos e hidrosulfatos metálicos son procesos físico-químicos que atenúan la acidez

y eliminan parte de la carga contaminante en este tipo de sistemas (Olías et al., 2004; Sánchez-España et al., 2005; Cánovas et al., 2007; Agencia EFE, 2014). Además, la capacidad tamponante del lago depende del rango de pH. En las aguas naturales neutras, inlcuyendo lagos y embalses, la capacidad tamponante depende del sistema carbónico-carbonatos. Este sistema comprende el equilibrio químico:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O \rightleftharpoons OH^- + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2O + CO_3^{2-}$$

, por el que un cambio en algún componente afecta a otro actúando simultáneamente como amortiguador - por ejemplo, un aporte adicional de CO_2 debido a una mayor respiración provocaría el descenso del pH junto a la producción de HCO_3^-, que aporta alcalinidad al agua (Vallentyne, 1978). Valores de pH entre 4.5 y 5.5 están controlados mediante el sistema de hidróxidos de aluminio ($Al(OH)_x$); a pH 2-4 el tamponamiento se regula mediante el sistema de hidróxidos de hierro ($Fe(OH)_x$) (Geller et al., 1998). En cambio, cuando la mineralogía de la cuenca es pobre en carbonatos, la neutralización natural en lagos afectados por AMD está normalmente limitada por la disponibilidad de carbono orgánico. Procesos biológicos que generan alcalinidad, como son la producción de O_2 durante la fotosíntesis o la reducción no asimilatoria o disimilativa de sulfato durante la descomposición de la MO, pueden contribuir a neutralizar la acidez (Koschorreck 2002;2007).

En lo relativo a su biota, la acidez de este tipo de lagos no elimina todo tipo de vida. Existen organismos adaptados a estas condiciones, como por ejemplo algunas algas eucariotas que viven en condiciones de pH en el rango de 1.9 a 4. De la misma forma, se han observado ciertos taxones de rotíferos adaptados a este tipo de condiciones extremas. Todas estas especies abundan en ambientes ácidos y son características de este tipo de sistemas (Derham, 2004). Sin embargo, estos lagos presentan tasas de producción primaria generalmente bajas o muy bajas (2.7 mmolC $m^{-2}d^{-1}$; Gyure et al. 1987; 0.0827 mmolC $m^{-2}d^{-1}$; Lessmann et al. 1999) debido a que la biomasa fitoplanctónica es baja.

La contaminación por AMD supone un grave problema medioambiental. En la mayoría de las regiones templadas los problemas se originan tras el cese de la actividad minera, cuando los huecos de excavación en las minas se inundan y las escombreras quedan a la intemperie. El abandono de la gestión de los residuos y la acción de los

agentes meteorológicos causan la meteorización de los minerales de azufre previamente explotados y la formación de aguas ácidas que son transportadas por escorrentía hasta otras masas de agua dulce. Arroyos, y pequeños ríos ya acidificados, pueden causar acidificación puntual en embalses y acuíferos cercanos. En muchos casos, cuando la fuente de contaminación persiste, la acidificación deja de ser episódica y pasa a ser crónica (varias décadas), pudiendo afectar al resto de la cuenca hidrológica. Ante ello, la comunidad científica habría de tratar de encontrar alguna solución mediante la búsqueda de enfoques simples y de bajo coste económico que persigan la protección de una determinada área para la prevención del proceso de acidificación o la restauración de los lagos y embalses ácidos (Geller et al., 1998).

1.2. Remineralización bentónica de nutrientes

El sedimento que se halla a una profundidad superior a la capa fótica en lagos y embalses recibe un aporte neto de MO a través de la sedimentación de material particulado que presenta la columna de agua. Al mismo tiempo, tanto la MO particulada como la disuelta presentes en la columna de agua pueden tener dos orígenes distintos. Pueden ser provenientes o bien de los productores primarios de la capa fótica del embalse (MO autóctona) o bien pueden ingresar al embalse como MO detrítica a partir del medio terrestre que rodea al embalse, mediante escorrentía, ríos, ... (MO detrítica alóctona). La producción primaria en un lago es llevada a cabo por el fitoplancton en la capa fótica además de por organismos fotosintéticos bentónicos - microfitobentos y macrofitobentos -, que habitan los sedimentos que se encuentra a una profundidad inferior a la de la capa fótica. La producción primaria bentónica está generalmente restringida a las orillas del lago y su relevancia en el balance global de un cuerpo de agua depende de la morfología de su cuenca, como puede ser su relación superficie:volumen o profundidad media. En la mayoría de los lagos y embalses la importancia de este compartimento es escasa, siendo la producción primaria fitoplanctónica *in situ* la principal fuente de entrada de MO autóctona al sistema (Wetzel, 2001; Margalef, 1983).

El crecimiento del fitoplancton en la capa fótica sigue un ciclo estacional muy bien definido, que está en última estancia determinado por la variación de la dosis diaria

de radiación solar que recibe la capa superior del agua del lago. Estos cambios estacionales en la irradiancia diaria media determinan un aumento de temperatura en primavera y verano así como una disminución en otoño e invierno que a su vez alteran la densidad del agua. Durante la primavera, a medida que se calientan las capas de agua superiores, su densidad disminuye y se forma una termoclina que divide el lago en dos compartimentos con temperaturas muy diferentes: el superior, denominado epilimnion, caliente, poco denso e iluminado; y el inferior, hipolimnion, más frio y denso, y donde generalmente ya no llega la luz, salvo en lagos muy poco productivos, como suelen ser algunos lagos ácidos. En esta fase, que ocurre en primavera y verano en climas templados, se dice que el lago o embalse se encuentra estratificado en capas de agua (epilimnion, termoclina e hipolimnion), con distintas características fisicoquímicas y biológicas. En cambio, durante el otoño y principalmente en invierno, al disminuir la irradiancía solar diaria, disminuye la temperatura del agua superficial, desapareciendo el gradiente térmico y de densidad de la termoclina y por tanto el lago se encuentra mezclado desde la superficie hasta el fondo, tendiendo a uniformizarse los valores de todas las propiedades fisicoquímicas y biológicas en la columna de agua. El aumento de la temperatura del agua en primavera y la mayor irradiancia diaria, promueven el crecimiento del fitoplancton en la zona fótica (que suele suceder en el epilimnion) siempre que haya suficientes nutrientes, mientras que en invierno la producción primaria fitoplanctónica y su crecimiento están muy limitados por una menor temperatura y menor irradiancia diaria recibida, debido a que la capa de mezcla alcanza mayor profundidad que la capa fótica, a pesar de una mayar disponibilidad de nutrientes en la columna de agua (Wetzel, 2001; Margalef, 1983).

A medida que el fitoplancton se desarrolla, se hunde por su peso y sedimenta representando un aporte fundamental de MO al sedimento. La mineralización de la mayor parte de la MO particulada autóctona y alóctona que ingresa en los lagos se realiza en el sedimento. La mineralización es llevada a cabo en el sedimento por bacterias que descomponen la MO, transformando el carbono orgánico en CO_2, el nitrógeno orgánico en NH_4^+, a través del proceso de amonificación, para luego oxidarlo a nitrito y nitrato por medio de la nitrificación, e hidrolizando los enlaces fosfodiéster y liberando de este modo el fosfato de los compuestos orgánicos a los que se encontraba unido, ... Durante este proceso se liberan nutrientes inorgánicos (NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, entre otros) que son esenciales para el crecimiento del fitoplancton (Jorgensen,

2006; Canfield et al., 2005). Dichos nutrientes fluyen desde el agua intersticial del sedimento hacia la columna de agua, reciclándose los nutrientes para la producción primaria del sistema cuando alcanzan la capa fótica.

La descomposición de la MO en el sedimento puede ocurrir en condiciones aerobias en presencia de oxígeno o en condiciones anaerobias cuando el oxígeno se agota en el hipolimnion, como durante el periodo de estratificación. De la misma forma ocurre mediante procesos anaeróbicos cuando el proceso de degradación sucede en el sedimento a una profundidad superior a la profundidad de penetración máxima del oxígeno (varios mm) incluso en una columna de agua óxica. La mineralización de la MO en presencia de oxígeno se completa mediante el proceso de respiración aerobia, donde el oxígeno es empleado como aceptor terminal de electrones. En cambio, en ausencia de oxígeno, la MO se mineraliza mediante la acción secuencial de la fermentación y la respiración anaerobia. Los microrganismos fermentadores degradan los biopolímeros hasta compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como diversos ácidos orgánicos y alcoholes, y estos productos de la fermentación, son empleados por bacterias que realizan diversos procesos de respiración anaeróbica, empleando una variedad de compuestos oxidados (NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, ...) como aceptores terminales de electrones en ausencia de O_2. Estos aceptores de electrones son empleados secuencialmente en función de su abundancia en el medio y su rendimiento energético (Jorgensen, 2006; Canfield et al., 2005).

En los medios acuáticos someros, como son la mayoría de los lagos y embalses, existe un fuerte acoplamiento pelágico-bentónico (también referido como acoplamiento bentónico-pelágico) entre los procesos de fijación de C, es decir la producción primaria en la superficie del lago, y la mineralización de dicha MO, que tienen lugar fundamentalmente en el sedimento. La producción primaria alcanza el sedimento mediante la sedimentación debida a la fuerza de la gravedad y los nutrientes disueltos liberados del sedimento alcanzan la capa fótica principalmente por difusión turbulenta.

Las tasas de producción primaria y de mineralización de la MO, así como el grado de acoplamiento bentónico-pelágico y la dirección neta de los flujos están fuertemente afectadas por el ciclo estacional. La estratificación influye en el ciclado de nutrientes, cuando se limita la difusión de los nutrientes a través de la termoclina por los altos valores del gradiente de densidad del agua en profundidad, así como en el

hundimiento de partículas, determinante en el mencionado acoplamiento (Margalef, 1983; Wetzel, 2001).

La tasa de mineralización y por tanto la regeneración bentónica de nutrientes es afectada por diversos factores que cambian estacionalmente (Wetzel, 2001; Canfield et al., 2005). 1) Cantidad y calidad de la MO en el sedimento. El input de MO al sedimento varía estacionalmente, fundamentalmente en función de los cambios en la producción primaria y la tasa de sedimentación. 2) Disponibilidad de oxígeno y otros aceptores de electrones. En general la mineralización es más rápida y más eficiente en presencia de oxígeno. 3) Temperatura. La actividad microbiana aumenta con la temperatura. 4) Bioturbación. La meiofauna y la macrofauna bentónica pueden jugar un papel esencial, ya que su actividad altera los flujos a través de la interfase sedimento-agua mediante su mezcla y la advección de agua intersticial. Sin embargo, la actividad de la meio- y macrofauna solo está restringida a la fase de mezcla y al comienzo de la estratificación cuando el oxígeno aun llega al sedimento.

1.3. Dinámica de nutrientes en lagos ácidos

Los lagos ácidos de carácter natural o aquellos producidos por la contaminación con AMD han sido menos estudiados que los lagos neutros en todos los aspectos. A pesar de ello, esta tendencia está cambiando en los últimos años debido a algunos factores. Entre los mismos, se ecuentran 1) la necesidad de generar un conocimiento científico de los distintos procesos ecológicos y biogequímicos que se dan en ellos de cara a su posible restauración, y 2) la posibilidad de encontrar metabolismos microbianos y especies de microorganismos nuevos adaptados a condiciones extremas que puedan tener aplicaciones biotecnológicas.

Uno de los aspectos menos estudiados en este tipo de medios acuáticos es la dinámica de nutrientes tanto en la columna de agua como en el sedimento (Blodau et al., 2000). La mayoría de estudios en lagos afectados por AMD se han centrado en estudiar la geoquímica del agua, centrándose principalmente en el contenido y evolución de las grandes cantidades de distintos metales que existen en estos medios (Asta et al., 2015). La razón de esta ausencia de estudios puede ser debida a que hasta hace poco se pensaba que la acidez impedía la remineralización bentónica de nutrientes (Wetzel, 2001).

Este Trabajo de fin de grado se integra en un proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía denominado "Interacción de los procesos microbianos y geoquímicos en la atenuación natural de la contaminación por drenaje acido de minas en embalses y estuarios" (P11-RNM-7199), que se desarrolla en un embalse ácido (pH 3.5) debido a la contaminación por AMD, el embalse de "El Sancho", y donde se están estudiando tanto la ecología microbiana como los diferentes procesos biogeoquímicos en la columna de agua y los sedimentos.

1.4. Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo de fin de grado es estudiar la dinámica de nutrientes intersticiales en un embalse afectado por drenaje ácido de minas durante los períodos de estratificación y mezcla. Comprende los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la concentración de Carbono orgánico y Nitrógeno orgánico disueltos y nutrientes inorgánicos de nitrógeno (nitrato, nitrito y amonio) en el agua intersticial del sedimento en la fase de mezcla y estratificación de un embalse afectado por AMD.
2. Comparar los perfiles verticales en ambas fases del ciclo anual del embalse para determinar su dinámica estacional respecto a los ciclos del nitrógeno y el carbono.
3. Determinar el papel que tiene la regeneración bentónica de nutrientes en lagos ácidos y su posible acoplamiento con el sistema pelágico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio

La zona de estudio es un embalse (El Sancho) situado en la zona minera conocida como la Faja Pirítica Ibérica en el suroeste de la península. El embalse se sitúa en el término municipal de Gibraleón (Huelva) y pertenece a la cuenca del río Odiel (37.46347 ºN, 06.98402 ºW; Fig.1). Fue construido en 1962 con una extensión de 427 ha y una capacidad máxima de 58 hm^3, cuyas aguas se destinan actualmente al uso industrial. Comenzó a acidificarse en 1999 al recibir el aporte de aguas contaminadas por AMD. Dichas aguas provienen del río Meca, un afluente del Odiel de pH muy bajo (en torno a 4). El pH desciende anualmente, y lleva una elevada carga de metales provenientes de la mina de Tharsis (Galván et al., 2007; Aquatic Biotechnology, 2014). Debido al cierre de la mina estas aguas se han deteriorado progresivamente, quedando restringido su uso a la refrigeración en una papelera. Además, la contaminación ha transformado totalmente su comunidad biológica original, de forma que ya no contiene peces ni apenas algún macroorganismo, en el que solo pueden subsistir especies microbianas capaces de resistir condiciones extremas de bajo pH y elevadas concentraciones de metales en disolución (López-Archilla y Amils, 1999; López-Archilla et al., 2001; González-Toril et al., 2003; Amaral Zettler et al., 2003).

2.2. Recolección de muestras

Se tomaron testigos de sedimento en un punto de muestreo fijo situado cerca de la presa. Los muestreos fueron realizados durante los meses de septiembre y octubre de 2013, correspondientes al período de estratificación del embalse, y en los meses de enero y febrero de 2014, cuando el embalse se encuentra mezclado (Tabla 1). En cada uno de los muestreos, se tomaron aproximadamente entre 10 y 12 testigos de sedimento.

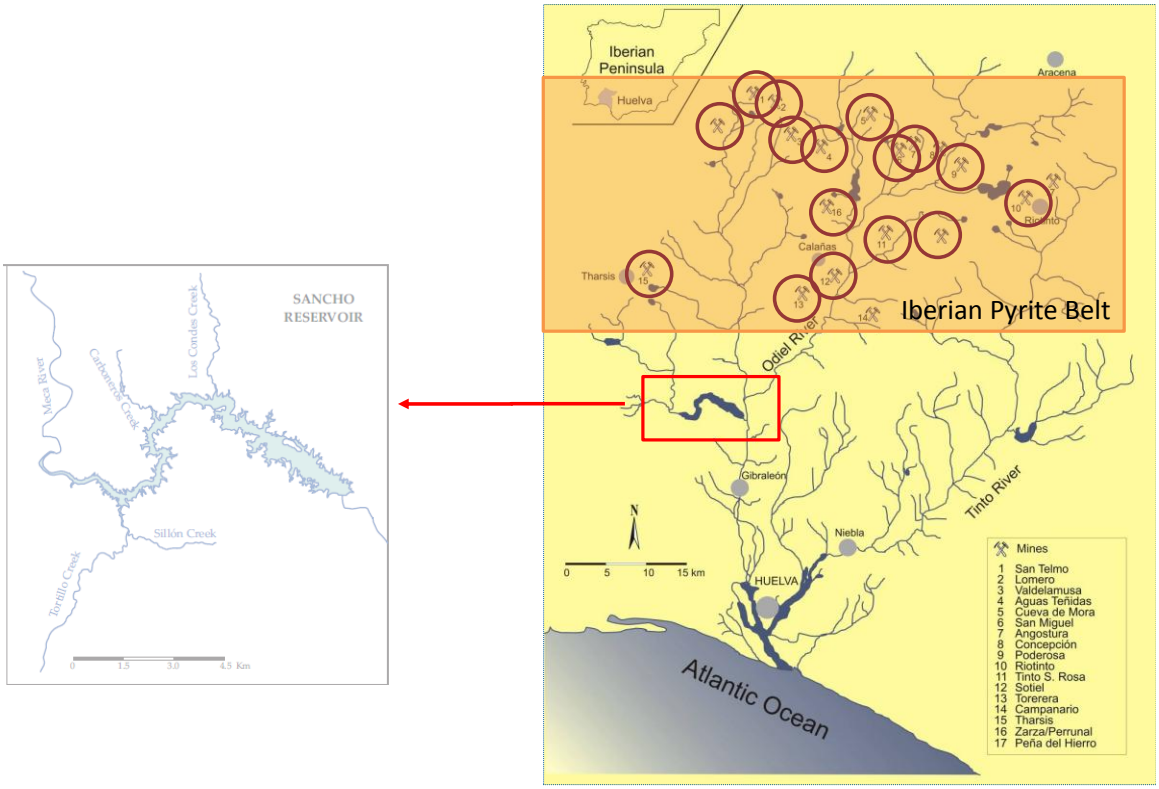


Figura 1: Detalle del emplazamiento del embalse de El Sancho (izquierda) en la cuenca del río Odiel, al sur de la mina de Tharsis (leyenda) en la Faja Pirítica Ibérica, situado cerca del núcleo urbano de Gibraleón (Fuente: Corzo, 2015).

Tabla 1: Durante el período de estratificación se realizaron 4 muestreos repartidos entre los meses de septiembre-octubre 2013, además de 3 muestreos en la fase de mezcla entre los meses de enero-febrero 2014 (Fuente: Aquatic Biotechnology, 2014).

Estado de la columna de agua	Código del testigo	Fechas
Estratificación	S1	15/09/2013
	S2	02/10/2013
	S3	10/10/2013
	S4	11/10/2013
Mezcla	S5	09/01/2014
	S6	22/01/2014
	S7	05/02/2014

Los testigos fueron tomados desde una zodiac mediante un sacatestigos Kajak 13030 KC-Denmark con tubos transparentes de metacrilato de 5.2 cm de diámetro interno por 33 cm de largo (Fig. 2) .

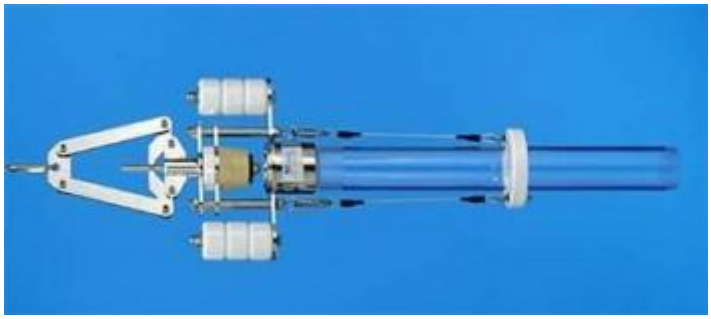


Figura 2: Sacatestigos Kajak 13030, KC-Denmark (Fuente: © Google, 2013).

Los testigos fueron transportados en vertical desde el embalse hasta el laboratorio (desde Gibraleón, Huelva, a Puerto Real, Cádiz). Una vez en el laboratorio, se introdujeron en una cámara frigorífica para mantener el sedimento a la misma temperatura que el fondo del embalse (13º C).

2.3. Seccionamiento de los testigos de sedimento y preparación de las muestras

El día posterior a la recogida del sedimento en el campo se llevó a cabo el seccionamiento de los testigos a diferentes profundidades.

Para el seccionamiento se tomaron dos testigos por cada muestreo y el resto se utilizaron para otros análisis (microperfiles con microelectrodos, incubaciones, parámetros físicos, ...). Cada testigo fue cortado en rodajas de 1 cm hasta la profundidad de 6 cm, y luego cada 2 cm hasta los 18 cm de profundidad. Las muestras correspondientes a la misma profundidad fueron mezcladas en un mismo recipiente para contar con material suficiente para todos los análisis. De la misma forma, se tomó una muestra del agua sobrenadante a 2 cm de la superficie del sedimento en ambos testigos. Toda la manipulación del sedimento se realizó bajo atmósfera libre de oxígeno mediante la exposición continua de un chorro de N_2 gas sobre la superficie de la muestra. Más adelante, y una vez cerrados los recipientes, las muestras fueron transferidas a una

cámara anóxica. Allí el material fue homogeneizado y traspasado a tubos de 45 mL. Las muestras se centrifugaron fuera de la bolsa para separar el agua intersticial del sedimento y fueron introducidas nuevamente con posterioridad. El tiempo fuera de la bolsa no excedió de los 20 minutos, y los tubos permanecieron cerrados y refrigerados. Una vez dentro de la bolsa, el agua intersticial fue filtrada a través de un filtro de nylon de 0.2 μM de diámetro. Las muestras de agua intersticial para nutrientes se transfirieron a tubos de plástico de 5 mL previamente lavados con ácido y se mantuvieron a -20ºC hasta su análisis. Las muestras para Carbono orgánico disuelto (COD) y Nitrógeno total disuelto (NTD) fueron transferidas a tubos de vidrio y acidificadas con HPO_3 (diluido 1:3), y se mantuvieron en el frigorífico. Además, se cogieron muestras del mismo testigo para CO_2 disuelto.

2.4. Análisis de Carbono orgánico disuelto (COD) y Nitrógeno total disuelto (NTD)

La concentración de COD y NTD se determinó en un analizador de carbono orgánico total y nitrógeno total modelo TOC-5050 (Shimadzu), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La acidificación previa de la muestra eliminó el carbono inorgánico disuelto en la muestra.

2.5. Análisis de NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+ en el agua intersticial

Los métodos analíticos empleados para la determinación de estos nutrientes han sido adaptados de las metodologías descritas por varios autores. En todos los casos se empleó un método colorimétrico por medio de la realización de una serie de patrones de concentración conocida para determinar la concentración de los nutrientes.

Previamente al análisis, y tras la descongelación de las muestras, éstas fueron centrifugadas debido al alto contenido en precipitados de hierro provenientes de la oxidación durante su almacenamiento. La eliminación de este precipitado evitó la posible interferencia de turbidez de la disolución en la medida de la absorbancia. La centrifugación se realizó a 4ºC de temperatura y a 5000 rpm, durante 20 minutos.

El análisis de NO_3^- y NO_2^- se ha llevado a cabo según el método de García-Robledo et al. (2013). Se basa en la reducción de nitrato a nitrito mediante una disolución de vanadio (III) en una disolución ácida, lo que hizo posible la medida de ambos nutrientes mediante el mismo método. El nitrato reaccionó en una solución ácida, a pH entre 1.5 y 2, con sulfanilamida, para formar un diazo-compuesto que posteriormente se ligó al N-(1-naftil)-etilendiamina, dando entonces lugar a otro complejo azoico, de color azul. Su intensidad de color fue directamente proporcional a la concentración de nitrito, cuya absorbancia se midió con posterioridad.

En primer lugar se analizó el nitrito de la muestra. La medida se realizó añadiendo 34 µL de un reactivo a un eppendorf que contenía 680 µL de muestra (o patrón de nitrito y nitrato). El reactivo de nitrito consistió en una mezcla de sulfanilamida y NED o dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina, en proporción 1:1. Tras un tiempo de 20 minutos, de cada eppendorf se extrajeron 330 µL para el análisis en microplacas. La absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de microplacas (modelo BIO-TEK POWERWAVE 340; Fig. 3) a través del programa KC Junior. Por otra parte, a los patrones de nitrato les fue retirado el mismo volumen. En segundo lugar, se analizó el nitrato con el volumen restante. A las muestras y patrones se añadieron 36 µL de VCl_3 y los tubos eppendorf fueron llevados a un baño a 60ºC durante 30 minutos. Con ello la completa transformación de nitrito a nitrato tuvo lugar.

Tras el baño, los patrones y muestras fueron enfriados y traspasados a una microplaca. Finalmente, la absorbancia se midió en el lector a la misma longitud de onda.

El análisis de NH_4^+ se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Bower y Holm - Hansen (1980). Este método se basa en la reacción del sodio con el amonio en una disolución débilmente alcalina con salicilato e hipoclorito, que dieron lugar a la formación de indofenol-azul. La intensidad del color azul fue medida en el lector, con el que se obtuvo una medida de absorbancia directamente proporcional a la concentración de amonio.

Debido a la alta concentración de amonio de las muestras, estas muestras se diluyeron entre 2 y 140 veces con agua mili-Q, en función de los datos de NTD. El análisis se realizó tomando 500 µL de patrones y muestras, a los que se añadió dos reactivos: 60 µL de salicilato de sodio con nitroprusiato de sodio, y posteriormente

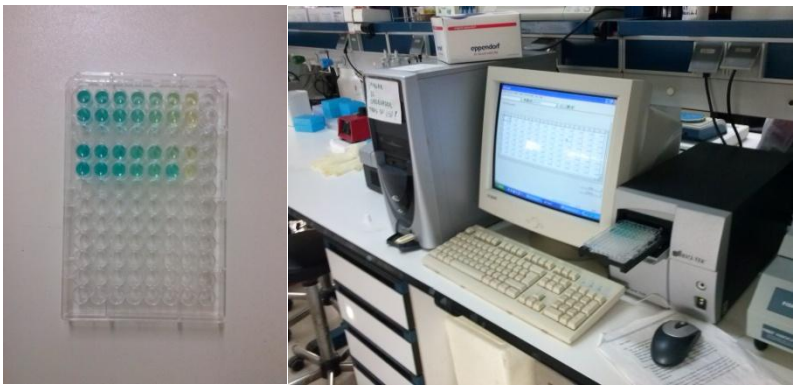


Figura 3: Microplaca para la medida de amonio (izquierda) y lector de microplacas BIO-TEK POWERWAVE 340 conectado a un ordenador con el programa KC Junior (derecha).

100 µL de otro reactivo resultante de la mezcla de hidróxido de sodio con citrato de sodio y de hipoclorito de sodio en proporción 19:1. Tras un periodo máximo de 3 horas en oscuridad, se traspasó el contenido de los eppendorfs a una microplaca para la medida de las absorbancias a 640 nm.

Las concentraciones de todos los nutrientes fueron obtenidas mediante curvas de calibración a partir de patrones de concentración conocida (Fig. 4). Partiendo de la absorbancia de las muestras, se calculó la concentración del nutriente (mM o µM) mediante la siguiente fórmula:

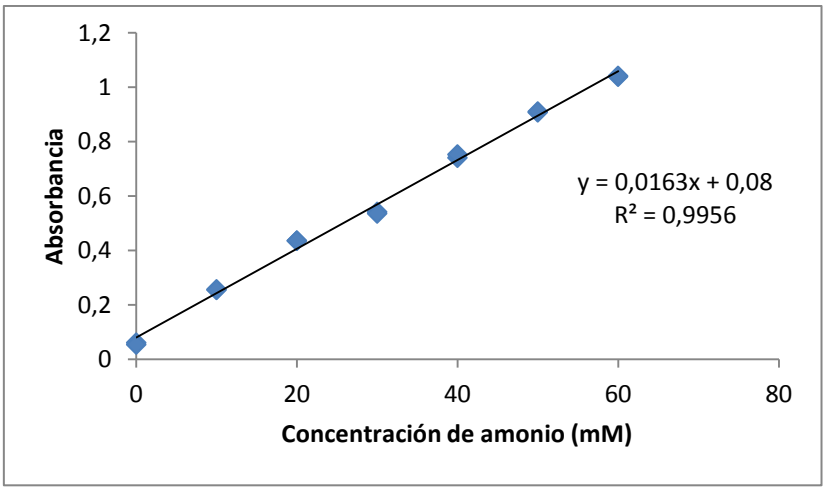


Figura 4: Ejemplo de curva de calibración para NH_4^+ donde se representó la absorbancia de los patrones frente a sus respectivas concentraciones.

$$C = \frac{A - a}{b}$$

C = Concentración del nutriente A = Absorbancia de la muestra

a = Intersección de la recta de calibrado b = Pendiente de la recta de calibrado

Las medidas de los nutrientes inorgánicos NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+, permitieron calcular los valores de Nitrógeno órgánico disuelto (DON) en el agua intersticial mediante la resta de todos estos compuestos nitrogenados a la concentración de NTD.

3. RESULTADOS

3.1. Carbono orgánico disuelto

El Carbono orgánico disuelto aumentó en profundidad (Fig.5). El mayor aumento se encontró en el testigo S2 (estratificación). El rango de concentraciones en estratificación (0.26 - 18.86 mM) fue superior al encontrado en mezcla (0.15 - 13.25 mM).

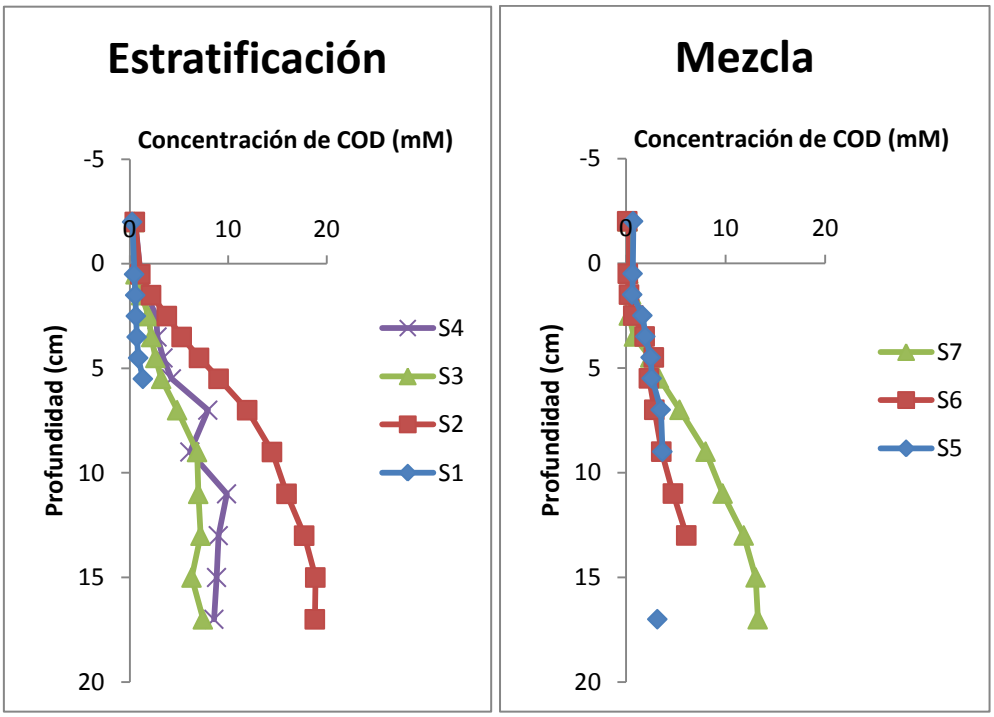


Figura 5: Perfil vertical de la concentración de COD en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla. Los valores no representados no pudieron ser medidos.

3.2. Nitrógeno total disuelto

El Nitrógeno total disuelto mostró una tendencia al aumento en profundidad como en el caso del COD (Fig. 6). En el testigo S2 presentó mayor incremento. En estratificación mostró un rango más amplio de concentraciones (0.16 - 3.67 mM) que en mezcla (0.11 - 3.06 mM).

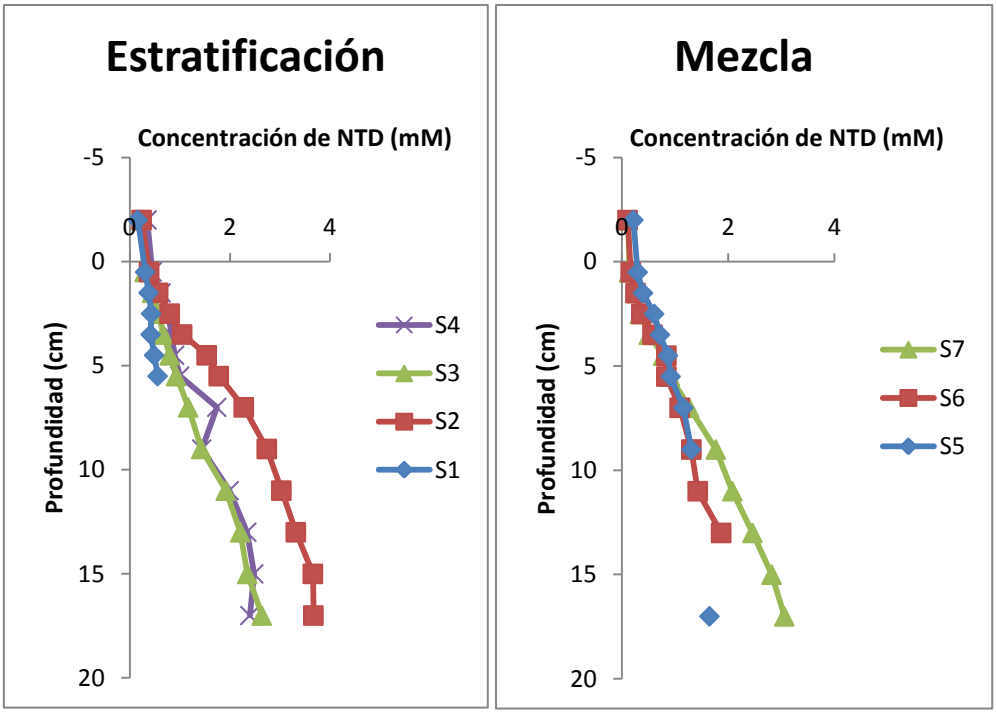


Figura 6: Perfil vertical de la concentración de NTD en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla. Los valores no representados no pudieron ser medidos.

3.3. Nitrato

La distribución vertical de Nitrato en el agua intersticial fue bastante irregular (Fig. 7). En ambas estaciones los rangos de concentraciones no difirieron de manera relevante (3.48 - 41.24 µM en estratificación y 4.47 - 43.00 µM en mezcla). En estratificación se observaron mayores concentraciones en superficie, mientras que en mezcla menores en profundidad.

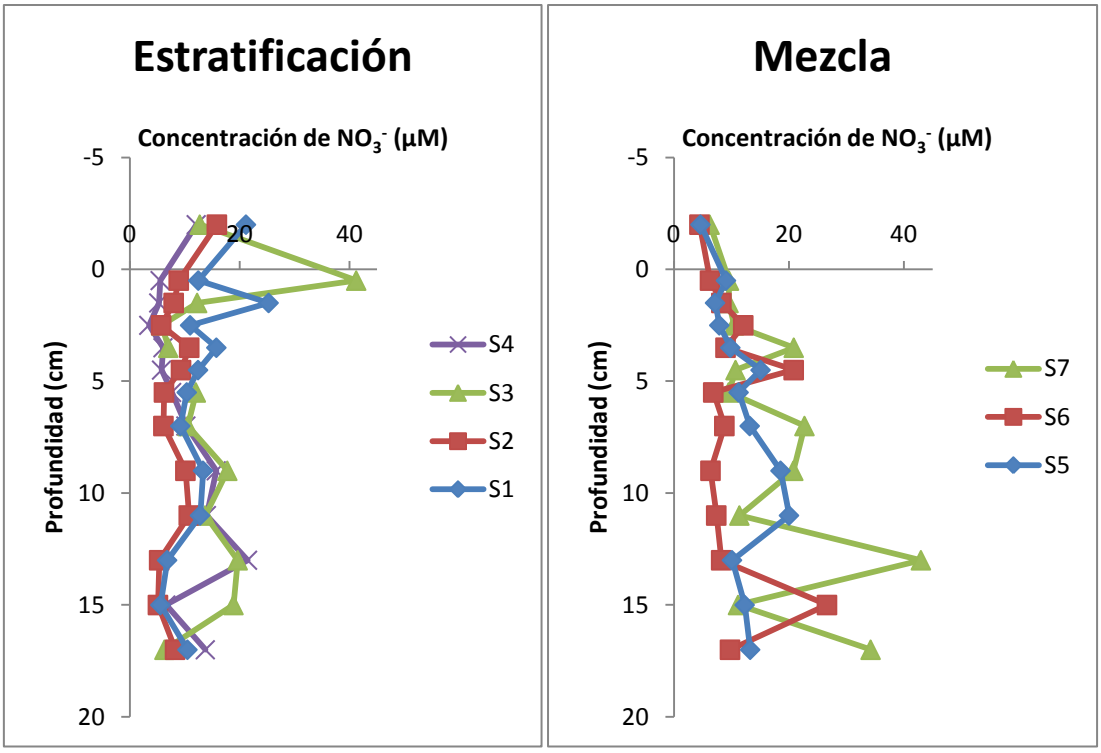


Figura 7: Perfil vertical de la concentración de NO_3^- en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla.

3.4. Nitrito

Se observaron valores bajos de Nitrito en todo el perfil en ambos períodos, aunque ligeramente mayores en profundidad, y de manera considerable en mezcla (Fig. 8). Además, se apreciaron picos de concentración a profundidades no demasiado disímiles -a 2.5 y a 3.5 cm en estratificación y mezcla, respectivamente -, aunque los valores se diferenciaron en aproximadamente una unidad de concentración (1 µM).

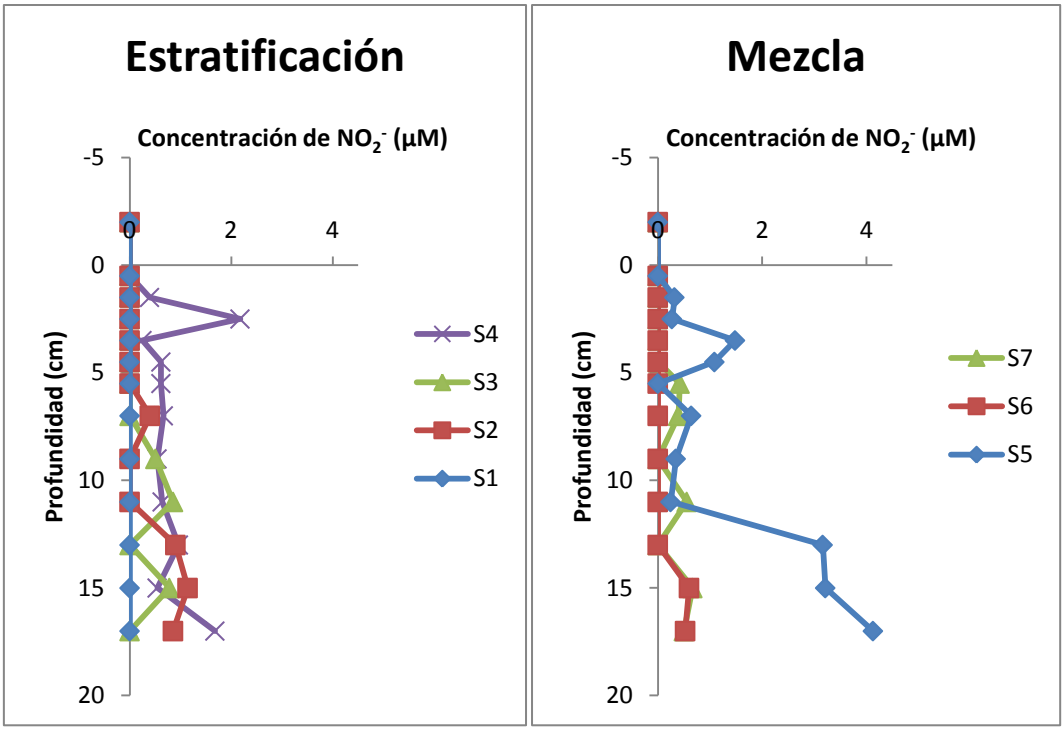


Figura 8: Perfil vertical de la concentración de NO_2^- en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla.

3.5. Amonio

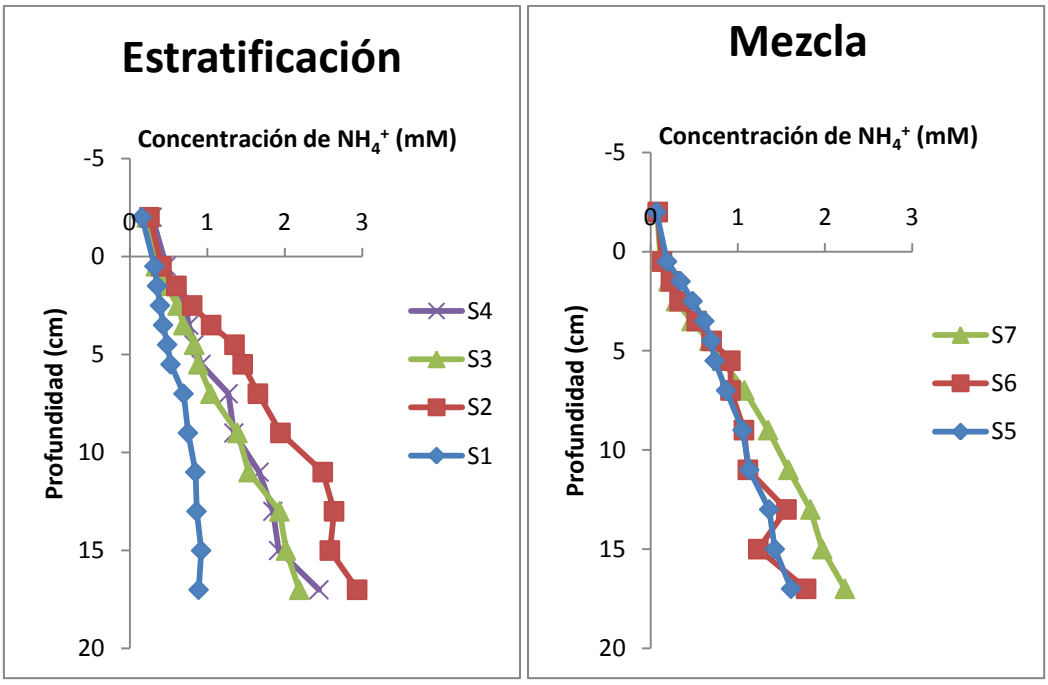


Figura 9: Perfil vertical de la concentración de NH_4^+ en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla.

El Amonio tendió a aumentar en profundidad en ambas estaciones (Fig. 9). El rango de concentraciones fue algo mayor durante la estratificación (0.16 - 2.94 µM) que en mezcla (0.07 - 2.23 mM).

3.6. Nitrógeno orgánico disuelto

El Nitrógeno orgánico disuelto presentó un incremento en profundidad en ambas estaciones (Fig. 10). Sus concentraciones fueron más variables en estratificación (0 - 1.07 mM) que en mezcla (0 - 0.84 mM).

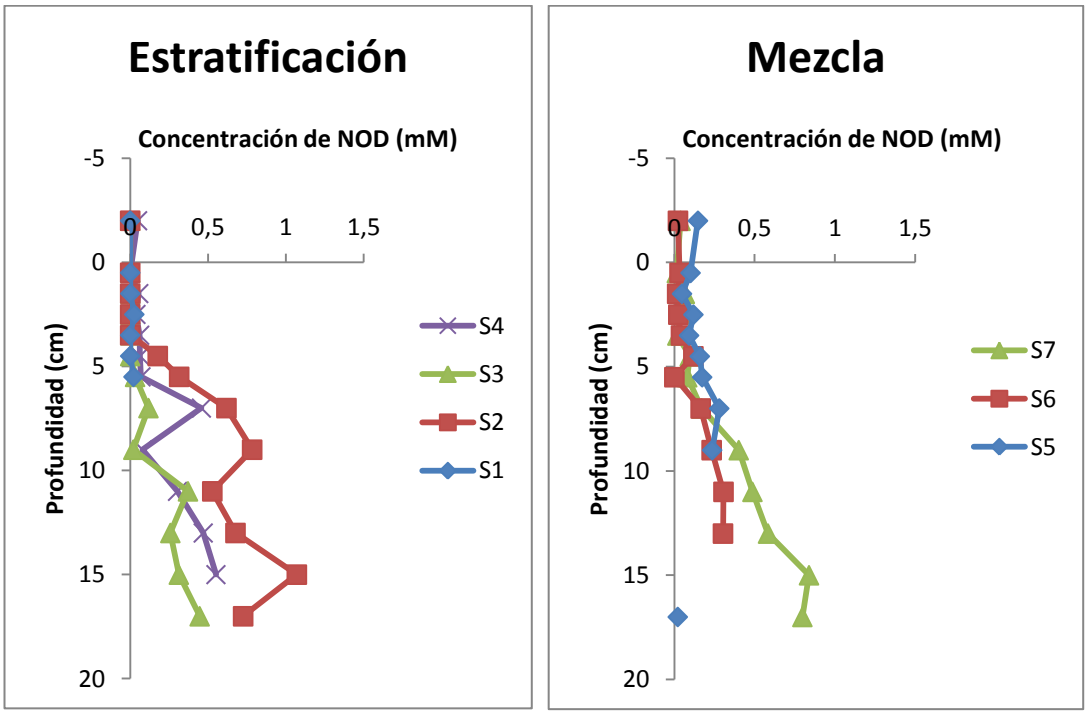


Figura 10: Perfil vertical de la concentración de NOD en el agua intersticial durante los períodos de estratificación y mezcla. Los valores no representados no pudieron ser medidos.

3.7. Comparación cuantitativa de los constituyentes del nitrógeno total disuelto

El amonio fue la forma de N más abundante en el agua intersticial, representando siempre un % alto (31.04 - 100.00 %) del NTD (Fig. 11). La contribución conjunta de nitrito y nitrato en ningún caso superó el 15 %, siendo generalmente menor al 10 %

(Fig. 12), mientras que el % de NOD normalmente se mantuvo por debajo del 30 % (Fig. 13).

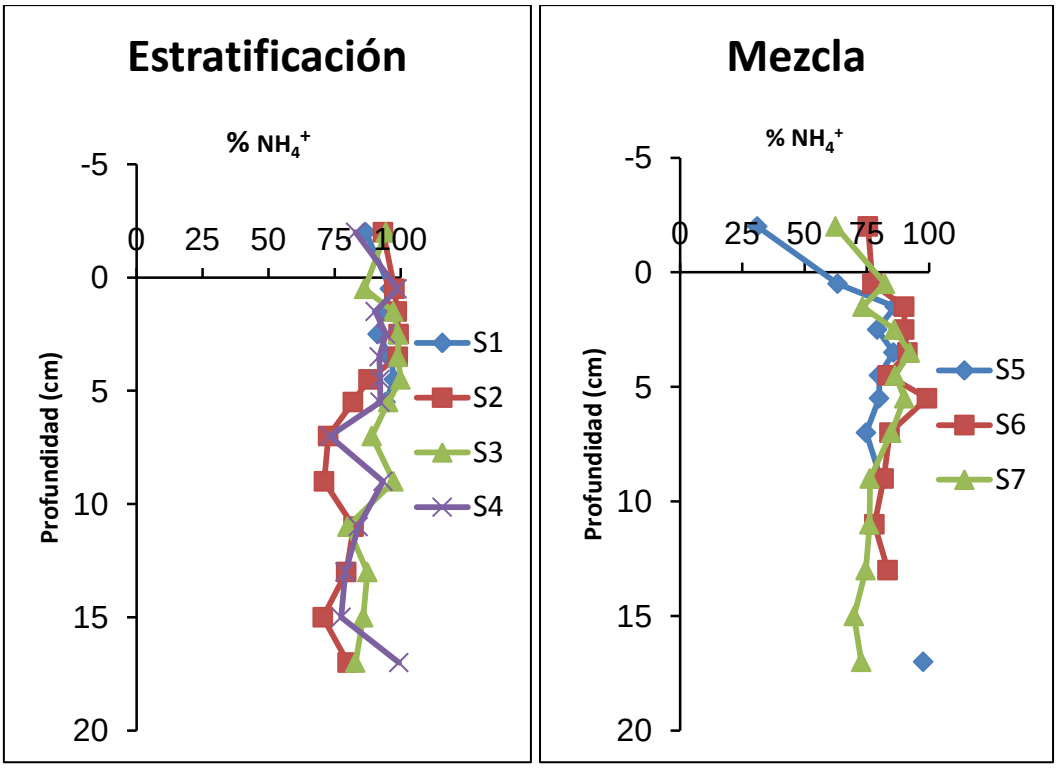


Figura 11: Porcentaje del amonio medido en el agua intersticial respecto al nitrógeno total disuelto durante los períodos de estratificación y mezcla.

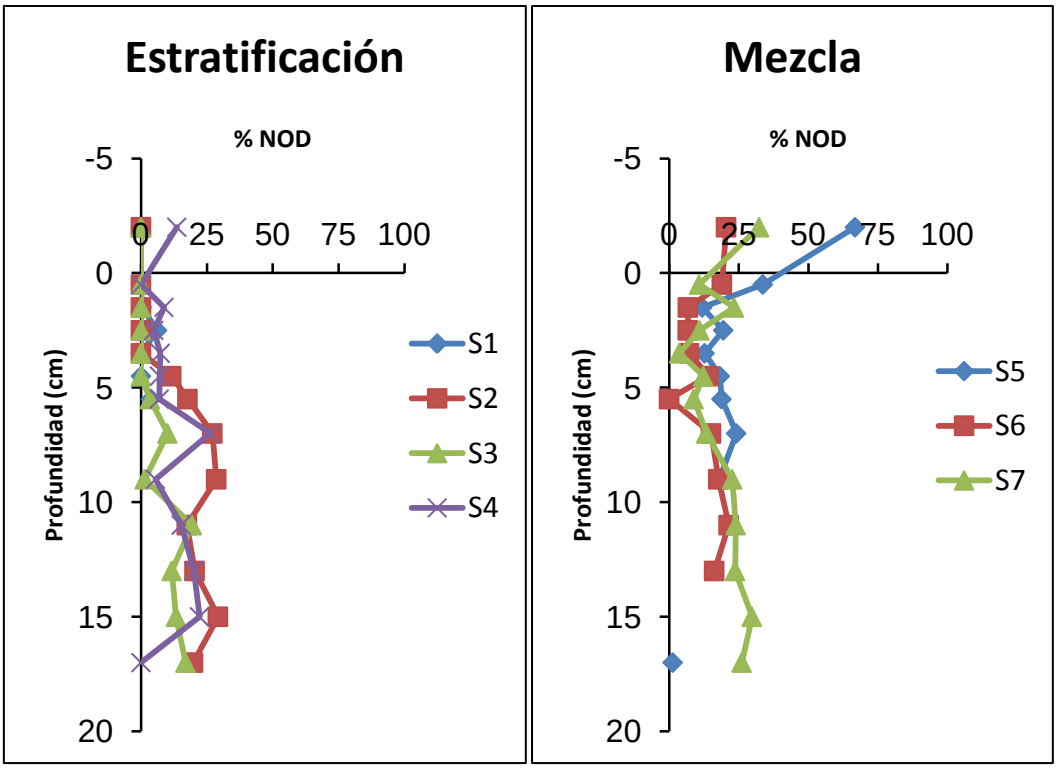


Figura 12: Porcentaje del NOD medido en el agua intersticial respecto al nitrógeno total disuelto durante los períodos de estratificación y mezcla.

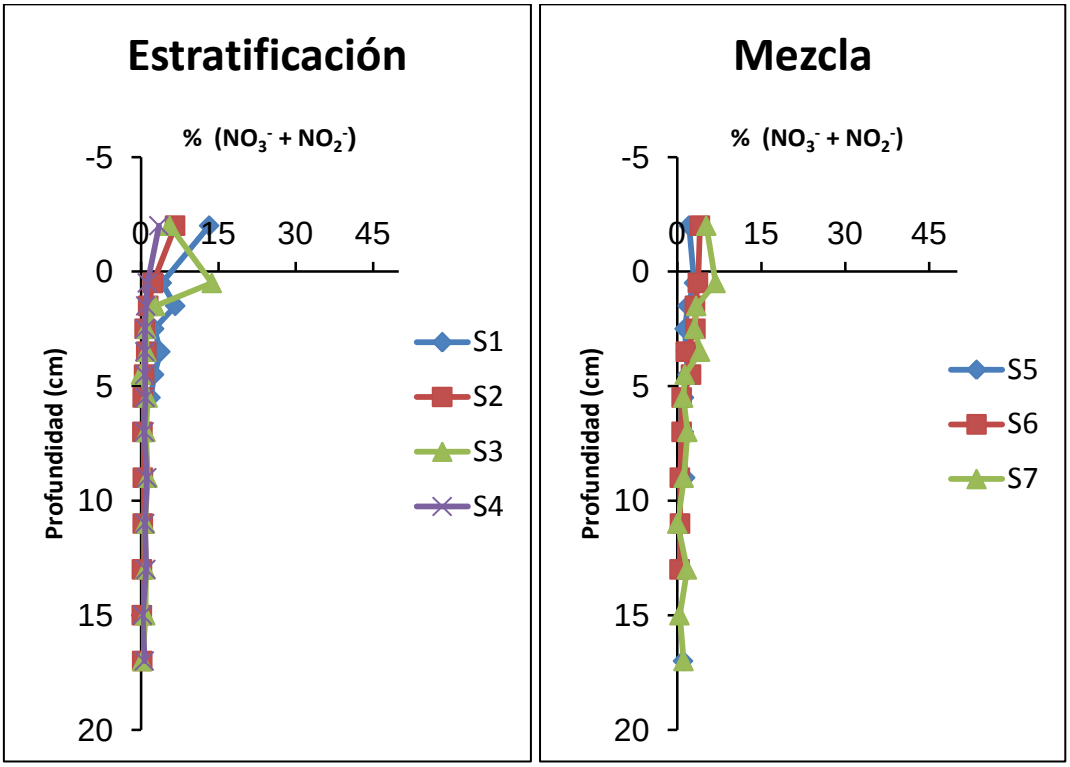


Figura 13: Porcentaje de la suma de nitrato y nitrito medido en el agua intersticial respecto al nitrógeno total disuelto durante los períodos de estratificación y mezcla.

4. DISCUSIÓN

4.1. Distribuciones verticales de nutrientes en el sedimento

Los testigos de sedimentos analizados en el presente Trabajo fueron extraídos de la zona más profunda del embalse, situados siempre a una profundidad superior a la profundidad de penetración de la luz. Por tanto, dichos testigos no presentan actividad fotosintética y la entrada de MO que reciben es únicamente la debida a sedimentación de partículas desde la columna de agua o a intercambios difusivos de MO disuelta a través de la interfase sedimento-agua. La MO particulada y la MO disuelta pueden ser autóctona, producidas por la actividad fotosintética y el crecimiento del fitoplancton en la capa fótica del embalse, o alóctonas, la MO detrítica que es recibida por el embalse desde el medio terrestre que le circunda, incluido el aporte debido al río Meca. El análisis estequiométrico de la MO del sedimento del embalse de El Sancho mostró un índice C:N en torno a 10, sugiriendo que la mayor parte de esta MO es de origen autóctono debido a la producción primaria del fitoplancton del embalse (Torres et al. 2014, Corzo et al in prep.).

Dado que la MO ingresa al sedimento por sedimentación a partir de la columna de agua y se descompone progresivamente en este, los perfiles verticales de carbono orgánico total y nitrógeno orgánico total suelen mostrar un descenso exponencial de ambos al aumentar la profundidad en el sedimento (Canfield et al., 2005; Torres et al., 2014). A medida que se profundiza en el sedimento la MO es más antigua, donde quedan únicamente los compuestos más refractarios al ataque microbiano y por tanto disminuye notablemente la tasa de mineralización y en consecuencia la liberación de compuestos al agua intersticial, dando lugar a perfiles verticales donde la concentración cambia ya poco en profundidad. Esto se puede observar claramente en los perfiles verticales de COD, NTD, NH_4^+ y NOD a partir de los 10 cm de profundidad (Figs. 5, 6, 9 y 10). En cambio, la MO que se encuentra en la capa superior de sedimento es aquella recién sedimentada y por tanto es mucho más lábil, presenta una alta tasa de mineralización y libera gran cantidad de compuestos al agua intersticial del sedimento, haciendo que sus perfiles de concentraciones varíen muy rápidamente con la profundidad. Este efecto se observa muy claramente en los primeros 5 cm en los perfiles de las mismas substancias anteriormente mencionadas (Figs. 5, 6, 9 y 10). La forma convexa de los perfiles de COD, NTD, NH_4^+ y NOD indica que existe un flujo difusivo

neto desde el sedimento a la columna de agua en ambas fases del ciclo anual (Shulz, 2000). El proceso de hidrólisis microbiana extracelular de las partículas detríticas, además de producir CO_2 (no mediado en este trabajo), libera COD, NOD y NH_4^+ al agua intersticial aumentando mucho las concentraciones de estas sustancias en ella, de modo que difunden desde el sedimento a la columna de agua donde sus concentraciones fueron más bajas (Figs. 5, 6, 9 y 10).

La disponibilidad de oxígeno en la interfase sedimento-agua es un factor muy determinante de cual o cuales serán las rutas metabólicas microbianas predominantes en la mineralización de la MO y por tanto también de la tasa a la que ésta sucede. El oxígeno es consumido en la primera capa del sedimento, aquella en la que se incorpora la MO recién sedimentada (Fig. 14). En la fase de mezcla la columna de agua es óxica y el oxígeno penetró en el sedimento hasta los 5 o 6 mm de profundidad. De cualquier modo, durante la fase de estratificación la penetración del oxígeno disminuyó considerablemente debido a una menor disponibilidad en la columna de agua, donde existían condiciones anóxicas o al menos hipóxicas en el hipolimnion como consecuencia de la termoclina y probablemente como resultado del mayor aporte de MO al sedimento, debido a una mayor tasa de producción primaria en primavera y verano. Esta diferencia en la disponibilidad de oxígeno en el sedimento condiciona considerablemente el tipo de procesos metabólicos microbianos responsables de la degradación de la MO detrítica que se incorpora al sedimento.

Cuando la MO se descompone en condiciones anaerobias, el amonio producido mediante la amonificación a partir de los radicales amina de los aminoácidos tiende a acumularse en el medio debido a que el proceso de oxidación de amonio a nitrito y nitrato mediante la nitrificación no puede darse ya que las bacterias nitrificantes son quimiolitótrofos que usan el oxígeno para oxidar el amonio (Jorgensen 2000, Canfield2005). Sin embargo, en ambientes ácidos la nitrificación oxigénica está inhibida (Wetzel, 2001), por tanto el menor % de amonio del NTD en la capa superior del sedimento en mezcla (Fig. 11) es probablemente el resultado de una menor tasa de amonificación y puede ser la razón por la que se acumule el NOD en mayor medida durante este período (Fig. 12).

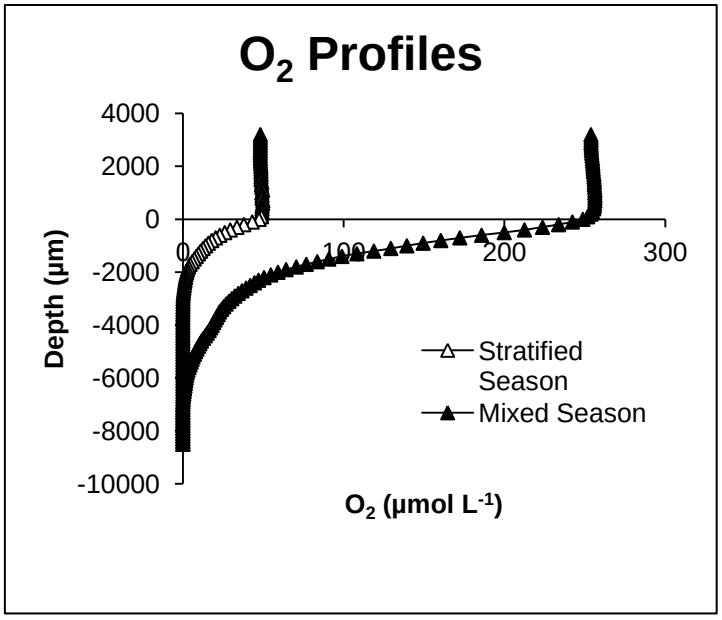


Figura 14: Concentraciones medias de oxígeno en la interfase sedimento-agua durante las fases de mezcla y estratificación del embalse (datos proporcionados por J. Bohórquez).

El nitrito en el sedimento fue inexistente o fue encontrado a concentraciones muy bajas (< 4.5 µM) (Fig. 8). Habitualmente la interpretación de los cambios en las concentraciones de nitrito no resulta una labor fácil debido a que es un compuesto intermedio durante los procesos de nitrificación u oxidación del amonio a nitrato en ambientes óxicos y anammox u oxidación anaerobia del amonio a nitrato en ambientes anóxicos, en los que es producido antes de transformase en nitrato. De la misma manera, es consumido en la reducción no asimilatoria de nitrato a amonio, previamente a convertirse en amonio (Behrendt, 2010; Thamdrup, 2011; Madigan et al., 2012; Robertson y Groffman, 2015). Tales procesos pueden explicar las bajas concentraciones medidas.

La presencia de nitrato en capas profundas del sedimento, muy por debajo de profundidad máxima de penetración del oxígeno tanto en mezcla como en estratificación, es un resultado sorprendente de este estudio y puede ser una característica especifica de sedimentos de medios ácidos (Fig. 7). En sedimentos lacustres de lagos neutros y en sedimentos marinos no se suele encontrar nitrato en la zona anóxica, fuertemente reducida, debido a que la nitrificación esta inhibida y el poco nitrato disponible se emplea como aceptor de electrones en la oxidación anaeróbica de la MO durante el proceso de reducción disimilatoria de nitrato y/o la desnitrificación

(Shulz, 2000; Jorgensen, 2000; Canfield et al., 2005; Garcia-Robledo et al., 2010). La presencia de nitrato en capas profundas del sedimento en El Sancho puede ser debido a un proceso poco conocido que produce una nitrificación anaerobia, mediante la cual el amonio es oxidado gracias a la reducción de hierro (III) (Yang et al., 2012; Clément et al., 2005) Es un proceso mediado por microorganismos descrito en medios ácidos, respecto al que existen experimentos que ponen de manifiesto una posible liberación de nitrato desde el sedimento en ausencia de oxígeno (Huang & Jaffé, 2015). Por otra parte, la presencia de nitrato en zonas profundas del sedimento puede deberse a la difusión desde la capa superior óxica y a una inhibición de la reducción disimilatoria de nitrato y/o la desnitrificación en medios ácidos. Igualmente, aunque improbable, cabe la posibilidad de que la manipulación de las muestras pueda haber provocado la oxidación del amonio del agua intersticial, dando lugar a mayores concentraciones de nitrato de las que poseía originalmente el sedimento. Este es, por tanto, un tema relevante que debe ser clarificado en estudios posteriores.

4.2. Comparación de los perfiles de concentración en el sedimento en estratificación y mezcla

Los perfiles verticales de los diferentes nutrientes intersticiales analizados son prácticamente idénticos en ambas estaciones (Figs. 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Las pequeñas diferencias encontradas en profundidad entre los diferentes testigos se deben probablemente a la variabilidad espacial que hay dentro del embalse y no a una componente estacional. Por tanto, para poder estudiar mejor las diferencias entre los periodos de estratificación y mezcla la discusión se ha centrado únicamente en la parte superficial del sedimento. Previamente ha sido puntualizado que los primeros 5-6 cm de sedimento corresponden a la zona más activa diagenéticamente. Por ello, los cambios biogeoquímicos asociados a las condiciones rédox en la columna de agua quedarán reflejados en esta parte activa del sedimento y/o en el agua sobrenadante. Para ello, las concentraciones de los diferentes nutrientes analizados han sido integradas en profundidad para los primeros 5 cm utilizando la porosidad de cada capa para pasar de $molcm^{-3}$ de agua intersticial a $molcm^{-2}$ de sedimento. Además, como la profundidad máxima de penetración del O_2 no llega al primer cm en condiciones óxicas (Fig. 12) se ha comparado también las concentraciones medidas en la primera capa del

sedimento y en el agua sobrenadante de cada testigo.

Tabla 2: Concentraciones de las diferentes variables medidas en ambos períodos: concentraciones integradas, en la columna de agua y en la primera capa de sedimento. Las concentraciones resaltadas en negrita se consideran significativamente distintas en estratificación y mezcla.

	Concentraciones integradas (mmol/cm2)				Columna de agua (-2 cm)				Primera capa de sedimento (0.5 cm)			
	Estratificación		Mezcla		Estratificación		Mezcla		Estratificación		Mezcla	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
COD	**48,103**	15,083	**26,616**	4,037	0,460	0,069	0,360	0,190	**0,805**	0,161	**0,387**	0,152
NTD	14,387	2,226	10,729	1,189	0,245	0,039	0,150	0,035	0,363	0,035	0,203	0,049
NO_3^-	0,243	0,053	0,251	0,016	**15,487**	2,066	**5,122**	0,562	17,062	8,182	8,337	1,022
NO_2^-	0,004	0,004	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
NH_4^+	**14,136**	2,083	**8,993**	0,780	**0,231**	0,028	**0,075**	0,004	**0,385**	2,083	**0,146**	0,023
NOD	**0,468**	0,238	**1,480**	0,432	0,012	0,012	0,069	0,039	0,000	0,000	0,049	0,026

Las concentraciones integradas de COD y NH_4^+ fueron mayores en estratificación mientras que para el NOD fue mayor en mezcla. Estas diferencias estacionales también fueron apreciables para las concentraciones de COD y NH_4^+ del primer centímetro de sedimento, y el NH_4^+ de la columna de agua. En cuanto al nitrito y al nitrato, solo hubo diferencias significativas en los valores de concentración de nitrato en la columna de agua donde su concentración fue mayor en estratificación que en mezcla (Tabla 2). Los valores más altos de COD y NH_4^+ en estratificación podrían indicar una mayor mineralización de la MO en el sedimento y/o una intensificación de la amonificación durante este periodo. Por otro lado, los porcentajes de las diferentes especies de nitrógeno en la columna de agua en el primer cm de profundidad de la misma forma variaron según el periodo (Figs. 11 y 13). En estratificación, el 85-100% del nitrógeno disuelto correspondía a NH_4^+ y el resto a nitrato. Por el contrario, el NOD alcanzó valores entre el 20-60% en la columna de agua y se redujo el % de amonio y nitrato (Figs. 11, 12 y 13). La menor amonificación bajo condiciones óxicas podría ser también responsable de la acumulación de NOD en la columna de agua y el sedimento, dado que el COD no tiene el mismo comportamiento. Finalmente, la mayor cantidad de nitrato en la columna de agua durante la estratificación puede indicar una mayor liberación de nitrato desde el sedimento. Experimentos previos realizados por el grupo de Ecología Microbiana y Biogeoquímica de la UCA indican que el nitrato en El Sancho se acumula en la columna de agua durante condiciones hipóxicas reflejando la

posible importancia de la nitrificación anoxigénica con Fe(III) para este sistema (Corzo et al in prep.).

4.3. Acoplamiento bentónico-pelágico

El análisis de los perfiles de nutrientes intersticiales en el sedimento puede ser utilizado para la cuantificación de los flujos difusivos entre el sedimento y la columna de agua (Shulz, 2000). La evaluación cuantitativa de los perfiles se lleva a cabo mediante la aplicación de la primera ley de Fick (1855) bajo la asunción de condiciones de estado estacionario. De acuerdo a esta ley, el flujo difusivo (J) es directamente proporcional al gradiente de concentraciones ($\delta C/ \delta x$):

$$J = - D^0 \cdot (\delta C/\delta x)$$

, donde Dº es el coeficiente de difusión de la substancia que depende de la temperatura y la salinidad. El flujo difusivo en el sedimento (J_{sed}) depende además de la porosidad (ϕ) y el coeficiente de difusión en el agua intersticial (D_{sed}):

$$J_{sed} = - \phi \cdot D_{sed} \cdot (\delta C/ \delta x)$$

Anteriormente ha sido indicado que la forma convexa de los perfiles de COD, NOD, NH_4^+ y NTD indican un flujo neto hacia la columna de agua (Figs. 5, 6, 9 y 10). Dado que la concentración de COD y NH_4^+ aumenta de forma lineal con la profundidad en los primeros 5 cm de sedimento ($r^2 > 0.85$) es posible calcular el flujo de estas dos sustancias hacia la columna a partir del valor de la pendiente en este intervalo y aplicando la ecuación de Fick. El coeficiente de difusión utilizado para el amonio fue de $1.49 \cdot 10^{-9}$ m^2s^{-1} para una temperatura de 13ºC y una salinidad nula. Para el caso del COD, se empleó el coeficiente de difusión del acetato, cuyo valor es de $7.99 \cdot 10^{-10}$ m^2s^{-1}. La porosidad del sedimento disminuye con la profundidad, por lo que fue escogido el valor promedio en los primeros 5 cm (0.91 y 0.87 para estratificación y mezcla, respectivamente). El flujo de NH_4^+ y COD desde el sedimento hacia la columna de agua fue calculado para los períodos de estratificación y mezcla por separado y expresado en unidades de $mmolm^{-2}d^{-1}$ (Fig. 15). Se apreció que los flujos bentónicos fueron similares para estas especies en ambas estaciones. El flujo obtenido para NH_4^+ tenía un valor promedio de 1.45 $mmolm^{-2}d^{-1}$ mientras que para COD varió entre 1-4

$mmolm^{-2}d^{-1}$. La mayor variación en los flujos bentónicos de COD (especialmente en mezcla) puede deberse a la mayor variabilidad en los perfiles de COD.

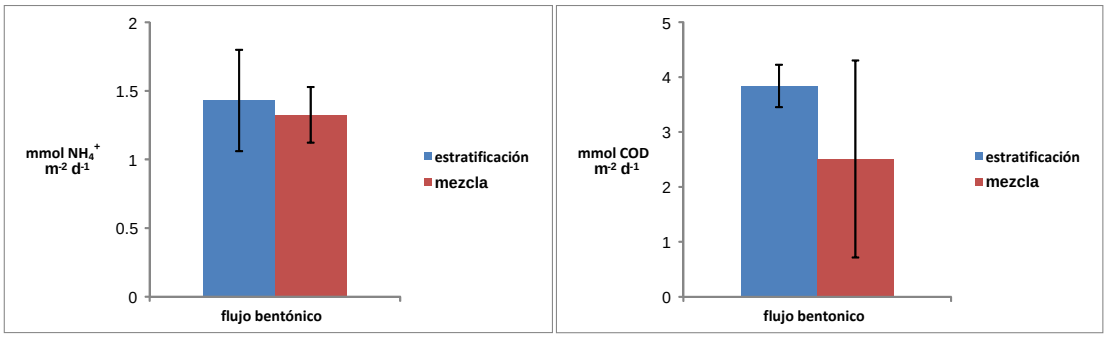


Figura 25: Flujos bentónicos de NH_4^+ y COD durante los períodos de estratificación y mezcla.

Por otra parte, en este estudio se fondearon trampas de sedimentación durante los periodos de estratificación y mezcla. Las trampas se mantuvieron colocadas a diferentes profundidades y permanecieron fondeadas un mes. La comparación de los flujos bentónicos de NH_4^+ y COD con el C y N particulado recogido de aquellas trampas situadas más cerca del sedimento ofrece la posibilidad de estimar la cantidad de C y N que es remineralizado en el sedimento y devuelto a la columna de agua.

La tasa de remineralización fue calculada como:

(Flujo bentónico de NH_4^+ (ó COD) / Cantidad de N (o C) particulado recogido en las trampas) x 100

El % de remineralización fue mayor en estratificación que en mezcla tanto para C como para N. Durante el periodo de mezcla, el 81% del N del sedimento es mineralizado a NH_4^+, mientras que un 12% del C es devuelto como COD. En estratificación, alrededor de 70-120 % del N particulado es devuelto en la forma de NH_4^+, lo que es interpretable como una mineralización prácticamente completa del material que sedimenta en verano e incluso del enterrado de la fase de mezcla. Para esta estación, el % de C mineralizado a COD también es bajo, presentando únicamente un 25%. Debido a que una parte muy importante del C particulado se mineraliza en forma de CO_2 y CH_4 (Canfield et al., 2005), es probable que el C sedimentado haya sido mineralizado a formas inorgánicas de C en mayor % que para COD. En términos cuantitativos, la remineralización

bentónica puede llegar a suponer un aporte importante de nutrientes a la columna de agua.

5. CONCLUSIÓN

1. Las concentraciones de COD, NOD y de distintas especies de N inorgánico disuelto como NO_3^-, NO_2^- y NH_4^+ en el agua intersticial del sedimento fueron en general superiores a las de la columna de agua, excepto para el nitrato en estratificación. Además, los perfiles verticales muestran en general un incremento con la profundidad en el sedimento que tendió a asintotizarse hacia los 15 cm de profundidad.

2. Los cambios estacionales fueron evidentes, tanto en las concentraciones de los distintos compuestos en el agua del fondo del embalse, como en sus concentraciones en el agua intersticial del sedimento. En general, las concentraciones de COD, NOD, NO_3^- y NH_4^+ fueron mayores en estratificación principalmente debido a un mayor aporte de MO al sedimento y una probable y consecuentemente mayor tasa de mineralización.

3. La elevada concentración de NO_3^- encontrada en las capas anóxicas del sedimento podría indicar la importancia en este tipo de ambientes de un proceso microbiano novedoso como es la nitrificación anaeróbica con Fe(III) como aceptor terminal de electrones.

4. La forma convexa de los perfiles sugiere un flujo del sedimento a la columna de agua en la mayoría de los casos. El flujo bentónico de NH_4^+ y COD supone un porcentaje importante de la remineralización de N y C del embalse tanto durante el período de estratificación como el de mezcla.

REFERENCIAS

Agencia EFE (2014), "Embalse El Sancho (Huelva), un laboratorio de contaminación de ácido de minas" en La Vanguardia Andalucía [En Línea], disponible en: http://www.lavanguardia.com/local/sevilla/20140618/54410082994/embalse-el-sancho-huelva-un-laboratorio-de-contaminacion-de-acido-de-minas.html [Accedido el 1 de marzo de 2015]

Amaral Zettler, L.A., Messerli, M.A., Laatsch, A.D., et al. (2003). "From genes to genomes: beyond biodiversity in Spain's Rio Tinto", en *Biol. Bull;*204, pp. 205–209.

Aquatic Biotechnology, (2014). *Estudio de los períodos de estratificación y mezcla en el embalse del Sancho (Gibraleón, Huelva) y en el embalse del Olivargas (Almonaster La Real, Huelva).*

Asta, M.P.; Calleja, M.L.; Pérez-López, R.; et al. (2015). "Major hydrogeochemical processes in an Acid Mine Drainage affected estuary", en *Marine pollution bulletin;* 91:1, pp. 295-305.

Behrendt, U.; Schumann, P.; Stieglmeier, M. et al. (2010). "Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity - Description of Paenibacillus uliginis sp nov., an inhabitant of fen peat soil and Paenibacillus purispatii sp nov., isolated from a spacecraft assembly clean room", en *Systematic and applied microbiology;* 33:6 , pp. 328-336.

Blodau, C., Peine, A., Hoffmann, S., et al. (2000) "Organic Matter Diagenesis in Acidic Mine Lakes", en *Acta hydrochim. hydrobiol.* 28: 3, pp. 123 - 135.

Canfield, D.E., Thamdrup, B. y Kristensesn E. (2005) *Aquatic Geomicrobiology*. Advances in Marine Biology. Volume 48. San Diego, Elsevier Academic Press.

Cánovas C.R., Olias M., Nieto J.M., et al. (2007) "Hydrogeochemical characteristics of the Odiel and Tinto rivers (SW Spain). Factors controlling metal contents", en *Science of the Total Environment,* 373, pp. 363-382.

Clément J-C., Shrestha J., Ehrenfeld J.G., Jaffé P.R. (2005) "Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils", en *Soil Biol Biochem.* 37, pp. 2323–2328. doi: 10.1016/j.soilbio.2005.03.027

Derham, T. (2004). *Biological communities and water quality in acidic mine lakes.* Tesis de grado. Australia, The university of Western Australia.

Fields, L.; Nixon, S. W.; Oviatt, C.; et al. (2013) "Benthic metabolism and nutrient regeneration in hydrographically different regions on the inner continental shelf of Southern New England", en *Estuarine coastal and shelf science*, 148, pp. 14-26.

Galván, L.; Olías, M.; Nieto, J.M. (2007) "Determinación de la carga contaminante disuelta transportada por el río Meca (Huelva, España)" en *Geogaceta*. Número 42. 2007, pp. 63-66.

Geller, W.; Klapper, H.; Schultze, M. (1998) "Natural and Anthropogenic Sulfuric Acidification of Lakes" en Geller, W.; Klapper, H.; Salomons, W. et al. (eds.); *Environmental Science*. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin.

González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., et al. (2003) "Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River", en *Appl. Environ. Microbiol.;* 6, pp. 4853–4865.

Huang S., Jaffé P.R. (2015) "Characterization of incubation experiments and development of an enrichment culture capable of ammonium oxidation under iron reducing conditions", en *Biogeosciences*. 12, pp. 769–779. doi: 10.5194/bgd-11-12295-2014

Jorgensen, B.B. (2006) "Bacteria and Marine Biogeochemistry" en Schulz, H. D. y Zabel, M. (eds.), *Marine Geochemistry.* Segunda edición. Nueva York, Springer.

Koschorreck, M.; Kleeber, A.; Herzsprung, P., et al. (2007) "Effects of benthic filamentous algae on the sediment-water interface in an acidic mining lake", en *Hydrobiología*; 592, pp. 387-397.

Lenhard, G.; Ross; W.R., y A. du Plooy (1962). "A study of methods for the classification of bottom deposits of natural waters", en *Hydrobiologia;* 20, pp. 223-240.

López-Archilla, A.I. y Amils, R. (1999). "A comparative ecological study of two acidic rivers in southwestern Spain", en *Microbial Ecol.;* 38, pp. 146–156.

López-Archilla, A.I.; Marín, I., y Amils, R. (2001). "Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto river, Spain.", en *Microbial Ecol. ;* 41 (1), pp. 20–35.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A., et al. (2012). *Brock Biology of Microorganisms.* Benjamin Cummings, Decimotercerca edición.

Margalef, R. (1983). *Limnología*. Omega. 1010 pp.

Olías, M., Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., et al. (2004) "Seasonal water quality variations in a river affected by acid mine drainage: The Odiel river (south west Spain)", en *Science of the Total Environment*; 333, pp. 267-281.

Oshiki et al. (2013). "Nitrate-Dependent Ferrous Iron Oxidation by Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) Bacteria", en *Applied and Environmental Microbiology.* Volumen 79, Número 13. Julio 2013.

Robertson, G.P. y Groffman, P.M. (2015) "Nitrogen Transformations", cuarta edición, en Fort Collins, Paul A. (ed.), *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press.

Sánchez-España, J., Reyes, J., Martín Rubí, J.A. (2005) "The natural attenuation of two acidic effluents in Tharsis and La Zarza-Perrunal mines (Iberian Pyrite Belt, Spain)", en *Environmental Geology*; 49, pp. 253-266.

Schulz, H.D. (2000) "Quantification of early diagenesis, dissolved constituents in Marine pore water", en Shulz, H. D. and Zabel, M. (eds.), *Marine Geochemistry*. Springer.

Sipler, R.E., y Bronk, D.A. (2015). *Dynamics of Dissolved Organic Nitrogen.* Virginia Institute of Marine Science, College of William & Mary, Virginia, USA.

Smith, M.S., Firestone, M.K. y Tiedje, J.M. (1978). "Acetylene inhibition method for shortterm measurement of soil denitrification and its evaluation using N-13", en *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42 (4), pp. 611–615.

Thamdrup, B. (2011) "New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle", en *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 43, 120913143848009. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048

Torres, E., Ayora, C., Jiménez-Arias, J. L., García-Robledo, E., Papaspyrou, S., Corzo, A. (2014). "Benthic metal fluxes and sediment diagenesis in a water reservoir affected by acid mine drainage: a laboratory experiment and reactive transport modeling", en *Geochem. Cosmochem.* Acta. 139, pp. 344-361.

Vallentyne, J.R. (1978) . *Introducción a la limnología: los lagos y el hombre*. Omega. 180 pp.

Wetzel, R.G. (2001). *Limnology. Lake and river ecosystems.* 3ª edición. Academic Press.

Yang, W.H.; Weber, K.a.; Silver W.L. (2012) "Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction", en *Nat Geosci.* 5, pp. 538–541. doi: 10.1038/ngeo1530