

# PAPEL DE LAS DIATOMEAS COMO INDICADORES DEL GRADO DE AFECCIÓN DE EMBALSES RECEPTORES DE AMD: INFLUENCIA DEL PH EN EL MODO DE OCURRENCIA

G. Rivera, María José<sup>a</sup>, Grande, José Antonio<sup>a</sup>, de la Torre, María Luisa<sup>a</sup>, Valente, Teresa<sup>b</sup>, Almeida, Salomé F.P.<sup>c</sup>, Delgado Cristina<sup>c</sup>, Santisteban, María<sup>a</sup>, Barrio-Parra, Fernando<sup>d</sup>, Izquierdo, Miguel<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad de Huelva. Campus La Rábida. Ctra. Palos de la Frontera s/n. 21819. Palos de la Frontera. Huelva. Email:grangil@uhu.es

<sup>b</sup> ICT, Institute of Earth Sciences, Pole of University of Minho, Campus de Guadaltar, 4710-057 Braga, Portugal.

<sup>c</sup> Departamento de Biología e GEOBIOTEC, Universidade de Aveiro 3810-193 Aveiro, Portugal.

<sup>d</sup> Laboratorio de Investigación e Ingeniería Geoquímica Ambiental (LI2GA). Universidad Politécnica de Madrid. c/Alenza 4. 28003. Madrid.

## RESUMEN

Este trabajo se basa en el estudio de 23 embalses ubicados en la Faja Pirítica Ibérica para llevar a cabo una clasificación ambiental basada en las comunidades de Diatomeas, con especial interés en aquellas acidófilas o ácido tolerantes, para definir la relación de estas comunidades con la físico-química de las aguas. Para ello, la distribución de diatomeas bentónicas se ha caracterizado, en particular en relación con el pH del medio, que ha permitido entender el papel de las diatomeas como indicadores de AMD en los embalses.

Los resultados obtenidos confirmaron que las comunidades de diatomeas responden a variaciones en el pH y que el análisis cluster refleja los cambios en las comunidades de los embalses. Se verificó una relación de dependencia entre la abundancia y la distribución de las especies en relación con el pH del agua.

Palabras clave: Drenaje ácido de mina, Diatomeas, Acidófilos, Faja Pirítica Ibérica.

## ABSTRACT

Twenty three reservoirs located in the Iberian Pyrite Belt were studied in order to carry out an environmental assessment based on the communities of Diatoms, with special interest in those that present an acidophilic or acid-tolerant profile and to define the relation of these communities with the physical-chemical characteristics of the water. For this purpose, the distribution of benthic diatoms has been studied, in particular in relation to the pH of the medium, which has allowed

understanding the role of diatoms as indicators of AMD in the reservoirs.

The obtained results confirmed that the diatom communities respond to variations in pH and that the cluster analysis reflects those changes in the communities of the reservoirs. A relationship of dependence between the abundance and distribution of the species under study with respect to the pH of the water was verified.

## 1. INTRODUCCIÓN

El principal problema de las explotaciones mineras de sulfuros es la contaminación de los recursos hídricos por procesos de Drenaje Ácido de Mina (AMD). De todas las causas de contaminación de los cursos fluviales, quizás el Drenaje Ácido de Mina, sea una de las más graves.

El AMD se origina cuando un mineral sulfurado entra en contacto con el oxígeno y la humedad atmosférica (Grande et al., 2000). Desde el punto de vista ecológico, el Drenaje Ácido de Mina define ambientes extremos, con valores de pH muy bajo, alta solubilidad de metales y presencia de coloides de hierro, provocando la turbidez del agua y la deficiencia en carbono y fósforo inorgá-

nico, y contribuyendo a diversas condiciones de estrés. La influencia de estas condiciones en la disminución de la diversidad biológica está ampliamente documentada. El medio AMD tiene la estructura de un ecosistema simple, dominado por organismos acidófilos y ácido-tolerantes. Estos organismos, tanto procariotas como eucariotas, juegan un papel importante, asegurando la producción primaria e interfiriendo en la movilidad de las especies químicas disueltas en el medio acuático (Valente y Gomes, 2007). La Directiva Marco del agua, 2000/60/CE (European Union, 2000) propone el uso de las diatomeas como componente del fitobentos, y como indicador del estado ecológico de las aguas superficiales. Desde una perspectiva de monitoreo, las comunidades de diato-

## SESIÓN 2. HIDROGEOQUÍMICA Y GEOQUÍMICA

Papel de las diatomeas como indicadores del grado de afección de embalses receptores de AMD: Influencia del pH en el modo de ocurrencia

meas están entre los indicadores ecológicos más efectivos de las condiciones de AMD. Se ha escrito mucho acerca de cómo las taxocenosis de diatomeas pueden indicar una perturbación por AMD (Sabater, 2000; Sabater et al., 2003; Falkenhayn, 2007; Chen et al., 2013; Luís et al., 2013). Las diatomeas han demostrado ser buenas indicadoras de cambios en salinidad, nutrientes y pH, y por este motivo se siguen utilizando para evaluar diferentes situaciones de acidificación (Delgado, 2006; Bao et al., 2007; Zalack et al., 2010). Este trabajo se centra en el estudio de los embalses afectados por AMD de la Faja Pirítica Ibérica (FPI) con el fin de realizar una clasificación ambiental basada en las comunidades de estas microalgas, con especial interés en las que presentan un carácter acidófilo o ácidos-tolerante y definir la relación de estas comunidades con la físico-química de las aguas. Para ello se ha caracterizado la distribución de las diatomeas bentónicas, en concreto en relación con el pH del medio, lo que nos ha permitido comprender el papel de las diatomeas como indicadores de afección por AMD en los embalses.

### 2. MATERIALES Y MÉTODO

Una vez definido el objetivo principal, se llevó a cabo una exhaustiva revisión de antecedentes y posteriormente se diseñó una red de muestreo consistente en 23 puntos a la entrada de agua en los embalses afectados por AMD, pertenecientes a las cuencas de los ríos Chanza, Odiel, Tinto y Guadamar, es decir, en aquella zona que se encuentra cubierta por las aguas en época de medida.

El muestreo de diatomeas se puede realizar en cualquier época del año, aunque en invierno no es recomendable debido a que la tasa de crecimiento celular en esta época es menor, lo que puede traducirse en respuestas de menor magnitud a las condiciones ambientales. Una muestra de diatomeas debe ser siempre realizada en periodos de caudal constante, nunca después de lluvias fuertes que provoque una elevada turbidez del agua o perturbación de la comunidad. Por este motivo, y aunque se trata de aguas embalsadas, se estableció el comienzo de primavera como periodo preferente en el año hidrológico 2011/2012. En la tabla 1 se puede observar la localización de cada uno de los 23 pun-

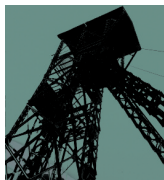
tos de muestreo seleccionados y el valor medio del pH que caracteriza cada uno.

La toma de muestras de diatomeas, se realizó respetando la Norma Europea EN 13946 (2003) y las recomendaciones de Kelly et al. (1998). Se evitó el muestreo de diatomeas en algas filamentosas, y se decidió tomar la muestra en sedimento (diatomeas epipélicas) y no en piedra por ser este sustrato común a todos los embalses de estudio.

En cada punto de muestreo, se tomaron dos muestras en botes de polietileno, una de agua y sedimento para la identificación de las comunidades de diatomeas y otra de agua para análisis físico-químico. Para las diatomeas, se tomaron 20 mL de sustrato en 20 mL de agua, obteniéndose un total de 40 mL de muestra que fue fijada en campo con formol (5-10%) como conservante. En el mismo momento de la toma de agua se determinaron in situ los parámetros de campo (pH, conductividad eléctrica, temperatura y potencial de oxidación-reducción). Estas mediciones se realizarán con una periodicidad mensual, usando un equipo portátil de la casa comercial Crison, modelo 507. Una vez en el laboratorio en la Universidad de Aveiro (Portugal), se procedió al tratamiento y montaje de las muestras de diatomeas para su posterior identificación. Para el tratamiento se siguió uno de los métodos definidos en la normativa española (UNE-EN 13946, 2014), que es el tratamiento de oxidación y limpieza de ácido en frío. El tratamiento de las muestras incluye la oxidación de la materia orgánica celular y el montaje de las muestras definitivas para la observación al microscopio. El formol debe ser retirado antes de iniciar la oxidación de la materia orgánica incluyendo todo el contenido celular. Se realizó la digestión usando ácido nítrico al 65% descrito en el manual del INAG y dicromato potásico (INAG, 2008), seguido de centrifugación a 1500 rpm para lavar el exceso de ácido. Se tomaron unos 2 mL de muestra homogeneizada y se añadieron de 4-6 mL de ácido nítrico para oxidar la materia orgánica y una pequeña cantidad de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ). El ácido se dejó actuar durante 24 h. A continuación, se concentraron las muestras oxidadas centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió agua destilada, varias veces para eliminar todos los restos de ácido.

TABLA 1. COORDENADAS DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE LOS EMBALSES Y VALORES DE PH

Embalses	Coordenadas (X-Y) Huso 29	pH	Embalses	Coordenadas (X-Y) Huso 29	pH
Andévalo-Cobica	650803-4167417	3,267	Herrerías	651471-4165235	6,675
Andévalo-Chorrito	649240-4165762	3,833	Garnacha	678806-4186885	5,872
Agrio	738737-4161112	5,526	Grande	666764-4163634	4,098
Aguas Ácidas	666964-4163520	2,484	Lagunazo	662731-4165639	5,679
Chanza	637578-4173754	5,914	La Joya	673647-4180222	5,935
Campanario	691692-4155967	5,669	Marismillas	715238-4175219	2,208
Corumbel	717217-4147612	5,840	El Sancho	670111-4147929	3,460
Dique II	651387- 4165068	6,267	Olivargas	692476-4182511	4,806
Sillillos I	700515- 4162637	5,861	Cueva de la Mora	693586-4180337	2,755
Sillillos II	701078 -4161423	5,823	Puerto León	689958-4176833	5,747
Dique I	651528- 4164736	6,014	Gossan	712690-4179052	2,663
Del Pino	6667841- 4162493	3,660			



## XII CONGRESO NACIONAL Y XI IBÉRICO DE GEOQUÍMICA

Investigar los recursos cuidando el ambiente

Se dejaron secar 0.5 mL de cada muestra sobre un cubreobjetos a temperatura ambiente. Estos “cubres” fueron después colocados sobre los portaobjetos de vidrio usando Naphrax® como medio de montaje.

Tanto el tratamiento como el montaje de los preparados se llevaron a cabo siguiendo la Norma Europea EN 13946 (2003).

Las diatomeas fueron identificadas al máximo nivel taxonómico posible usando un microscopio óptico (Olympus CH30, objetivo de 100X) y un Leitz Biomed 20 EB equipado con un objetivo de inmersión 100X y apertura numérica 1.32 en la Universidad de Aveiro). La identificación se llevó a cabo basándose en Krammer and Lange-Bertalot (1986-1991), Lange-Bertalot (1993, 2001) y Prygiel & Coste (2000). Para calcular las frecuencias relativas se contó un mínimo de 400 valvas por muestras (Alverson et al, 2003), siguiendo las recomendaciones de la Confederación Hidrológica del Ebro (2005). La oxidación y montaje de las muestras se realizó en el Departamento de Biología de la Universidade de Aveiro (Portugal). Sin embargo, las identificaciones y conteo se realizaron tanto en la universidad portuguesa como en la onubense, en CIPIMS, Campus de la Rábida, Huelva, España.

Se tomaron micrografías de las imágenes más relevantes en las dos Universidades. En la universidad de Huelva, se le incorporó una cámara al microscopio óptico: Digital Camera for Microscope DCM900 (USB2.0) 9M. pixels, CMOS chips; en la Universidad de Aveiro las micrografías se realizaron con una cámara Olympus DP70. Se analizó la flora de diatomeas en términos de riqueza, diversidad y estructura general de la taxocenosis. Para el análisis de la taxocenosis y representar cuáles han sido las diatomeas más extendidas en los embalses y qué especie ha logrado poblaciones más numerosas se ha utilizado la versión del programa OMNIDIA (versión 5.5).

En el tratamiento estadístico se usó el programa PRIMER v.6 (Primer 6, Primer-E Ltd, Plymouth, UK) (Clarke & Gorley, 2006), con los datos de abundancia transformados en porcentaje para posteriormente hacer una clasificación jerárquica con un análisis Cluster (UPGMA, Bray-Curtis índice de similaridad). Este análisis Cluster es ampliamente utilizado para el trabajo con diatomeas bentónicas y también para modelización hidroquímica en medios AMD (Grande et al., 2014-2015).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de pH se obtuvieron de los valores promedio de pH tomados mensualmente en estos embalses. Tras la identificación y conteo de las muestras de diatomeas, se obtuvo una matriz con los datos de los 23 embalses de estudio. Un total de 118 especies o variedades de diatomeas, pertenecientes a 40 géneros, fueron encontradas en las 23 muestras.

El dendrograma de la Figura 1 muestra cómo los embalses estudiados se ordenan en base a la comunidad de diatomeas y luego se agrupan en función de sus valores de pH, agrupándose cada embalse con los valores promedios de pH obtenidos de las 12 muestras recogidas mensualmente en cada uno de los 23 embalses de estudio.

Se observan en primer lugar dos grupos diferenciados en el cluster:

1) Embalses con pH menor de 4.5 (n=9): Marismillas: Maris12; Aguas Ácidas: Aac12; Gossan: Gos12; Cueva de la Mora:

Cmora12; Andévalo Chorrito: And12; Grande: Gran12; Sancho: San12; Andévalo Cobica: And12 y Del Pino: Dpin12.

2) Embalses con pH mayor de 4.5 (n=14): Silillos I: Sil12; Garnacha: Gar12; Corumbel: Corum12; Chanza: Chan12; Campanario: Camp12; Puerto León: Pleón12; Lagunazo: Lagu12; Agrio: Agrio12; Silillos II: Sil II12; Olivargas: Oliv12; Joya: Joya 12; Herrerías: Herr12; Dique II: Diq II12; y Dique I: Diq I12.

En cuanto a la semejanza de especies de diatomeas entre los diferentes embalses se observa un claro agrupamiento de estos embalses en función de su pH, donde a pH menores de 4.5 se encuentran las especies conocidas como más tolerantes a la acidez: A pH menor de 3, nos encontramos 6 especies de 3 géneros diferentes: *Eunotia exigua* (Brebisson ex Kützing) Rabenhorst, *Nitzschia cf. thermalis* (Kützing) var. minor, *Pinnularia acidophila* Hoffman & Krammer; *Pinnularia acoricola* Hustedt; *Pinnularia subcapitata* Gregory y *Pinnularia aljustreluca* Luis, Almeida et Ector. Hay que destacar que esta última aparece en los tres embalses con pH menor de 3. Estas especies han sido encontradas por otros autores en ambientes con esta misma afección (Kim et al, 2008; Luís et al., 2012; Valente et al., 2015). De esta manera, las taxocenosis encontradas en estos embalses encajan con la contaminación minera y resultan muy indicativas de la misma.

En los embalses con pH entre 3 y 4.5, nos encontramos 27 especies de 13 géneros diferentes. Entre las especies más abundantes nos encontramos a las pertenecientes al género *Pinnularia*. *Pinnularia acidophila* Hoffman & Krammer aparece en los cinco embalses, al igual que *Pinnularia subcapitata* Gregory que además aparece con más abundancia; *Pinnularia aljustreluca* Luis, Almeida et Ector se localiza en cuatro de los cinco embalses y *Pinnularia acoricola* Hustedt en tres de ellos.

Aparece en abundancia aunque sólo en dos de los cinco embalses *Eunotia exigua* (Brebisson ex Kützing) Rabenhorst, y *Navicula schmassmannii* Hustedt in Schmidt et al. solo en uno de ellos.

En los embalses con pH entre 4.5 y 6, se identificaron un total de 97 especies de 26 géneros diferentes. Aumentando por tanto la diversidad en las comunidades de diatomeas. Desaparecen las especies acidófilas y aparecen especies como *Achnanthydium minutissimum* (Kützing) Czarnecki, 13 especies del género *Navicula* o 15 del género *Nitzschia*.

En los embalses con pH entre 6 y 7, se identificaron un total de 47 especies de 21 géneros diferentes. Aparecen especies en abundancia como *Achnanthydium minutissimum* La mayor diversidad de especies aparecen en el género *Navicula* con 9 especies y en el género *Nitzschia* con otras 9. Otras especies como *Achnanthydium exiguum* (Grunow) Czarnecki, *Brachysira neoexilis*, *Navicula veneta*, *Nitzschia amphibia* y *Nitzschia frustulum* var. *bulhemiana* aparecen en los tres embalses.

### 4. CONCLUSIONES

Tras el estudio de los resultados obtenidos, se confirma que las comunidades de diatomeas responden a las variaciones de pH y que el análisis cluster refleja esos cambios en las comunidades de embalses afectados por AMD. Se constata una relación de dependencia entre la abundancia y distribución de las especies en estudio respecto al pH del medio hídrico.

## SESIÓN 2. HIDROGEOQUÍMICA Y GEOQUÍMICA

Papel de las diatomeas como indicadores del grado de afección de embalses receptores de AMD:  
Influencia del pH en el modo de ocurrencia

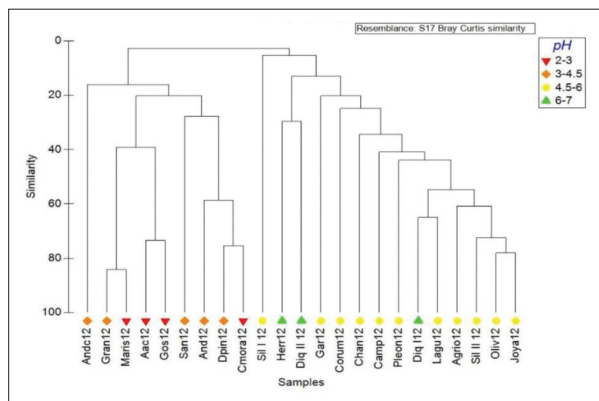


Figura 1 – Dendrograma de las comunidades de diatomeas en cada uno de los embalses estudiados.

Se observa el crecimiento de especies en determinados rangos de pH teniendo tolerancia específica para estas variables, validándose por tanto el interés de las diatomeas como indicadores del grado de contaminación para los embalses de la FPI afectados por AMD.

### 5. BIBLIOGRAFÍA

- Bao, R., A. Alonso, C. Delgado & J.L. Pagés, 2007. Identification of the main driving mechanisms in the evolution of a small coastal wetland (Traba, Galicia, NW Spain). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 247: 296-312.
- Chen, X., X. Mao, Y. Cao, & X. Yang. 2013. Use of siliceous algae as biological monitors of heavy metal pollution in three lakes in a mining city, Southeast China. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 42 (3): 233-242.
- CLARKE K.R. & GORLEY R.N. 2006. *PRIMER v.6 User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Delgado, C. 2006. Evolución Holocena de la laguna de Traba (A Coruña) a partir del estudio de las asociaciones fósiles de diatomeas. 87 pp. Tesis de Licenciatura. Universidad de La Coruña.
- Falkenhayn, L. 2007. An assessment of the use of Bacillariophyceae as biological monitors of heavy metal pollution in Australian tropical streams. Ph.D. Department of Geographical and Environmental studies. University of Adelaide.
- Grande, J.A., De La Torre, M.L., Valente, T.Fernández, J.P., Borrego, J., Santisteban, M., Cerón, J.C., Sánchez-Rodas, D. (2014). Stratification of Metal and Sulphate Loads in Acid Mine Drainage Receiving Water Dams Variables Regionalization by Cluster Analysis. *Water Environment Research*. 87,7.
- Grande, J. A., Santisteban, M., De La Torre, M. L., Valente, T., Pérez- Oсталé, E. (2013). Characterisation of AMD Pollution in the Reservoirs of the Iberian Pyrite Belt. *Mine Water and the Environment*, 32,321-330. DOI 10.1007/s10230-013-0236-6.
- Grande, J.A., Borrego, J., Morales, J.A. (2000a). A study of heavy metal pollution in the Tinto-Odiel estuary in southwestern Spain using factor analysis. *Environmental Geology*, 39(10), 1095-1101.
- Hirst, H., I. Jüttner & S. J. Ormerod. 2002. Comparing the responses of diatoms and macroinvertebrates to metals in upland streams of Wales and Cornwall. *Freshwater Biology*, 47: 1752-1765.
- Kelly, M.G., A.Cazaubon, E. Coring, A. Dell' uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hürlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwandrans, R.
- Laugaste, E.A. Lindstrom, M. Leitao, P. Marvan, E. Padišák, E. Pipp, J. Prygiel, E. Rott, S. Sabater, H. Van Dam & J. Vizinet. 1998. Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 10: 215-224.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. (1986–1991): *Bacillariophyceae*, 1–4. – In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. 876+596+576+437 pp., VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany.
- Lange-Bertalot, H., 2001. *Navicula sensu stricto and 10 genera separated from Navicula sensu lato*, *Frustulia*. *Diatoms of Europe 2*: 1-526.
- Lange-Bertalot, H., 1993. 85 neue Taxa und über 100 weitere neu definierte Taxa ergänzend zur Süßwasserflora von Mitteleuropa 2/1-4. *Biblioth. Diatomol.* 27: 1-454.
- Luís, A., A. Alexander, S. Almeida, E. Ferreira Da Silva & J. M. Culp. 2013. Benthic diatom communities in streams from zinc mining areas in continental (Canada) and Mediterranean climates (Portugal). *Water Quality Research Journal of Canada*, 48 (2): 180-191.
- Luís, A., M. H. Novais, B. Van De Vijver, S. Almeida, E. A. Ferreira Da Silva, L. Hoffmann & L. Ector. 2012. *Pinnularia aljustrellica* sp. nov. (Bacillariophyceae), a new diatom species found in acidic waters in the Aljustrel mining area (Portugal) and further observations on the taxonomy and ecology of *P. acidiphila* Hofmann et Krammer and *P. acoricola* Hustedt. *Fottea*, 12 (1): 27-40.
- Prygiel, J. & M. Coste. 2000. Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T 90-354. Douai: Agence de l'eau Artois Picardie, 340 pp
- Sabater, S., T. Buchaca, J. Cambra, J. Catalán, H. Guach, N. Ivorra, I. Muñoz, E. Navarro, M. Real & A.M. Romani. 2003. Structure and function of benthic algal communities in an extremely acid river. *Journal of Phycology*, 39: 481-89.
- Sabater, S. 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, SW. Spain, following a major mine spill. *Journal of applied Phycology*, 12: 113-124.
- Valente, T., M. J. Rivera, S. Almeida, C. Delgado, P. Gomes, J. A. Grande & M. L. De La Torre. 2015. Characterization of water reservoirs affected by acid mine drainage: geochemical, mineralogical and biological (diatoms) properties of the water. *Environmental Science and Pollution Research International*, DOI 10.1007/s11356-0154776-0. Erratum en <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-5039-9>.
- Valente, T. & C. L. Gomes. 2007. The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology*, 33 (2) 2007: 283294.
- Zalack, J.T., N.J. Smucker & M.L. Vis, 2010. Development of a Diatom Index of biotic integrity for acid mine drainage impacted streams. *Ecological Indicators*, 10: 287-295