



TÍTULO

**LAS DIATOMEAS COMO BIOINDICADORES DEL GRADO DE
AFECCIÓN POR DERENAJE ÁCIDO DE MINA EN CURSOS DE AGUA
PROCEDENTES DEL ENTORNO DE LA MINA DE THARSIS**

AUTORA

María José Tulmo Herrera

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2021
Director	Dr. D. Francisco Córdoba García
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Huelva
Curso	<i>Máster Oficial Interuniversitario en Tecnología Ambiental (2020/21)</i>
©	María José Tulmo Herrera
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2021



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



LAS DIATOMEAS COMO BIOINDICADORES DEL GRADO DE AFECCIÓN POR DRENAJE ÁCIDO DE MINA EN CURSOS DE AGUA PROCEDENTES DEL ENTORNO DE LA MINA DE THARSIS.

María José Tulmo Herrera

Trabajo Fin de Máster
Máster Oficial en Tecnología Ambiental

Modalidad: Profesional

2020/2021

Director:

Dr. Francisco Córdoba García
Departamento de Ciencias Integradas
Universidad de Huelva

Francisco Córdoba García, Catedrático de Universidad, Investigador responsable del grupo BIO-282 “Respuestas y adaptaciones ambientales frente al estrés ambiental

INFORMA:

Que el trabajo titulado “**LAS DIATOMEAS COMO BIOINDICADORES DEL GRADO DE AFECCIÓN POR DRENAJE ÁCIDO DE MINA EN CUROS DE AGUA PROCEDENTES DEL ENTORNO DE LA MINA DE THARSIS**” presentado por **D. María José Tulmo Herrera**, ha sido realizado en “**Departamento de Ciencias Integradas – Universidad de Huelva**”, bajo mi dirección, y autorizo su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Trabajo de Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 25 de noviembre de 2021

Fdo.: Francisco Córdoba García

RESUMEN

El principal objetivo en este trabajo es caracterizar las poblaciones y comunidades de diatomeas presentes en aguas vinculadas al entorno de la Mina de Tharsis. El procedimiento de recolección, tratamiento, identificación, y recuento de muestras de diatomeas, se llevó a cabo conforme a la Norma Europea UNE-EN 13946:2014. Se seleccionaron nueve puntos de muestreo afectados por el Drenaje Ácido de Mina (AMD) en mayor o menor grado, se consideraron al Arroyo Valdeoscuro y Ribera de Agustín que drenan las cortas de la Mina de Tharsis y al Arroyo de Tía Sebastiana que no está vinculado a la Mina de Tharsis. Los muestreos se realizaron durante los meses de marzo y abril de 2021, en donde se ha logrado identificar 44 especies de diatomeas de un total de 3600 valvas analizadas. Con los parámetros físico-químicos, la composición de metales y el resultado de diferentes índices de biodiversidad se logró obtener la caracterización de las poblaciones de diatomeas que se desarrollan en aguas vinculadas al entorno de la Mina de Tharsis.

Palabras clave: diatomeas, Mina de Tharsis, UNE-EN 13946:2014, Drenaje Ácido de Minas, índices de biodiversidad.

ABSTRACT

The main objective of this work is to characterize the populations and communities of diatoms present in waters linked to the surroundings of the Tharsis Mine. The procedure for collecting, treating, identifying, and counting diatom samples was carried out in accordance with the European Standard UNE-EN 13946: 2014. Nine sampling points affected by Acid Mine Drainage (AMD) to a greater or lesser extent were selected. To a lesser degree, the Arroyo Valdeoscuro and Ribera de Agustín, which drain the cuttings from the Tharsis Mine, and the Arroyo de Tía Sebastiana, which is not linked to the Tharsis Mine, were considered. The samplings were carried out during the months of March and April 2021, where it has been possible to identify 44 species of diatoms out of a total of 3,600 valves analyzed. With the physicochemical parameters, the composition of metals and the result of different biodiversity indices, it was possible to obtain the characterization of the diatom populations that develop in waters linked to the environment of the Tharsis Mine.

Keywords: diatoms, Tharsis Mine, UNE-EN 13946: 2014, Acid Mine Drainage, biodiversity indices.

DEDICATORIA

A Sandra, mi madre y mejor amiga.

AGRADECIMIENTOS

En las siguientes líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra manera hicieron posible la elaboración de este trabajo.

Sin duda alguna este trabajo se llevo a cabo gracias a la guía y valiosas aportaciones de mi director el Dr. Francisco Córdoba García, quien a lo largo de estos meses siempre ha estado al pendiente de todas las inquietudes que han surgido. Además de ser un excelente docente también ha sido un gran amigo durante mi estancia en Huelva.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por la oportunidad de la movilidad académica que me fue otorgada; y a la Universidad Internacional de Andalucía (UNIA) por la beca que me fue concedida para desarrollar mis estudios del Máster.

A mis padres, quienes siempre me ha motivado a esforzarme y seguir adelante para llegar a mi objetivo. Gracias a sus consejos tome la decisión de imponerme este reto, que ha sido una gran experiencia en mi vida y que me ha demostrado que los sueños y metas son alcanzables al ser perseverante.

A todas las personas que han estado presentes, que de una u otra manera me brindaron su apoyo y siempre estuvieron pendientes de mi en todo este transcurso de tiempo, hermanos Matías y Dennis; abuelitos Olga y Sergio; tíos Wladimir, Leonardo, Marco, Williams, Eugenia y Graciela; primos Paúl, Mary y Myriam; y amigos.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Lixiviados ácidos generados en la Mina de Tharsis	1
1.2 Características generales de las diatomeas y su papel como indicadores biológicos	2
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Área de estudio	7
3.2 Zonas de muestreo	8
3.3 Recolección de muestras	12
3.4 Tratamiento, identificación y recuento de especies	13
3.5 Análisis estadísticos e índices de biodiversidad	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Parámetros físico-químicos	19
4.2. Composición elemental	23
4.3. Análisis de diatomeas	28
4.4. Índices de Biodiversidad	36
5. CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA	41

ANEXOS

- I. Tabla de datos
- II. Catálogo de diatomeas identificadas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Lixiviados ácidos generados en la Mina de Tharsis

La intensa explotación minera, desarrollada en la Faja Pirítica Ibérica (FPI) que se extiende desde el noroeste de Sevilla hasta el sur de Lisboa (Almodóvar et al., 2012), uno de los depósitos con mayor concentración de sulfuros de la corteza terrestre, ha generado un dramático problema de contaminación ambiental debido a la ausencia de medidas preventivas y correctoras hacia la preservación del medio hídrico (Grande, 2016).

La FPI es conocida por su tradición minera con más de 5000 años de historia. En la provincia de Huelva durante el siglo pasado estuvieron bajo explotación más de 80 minas, entre las más importantes destacan la de Río Tinto (*The Río Tinto Cooper Company Limited*) y la de Tharsis (*The Tharsis Sulphur and Cooper*) (López, 2004; Macías, 2012). La mina de Tharsis, está situada en la comarca del Andévalo al norte de la cabecera municipal de Alosno. Es la segunda explotación más importante de la FPI (González et al., 2019). Debido a la alta demanda de minerales como materias primas, ha estado activa desde la antigüedad pasando por varias civilizaciones hasta acabar en el siglo XX (Tharsis Mining, 2019), dejando una superficie de grandes escombreras y 5 cortas mineras como Filón Norte, Esperanza, Filón Sur, Sierra Bullones y Filón Centro (Figura 1), de las cuales 4 de ellas están inundadas (González et al., 2019).



Figura 1. Las minas de Tharsis.

Los lixiviados ácidos generados durante la explotación de los yacimientos minerales quedan expuestos a la meteorización. El contacto de la pirita (FeS_2) y otros sulfuros minerales al exponerse a condiciones atmosféricas de agua, oxígeno y simultáneamente la intensa actividad de bacterias quimiolitotrofas genera la oxidación de los sulfuros minerales, que junto a los restantes minerales presentes en la roca producen reacciones secundarias que da lugar a un lixiviado ácido conocido como Drenaje Ácido de Mina (AMD, por su acrónimo en inglés) que es drenado al exterior a través de escorrentías o agua de lluvia, el caudal contaminante que se ha formado se dirige a los cursos de aguas subterráneas o superficiales que llegan hasta redes fluviales y embalses que fueron construidos con el fin de asegurar el suministro de agua para las poblaciones aledañas (Aduvire, 2006; Schowe et al., 2012; González et al., 2019; Grande, 2016).

Las aguas afectadas por AMD de la mina de Tharsis se dirigen hacia el río Meca en donde antes de su confluencia con río Odiel queda represado en el embalse de El Sancho (58 hm^3) que posee un pH de aproximadamente de 4,2 y elevadas concentraciones de metales tóxicos, y que afecta a la calidad del agua generando efectos hidrológicos tóxicos en diversos grados tanto para el hombre, como para la fauna y la vegetación, llegando a ser apta únicamente para uso industrial (Olías et al., 2007, Santisteban, 2015).

En general, las aguas ácidas presentan alta conductividad, elevado potencial redox, elevadas concentraciones de SO_4 , Fe, Mn, Al y otros iones que pintan los cauces con tonalidades rojas, amarillas, ocres entre otros, presentan un bajo pH (< 3), puesto que, la presencia de Fe, Al y Mn disueltos pueden dar lugar a iones H^+ por hidrólisis (alta concentración de iones H^+). Además, la cantidad de oxígeno que entra en contacto con materiales sulfurosos, la temperatura, la disponibilidad de CO_2 , los elementos traza y nutrientes para la presencia de microorganismos, influyen en la generación de aguas ácidas (Aduvire, 2006). Las aguas ácidas dependiendo del grado de contaminación siempre condicionan la dominancia y abundancia de especies. En consecuencia, el medio AMD provoca la aparición de ecosistemas estructuralmente simples con baja biodiversidad, por lo que, están dominados por organismos acidófilos, ya sean procariotas o eucariotas como las algas unicelulares diatomeas; y también se puede presenciar el desarrollo del brezo *Erica andevalensis*, endémico de la Faja Pirítica que se desarrolla exclusivamente en suelos muy afectados por AMD (Márquez-García & Córdoba, 2010).

1.2 Características generales de las diatomeas y su papel como indicadores biológicos

Las diatomeas son algas, eucariotas fotosintéticos unicelulares que pertenecen a la familia *Bacillariophyceae*. Son organismos microscópicos con tamaños que

normalmente oscilan entre 10 y 200 μm (Kooistra et al., 2007). Están formadas por paredes celulares de sílice, denominadas frústulo, que está constituida por dos valvas o tecas: la parte mayor (epivalva) y la parte menor que encaja con la anterior (hipovalva), que al agruparse encajan como una placa de Petri (Illana, 2008). La ornamentación de las valvas se caracteriza por presentar estrías, nervios, particiones, areolas, rafe y otras configuraciones que facilitan la correcta identificación taxonómica de las diatomeas, debido a que varía considerablemente entre especies (Figura 2).

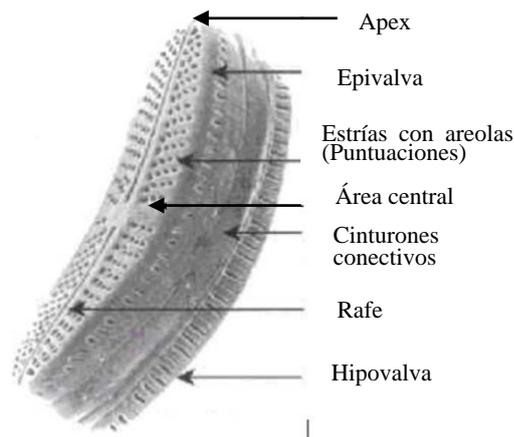


Figura 2. Morfología general de una diatomea. (Coste y Tison-Rosebery, 2011)

De acuerdo con la simetría, las diatomeas se pueden definir en dos líneas evolutivas representadas por los órdenes centrales y pennales (Figura 3). Las diatomeas centrales tienen forma circular o cilíndrica y presentan simetría radial, pertenecen a la clase *Coscinodiscophyceae*; las diatomeas pennales generalmente tienen simetría bilateral, se subdividen en dos clases, las que presentan rafe son *Cillariophycidae* y las que no presentan rafe son *Fragilariophyceae* (Canizal, 2009).

Diatomeas Céntricas



Diatomeas Pennadas

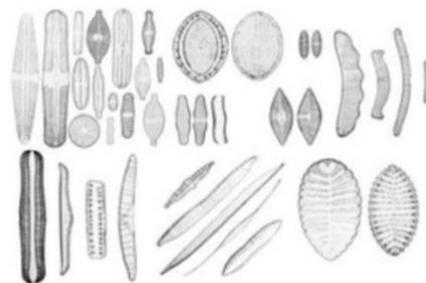


Figura 3. Clasificación de las diatomeas. (ISPRA, s. f.)

Otra estructura presente en el frústulo y de gran importancia para la determinación y clasificación de las diatomeas es el rafe que secreta sustancias mucosas que le permite fijarse en el sustrato o desplazarse sobre una superficie. Este elemento puede presentar dos ranuras debido a que es interrumpido por un puente de sílice más delgado en la región central denominada nódulo central; o una ranura que atraviesa longitudinalmente la valva desde un polo a otro. El rafe presenta una zona polar que se curva hacia el interior de la valva denominado helictoglosa, y una terminación central (Figura 4). Perpendicularmente al rafe se agrupan un conjunto de poros que forman bandas en la superficie de las valvas, denominadas estrías (Lora et al., 2020; Canizal, 2009; Round et al., 2007).

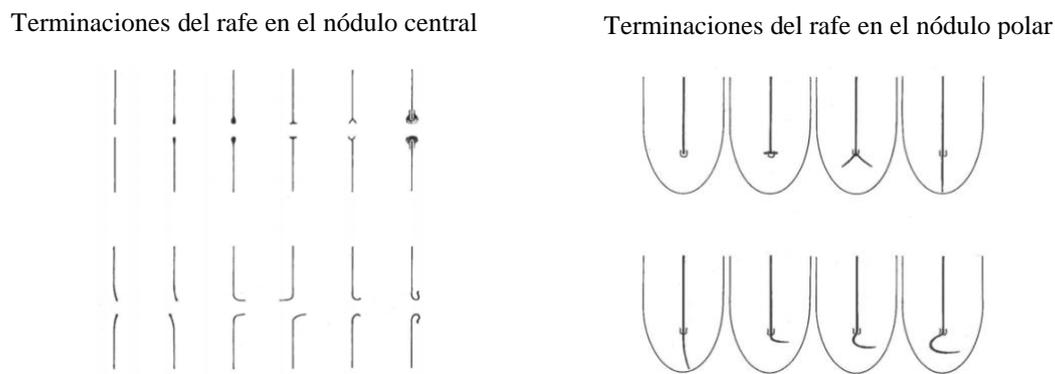


Figura 4. Diferentes tipos de terminaciones del rafe en el nódulo central y nódulo polar. (Round et al., 2007)

Normalmente las diatomeas puede presentar en su ciclo de vida dos fases principales: una fase vegetativa prolongada que puede durar meses o años u otra fase más corta como la reproducción sexual (gametogénesis o fertilización) que puede durar horas y dar lugar a nuevos organismos (Chepurnov et al., 2004).

Estas microalgas representan aproximadamente el 25% de biomasa vegetal del mundo, son importantes consumidoras de CO_2 y productoras de biomasa y oxígeno (Hilaluddin et al., 2011), están distribuidas en una gran variedad de ambientes acuáticos y ambientes húmedos terrestres alrededor del mundo, por lo que, dependiendo de sus hábitats las diatomeas pueden ser planctónicas que permanecen suspendidas a la deriva y a expensas de las corrientes; bentónicas que habitan fijas sobre diferentes tipos de sustratos como: rocas (epilíticas), material vegetal (epifíticas), sedimentos fangosos (epipélicas), sedimentos arenosos (episámmicas) (Canizal, 2009). Al ser extremadamente diversa, se estima que existen alrededor de 12,000 y 30,000 especies, aunque tales estimaciones dependen de los patrones de estudios de cada uno de los autores (Malviya et al., 2016; Lora et al., 2020). No obstante, la caracterización de la diversidad de especies de diatomeas es sumamente desafiante debido a la gran variedad de especies, la similitud entre especies y los cambios de forma y textura que surgen en el ciclo de vida. Para la identificación bajo

el microscopio se precisa que los componentes orgánicos sean eliminados y así poder identificar la estructura y ornamentación del frústulo (Julius y Theriot, 2010).

Las características fisiológicas y metabólicas que presentan las diatomeas las hace un atractivo para varias aplicaciones tecnológicas industriales de gran potencial biotecnológico, donde pueden obtenerse compuestos esenciales que pueden emplearse en la industria farmacéutica, biofertilizantes, nanotecnología, etc. (Bozarth et al., 2009). Sin embargo, al adaptarse a una variedad de factores de estrés en ambientes sumamente desfavorables han sido utilizadas en diferentes estudios como bioindicadores que permite cuantificar y cualificar los impactos generados por actividades antropogénicas, ya que presentan elevada sensibilidad frente a la alteración de los parámetros físico-químicos del agua (Schowe et al., 2012; Blanco, 2015; C. Sánchez et al., 2019).

La calidad del agua desde la segunda mitad del siglo XX se ha considerado un tema de creciente interés en los países industrializados, por lo que, la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea establece a las diatomeas como indicadores biológicos puesto que presentan características fisiológicas y ecológicas adecuadas para los estudios de la calidad del agua, se dispone de variada información sobre las exigencias ecológicas de cada uno de los taxones. La recogida, preparación y preservación de las muestras son relativamente sencillas permitiendo obtener resultados que posteriormente pueden relacionarse entre sí y ser reproducibles a largo plazo (Blanco et al., 2007, Lane, 2005).

Por lo tanto, el presente estudio pretende hacer un diagnóstico fundamentado sobre el estado ecológico de lo sistemas acuáticos en torno a la Mina de Tharsis, a través de datos cuantitativos que se han recopilado y analizado estadísticamente, en donde finalmente la composición del conjunto de especies de diatomeas se utilizará para interpretar la calidad del agua.

2. OBJETIVOS

General:

El objetivo general de este trabajo es comparar las poblaciones y comunidades de diatomeas presentes en aguas vinculadas al entorno de la Mina de Tharsis y relacionar los datos obtenidos con parámetros físico-químicos y las concentraciones de metales en los cursos de agua estudiados.

Específicos:

- Aplicar las técnicas de recolección, tratamiento, identificación y recuento de muestras de diatomeas, conforme a la Norma Europea UNEEN 13946:2014.
- Realizar preparaciones microscópicas que permita la identificación de las diatomeas en las zonas de estudio, conforme a la Norma Europea UNE-EN 14407:2015.
- Medir diversos parámetros físico-químicos *in situ* y analizar la concentración de sulfatos y metales en los cursos de agua seleccionados.
- Evaluar los resultados obtenidos mediante métodos estadísticos multivariantes e índices de (bio)diversidad de las comunidades de diatomeas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El muestreo se realizó en el pueblo de Alosno, provincia de Huelva, durante los meses de marzo y abril de 2021. Se seleccionaron 9 puntos de muestreo vinculados a la Mina de Tharsis que se encuentran en torno al Arroyo Valdeoscuro, Arroyo de Tía Sebastiana y Ribera de Agustín (Figura 5 y 6).

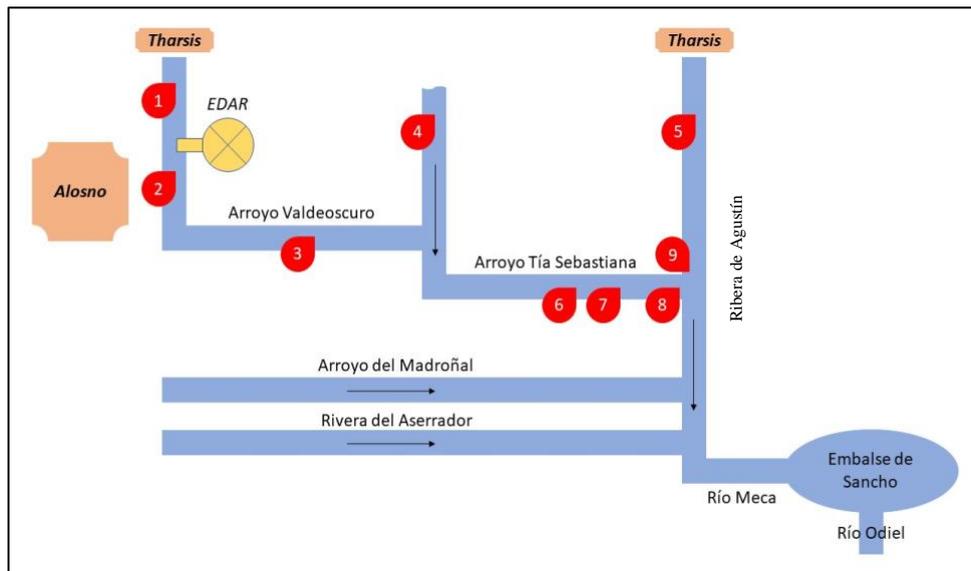


Figura 5. Croquis del área de estudio

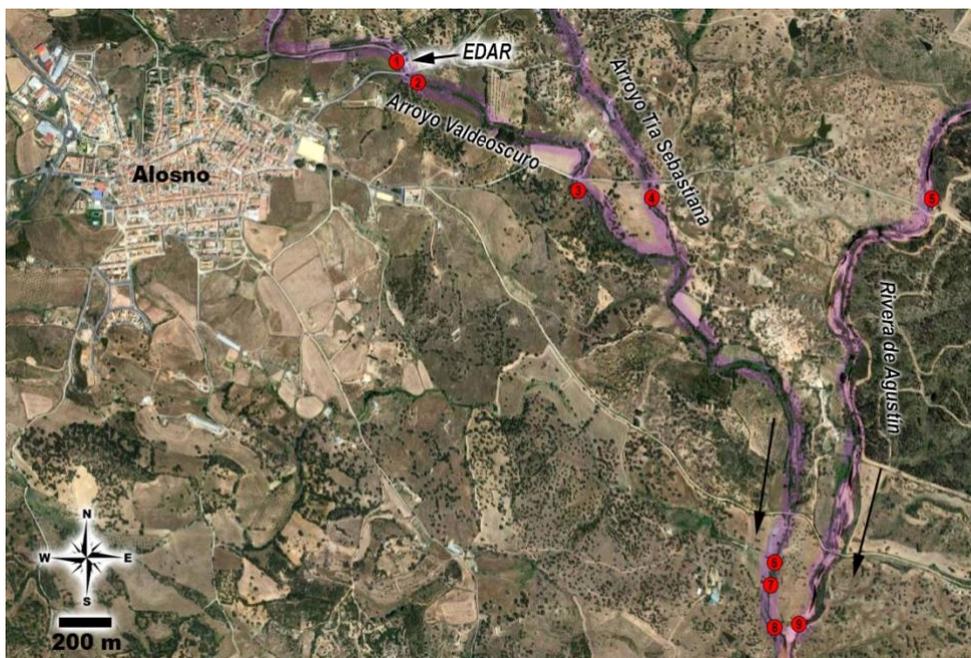


Figura 6. Mapa de localización de los puntos de muestreo

3.2 Zonas de muestreo

Las zonas de muestreo provienen de instalaciones mineras de Tharsis. La Galería Sabina es la que recoge las aguas filtradas desde la Corta del Filón Sur, canalizando el AMD hacia el Arroyo Valdeoscuro; la Corta Esperanza es drenada por la Ribera de Agustín, Mientras que el Arroyo Tía Sebastiana no está vinculado con la Mina de Tharsis. Sin embargo, el cauce desemboca en los cauces en estudio afectados por AMD.

Los puntos de muestreo se caracterizan por ser arroyos estacionales debido a que en los meses de verano pueden llegar a secarse como el Arroyo Valdeoscuro, secarse parcialmente como el Arroyo Agustín, o inclusive llegar a secarse totalmente como el Arroyo Tía Sebastiana.

En cada zona de estudio se realizó una descripción detallada del lugar como la localización, anchura y profundidad del tramo del agua, características hidromorfológicas, características físico-químicas, vegetación predominante, uso del entorno y observaciones. A continuación, se detalla cada una de las áreas de estudio.

- **MJ1. Arroyo Valdeoscuro - Agua ácida** (37° 33' 5.440" N; 7° 6' 19.757" W)
Se encuentra ubicado inmediatamente antes de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) de Alosno (Figura 7 y 8). El curso del agua es lento con una profundidad de alrededor de 30 cm, el agua no es turbia y presenta un color aparente entre rojizo y amarillento. El sedimento contiene arena, gravas y algunas piedras sumergidas. Lugar de muestreo soleado y apenas provisto de vegetación (en su mayor parte juncos). Zona de uso agrícola e industrial.
- **MJ2. Arroyo Valdeoscuro - Agua dulce** (37° 33' 4.748" N; 7° 6' 18.328" W)
Punto ubicado a 20 metros de la salida de la Estación depuradora de aguas residuales (EDAR) (Figura 9). El cauce del agua es lento y con una profundidad de 40 cm aproximadamente. Agua algo turbia de color verdoso con presencia de arena, limos y pocas algas superficiales. Soleado, provisto de abundante vegetación de juncos alrededor de la zona de muestreo y fauna (se avistaron algunas ranas). El uso del entorno es agrícola e industrial.
- **MJ3. Arroyo Valdeoscuro – Agua ácida** (37° 32' 52.796" N; 7° 5' 52.872" W)
Zona de estudio ubicada a alrededor de 900 metros del muestreo MJ2. Curso lento de agua. Profundidad de alrededor de 40 cm. Agua poco turbia de color aparente entre verdoso y rojizo, presencia de pocas algas, arena y rocas sumergidas. Zona de muestreo soleada y provista de vegetación como juncos. Su curso discurre entre dehesas de encinas. Entorno de uso agrícola y ganadero (Figura 10).

- **MJ4. Arroyo Tía Sebastiana – Agua dulce** (37° 32' 49.841" N; 7° 5' 40.654" W). Punto ubicado junto a la carretera HV-1427, a unos 1,3 km de Alosno y a aproximadamente 2,1 km del punto de su desembocadura en la Ribera de Agustín. Curso de agua lento, presencia de limo y rocas sumergidas. Agua poco turbia de color verdoso. Profundidad de 50 cm aproximadamente. Zona en estudio levemente sombreada, se encuentra rodeada de vegetación muy exuberante (dehesas, ranúnculos, juncos), provisto de fauna (ranas, huevos de caracol). Zona de uso agrícola y ganadero (Figura 11).
- **MJ5. Ribera de Agustín – Agua ácida** (37° 32' 48,919" N; 7° 4' 56,226" W)
 La zona de estudio se encuentra ubicada junto a la carretera HV-1427, a unos 2,5 km de Alosno y a aproximadamente 2,0 Km del punto de confluencia con el arroyo de Tía Sebastiana. Curso lento de agua. Profundidad de 10 cm aproximadamente. El agua no es turbia, presenta un color rojo intenso. Presencia de piedras sumergidas. Lugar de muestreo soleado, se encuentra rodeada de plantación de eucalipto y escasa vegetación de juncos (Figura 12).
- **MJ6. Arroyo Tía Sebastiana – Agua ácida** (37° 32' 3.232" N; 7° 5' 21.570" W)
 Zona de muestreo ubicada a aproximadamente 150 metros de Ribera de Agustín, donde finaliza su cauce. El cauce del agua es abundante aunque lento. Agua algo turbia de color rojizo con presencia de arena, rocas sumergidas y abundantes algas verdes filamentosas. Zona de estudio soleada, con un entorno de uso agrícola y ganadero; se encuentra rodeada de abundante vegetación de juncos, dehesas y de *Erica andevalensis* a medida que se acerca a la Ribera de Agustín (Figura 13).
- **MJ7. Arroyo Tía Sebastiana – Agua ácida** (37° 32' 0.105" N; 7° 5' 21.436" W)
 Punto ubicado a 100 metros de su desembocadura en la Ribera de Agustín. Curso de agua lento y turbio de color rojizo; presencia de arena y rocas sumergidas. Zona de estudio soleada, con entorno de uso agrícola y ganadero; presencia de juncos, dehesas y de *Erica andevalensis* a medida que se acerca a la Ribera de Agustín (Figura 14).
- **MJ8. Arroyo Tía Sebastiana – Agua ácida** (37° 31' 59.124" N; 7° 5' 19.838" W)
 Punto de muestreo a escasos metros del lugar donde el Arroyo Tía Sebastiana desemboca en Ribera de Agustín (Figura 15). Curso de agua de elevado caudal, lento y de color rojizo. Profundidad de más de 2 metros. Zona de muestreo soleada, con entorno agrícola y ganadera. Presencia de *Erica andevalensis* y en cuanto a fauna se avistaron algunas ranas.

MJ9. Ribera de Agustín – Agua ácida (37° 31' 59.281" N; 7° 5' 18.236" N)
Zona de muestreo ubicada poco antes de la confluencia con Arroyo Tía Sebastiana (Figura 16). Curso de agua lento y de color rojo con abundancia de sedimentos y rocas. Profundidad de aproximadamente 1 metro. Zona de muestreo soleada, entorno agrícola y ganadero. Alrededor del punto de muestreo hay abundante vegetación de dehesas (encinas, alcornoque) y *Erica andevalensis* en su ribera.



Figura 7. Área de muestreo en el Arroyo Valdeoscuro (MJ1) ubicado junto a EDAR y área de Muestreo en el Arroyo Valdeoscuro (MJ2) ubicado a la salida de EDAR.



Figura 8. Arroyo Valdeoscuro (MJ1) ubicado inmediatamente antes de la EDAR de Alosno.



Figura 9. Arroyo Valdeoscuro (MJ2) ubicado inmediatamente después del vertido de la EDAR.



Figura 10. Arroyo Valdeoscuro (MJ3) ubicado a unos 900m después de la EDAR.



Figura 11. Arroyo de Tía Sebastiana (MJ4). A unos 1,3 km de Alosno.



Figura 12. Ribera de Agustín (MJ5). A unos 2,5 km de Alosno.



Figura 13. Punto de muestreo del Arroyo de Tía Sebastiana, a unos 150m de su confluencia con la Ribera de Agustín (MJ6).



Figura 14. Punto de muestreo del Arroyo de Tía Sebastiana, a unos 100m de su confluencia con la Ribera de Agustín (MJ7).



Figura 15. Punto de muestreo MJ8, en el Arroyo de Tía Sebastiana junto a la Ribera de Agustín.



Figura 13. Punto de muestreo en Ribera de Agustín, poco antes de la confluencia del Arroyo de Tía Sebastiana.

3.3 Recolección de muestras

El procedimiento de recogida y tratamiento de muestras se llevó a cabo conforme la Norma UNE-EN 13946:2014. Por lo tanto, dependiendo de la zona de muestreo se procedió a tomar rocas hundidas a unos 10-20 cm de profundidad, caso contrario se tomaron muestras de sedimento. Las muestras tanto de rocas como sedimentos se eligieron en zonas soleadas con corriente de agua continua. En el caso de las muestras de rocas se realizó un cepillado de la superficie superior de las rocas mientras se añadía agua del curso de la zona de estudio (Figura 17); las muestras de sedimento fueron recogidas con jeringas de la parte más superficial del sedimento; finalmente las muestras fueron recolectadas en tubos colectores donde se añadieron 3 ml de la suspensión obtenida junto a 7 ml de alcohol absoluto (proporción 3:7) para preservar las muestras hasta su tratamiento en el laboratorio.

En los puntos de muestreo se recolectaron muestras de agua en frascos estériles para su observación directa bajo el microscopio y como inóculo para comprobar la presencia de bacterias y hongos según sea el caso. En cada punto de muestreo se procedió a medir *in situ* los parámetros físico-químicos del agua como el pH, temperatura, conductividad (EC) y potencial redox (EH) (Figura 18). Además, se tomaron muestras de agua que se filtraron mediante una jeringa provista de un filtro estéril, las muestras fueron tratadas con ácido nítrico al 2% hasta alcanzar un pH < 2 para fijar los metales para su posterior análisis de la concentración de metales mediante ICP óptico en el laboratorio de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Huelva (CIDERTA). Las muestras fueron trasladadas y almacenadas en frío hasta su posterior análisis.



Figura 17. Cepillado de rocas.



Figura 18. Medición de parámetros Físico-químicos, junto a Sol M. Murillo que me ayudó en la recolección de muestras.

3.4 Tratamiento, identificación y recuento de especies

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de las especies de diatomeas se requiere que sean tratadas previamente para eliminar los componentes orgánicos y facilitar la observación de los frústulos, y así bajo el microscopio poder identificar la estructura y ornamentación del espécimen. Por lo que, a continuación se detalla el procedimiento del tratamiento de las muestras en estudio que se realizó de acuerdo a *Leiva et al. (2020)*.

1. Cada una de las muestras se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar el alcohol de las muestras.
2. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido (2 ml) se resuspendió con agua destilada (8 ml). Este proceso se repitió 3 veces.
3. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento final (2 ml) se agitó en un vórtex.
4. Se añadieron 8 ml de peróxido de hidrógeno
5. Las muestras se incubaron en baño maría durante 90 minutos a 90 °C, con el fin de eliminar toda la materia orgánica.
6. Las muestras (2 ml) se lavaron con agua destilada (8 ml) mediante centrifugación a 1500 rpm, 5 minutos. Este proceso se repitió 3 veces en donde finalmente se obtuvo un sedimento que fue resuspendido en 2 ml de agua destilada.
7. Para la observación bajo el microscopio se añadieron 2 – 3 gotas separadas de muestra sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Se comprobó así si la densidad de los frústulos era adecuada. En caso de exceso, se añadió más agua destilada y en el caso contrario se volvió a centrifugar para eliminar parte del sobrenadante.
8. Las muestras definitivas se colocaron en una placa calefactora Plactronic a 30 °C durante 30 minutos hasta su secado.
9. A continuación, se procedió a su observación bajo el microscopio binocular de contraste de fase, marca Nikon Eclipse E – 400, objetivo x40, donde una vez identificadas las especies de diatomeas se determinaron sus dimensiones mediante una escala y se procedió a realizar fotografías con la cámara digital incorporada de al menos 400 frústulos/muestra siguiendo el esquema de cuantificación de diatomeas (Figura 19).

En ciertos casos en las muestras de diatomeas fue necesario emplear un medio de montaje de alto índice de refracción (IR) con el objetivo de distinguir los detalles ornamentales de las diferentes especies de diatomeas. Con este fin se utilizó la resina Melmount (índice de refracción de 1,74). Además este medio de montaje permite

obtener preparaciones permanentes que con el tiempo no van a perder sus propiedades visuales. El procedimiento llevado a cabo es el siguiente:

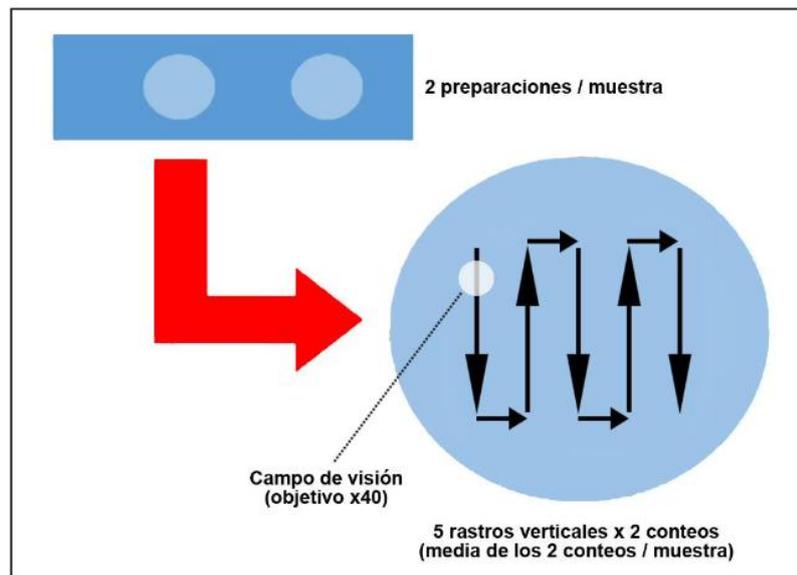


Figura 19. Esquema de Cuantificación de diatomeas.

1. La resina se licuó a baño maría.
2. Una vez colocadas las muestras sobre la placa calefactora se procedió a agregar 1 a 2 de resina Melmount líquida. Seguidamente se colocó un cubreobjetos con el objeto de extender la resina y se presionó con un objeto romo para evitar la formación de cualquier tipo de burbujas de aire.
3. Finalmente, se realizaron las observaciones de las diatomeas bajo el microscopio (objetivo x100 de inmersión) y se fotografiaron.

Para la identificación de las especies observadas se emplearon diversas guías de identificación (Blanco Lanza et al., 2010; Coste y Tison-Rosebery, 2011; Blanco et al., 2012; Kihara et al., 2015; Leira et al., 2017; Bahls et al., 2018) y varias páginas webs como AlgaeBase y Diatoms of the United States.

Los datos obtenidos (especies, recuento) se incorporaron a una tabla de Excel para su análisis posterior.

Finalmente se realizó un catálogo fotográfico de las diferentes especies de diatomeas identificadas en este estudio.

3.5 Análisis estadísticos e índices de biodiversidad

Para el análisis estadístico los datos obtenidos en el campo y laboratorio se ordenaron mediante una hoja de Excel. Posteriormente, mediante el programa MINITAB 17 se realizaron los cálculos estadísticos básicos y multivariantes, mientras que para realizar los cálculos de índices de diversidad y las graficas derivadas se utilizo el programa PAST 3.

Los métodos que se describen a continuación se basan en (Moreno, 2001; García Nieto, 2014; Carmona y Carmona, 2013; Espinosa, 2003; Barjau, 2012).

Los índices calculados son:

- a) Índices de diversidad alfa o riqueza de especies de muestra territorial.
 - Diversidad de Shannon, Dominancia de Simpson y Uniformidad de Pielou.
- b) Índices de diversidad beta o grado de emplazamiento de especies a través de gradientes ambientales.
 - Índices de similitud/disimilitud: Bray–Curtis
 - Índices de reemplazo de especies: Índice de Whittaker

Índice de Dominancia de Simpson (1-D)

El índice evalúa el grado de dominancia e indica la relación que existe el número de especies o riqueza y el número de especies por individuo o abundancia. Se expresa como:

$$D_{Si} = \sum P_i^2$$

Mide la probabilidad de que dos individuos de la población seleccionados al azar sean de la misma especie dos veces seguidas al azar sin reposición.

$$1 - D = 1 - \sum P_i^2$$

Cuanto mayor sea el valor de D, más baja es la biodiversidad usándose la ecuación

$1 - D$, siendo p_i la frecuencia de las especies detectadas ($p_i = \frac{n_i}{N}$; n_i número de individuos de una especie; N : número total de individuos).

El índice (1-D) presenta rangos que van de 0 cuando todas las especies están igual representadas y de 1 cuando una especie domina toda la comunidad.

Índice de Diversidad de Shannon (H')

Mide la heterogeneidad de la comunidad, es decir el grado de incertidumbre en predecir a que especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una comunidad, lo cual asume que los individuos son seleccionados de forma aleatoria y que todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Su fórmula es:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Cuando $S = 1$, la comunidad esta ocupada por una sola especie, entonces $H = 0$ ya que $\ln p_i = 0$. El valor máximo que tomará el índice de Shannon será $H = \ln S$. Mientras mayor sea el valor del índice, mayor será la diversidad.

Índice de Uniformidad de Pielou (J)

También denominado índice de equidad o equitabilidad, mide si en una muestra todas las especies están igualmente representadas. Se expresa como:

$$J = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln(S)}$$

Donde H es el índice de Shannon y S el número de especies. El índice presenta un rango que va de 0 cuando las frecuencias relativas se hacen menos equitativas y si tiende a presentar un valor de 1 es cuando todas las especies son igual de abundantes.

Índice de Bray – Curtis

Es un índice de tipo beta. Se considera como una medida de la diferencia entre las abundancias de cada especie presente en dos comunidades. Se expresa como:

$$I_{BC} = 1 - \frac{(\sum X_i - \sum Y_i)}{(\sum X_i + \sum Y_i)}$$

Donde X_i indica la abundancia o densidad de especies en la comunidad 1; Y_i indica la abundancia de especies en la comunidad 2.

Índice de Whittaker

Mide el cambio de especies a lo largo de gradientes geográficos o ambientales. Describe la diversidad Gamma como la integración de las diversidades Beta (β) y Alfa (α). Se expresa como:

$$\beta = \frac{S}{\alpha - 1}$$

Donde β es la diversidad de Beta, S es el número de especies registradas y α alfa promedio.

Correlación de Pearson

Mide el grado de covariación entre dos variables cuantitativas relacionadas linealmente. Es independiente de la escala de medida de las variables. Este coeficiente se aplica en la forma $d_{jk} = 1 - r$.

$$d_{jk} = 1 - \frac{\sum(X_{ji} - \bar{X}_j)(X_{ki} - \bar{X}_k)}{\sqrt{\sum(X_{ji} - \bar{X}_j)^2} \sqrt{\sum(X_{ki} - \bar{X}_k)^2}}$$

El coeficiente toma valores entre 1 que indica una relación lineal perfecta positiva; -1 indica una relación lineal perfecta negativa; un valor de 0 indica una relación lineal nula.

Correlación de Spearman

Se utiliza cuando se comparan distribuciones que no se ajustan a la normalidad: es por tanto un valor de correlación no paramétrica. Examina la dirección y magnitud de la asociación entre dos variables cuantitativas, o lo que quiere decir la intensidad de la relación entre las variables de cualquier tipo de asociación, no precisamente de forma lineal. La correlación de Spearman, también permite identificar si, al aumentar el valor de una variable, aumenta o disminuye el valor de la otra variable y de esta manera presenta un coeficiente de correlación, que cuantifica el grado de asociación entre dos variables numéricas. Se expresa como:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_1^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde n es la cantidad de especies que se clasifican, d es la diferencia entre los rangos (X – Y).

Los valores que toma la correlación de Spearman se interpretan igual que la correlación de Pearson.

Análisis de varianza y test no paramétricos

Cuando se estimó oportuno, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para poder comparar medias. En el caso de la distribución de datos no se ajustase a la normalidad, tras aplicar los test de Shapiro-Wilk y Anderson-Darling, se realizaron los

test no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para estimar las posibles diferencias significativas entre los parámetros considerados en las zonas de muestreo.

Análisis de componentes principales (ACP)

Estudia las relaciones que se presentan entre variables correlacionadas (miden información común). Es decir, se transforma el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables relacionadas entre sí, llamado conjunto de componentes principales.

Las nuevas variables son combinaciones lineales de las anteriores y se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que se deriva de las muestras. El análisis de componentes principales es una técnica matemática que no requiere la suposición de la normalidad multivariante de los datos.

Análisis jerárquico de aglomerados (clúster)

En las representaciones gráficas de aglomerados o clúster se ha usado el algoritmo UPMGA (Promedio de par-grupo no ponderado) en donde los clústeres se unen en función de la distancia promedio entre todos los miembros de los dos grupos. El índice de similitud o distancia utilizado fue la correlación de Pearson.

Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)

El NMDS es una alternativa no paramétrica del APC. Es un método multivariante adecuado para ordenar especialmente estaciones de muestreo en función de datos de comunidades o datos ambientales. Para ello se agrupan y ordenan los datos en función de un parámetro determinado (pH, conductividad, etc.).

Grado de Significación

Se consideró tras realizar una diversidad de tests que la diferencia entre dos muestras era no significativa ($p > 0,05$), significativa ($p < 0,05$) o muy significativa ($p < 0,01$ o $p < 0,001$).

Cuando se usó el NMDS, los resultados se compararon mediante la prueba ANOSIM, un test no paramétrico ampliamente usado en el campo de la ecología. Se parece al Análisis de la Varianza (ANOVA), pero en vez de usar los datos ordenados en una fila se sirve de una matriz de datos agrupados y ordenados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las áreas muestreadas para el estudio se realizaron en diferentes puntos afectados por el Drenaje Ácido de Mina (AMD) de mayor o menor grado. Por lo que, se consideraron dos arroyos que drenan dos de las cortas de la mina de Tharsis y un arroyo que no está vinculado con la mina de Tharsis.

4.1. Parámetros físico-químicos

Concretamente, para el análisis físico-químico se consideraron los parámetros representados en la tabla 1, que fueron medidos *in situ* como: la temperatura, pH, conductividad (EC) y sólidos totales disueltos (TDS) (El valor de TDS es directamente proporcional al valor de EC), oxígeno disuelto (en % de saturación y en mg/L) y potencial redox con relación al oxígeno (ORP), el cual fue convertido a potencial redox estándar referido al hidrógeno (Eh) por medio de las lecturas ORP y un ajuste basado en la temperatura, de acuerdo a la siguiente ecuación (Wolkersdorfer, 2008):

$$E_h(\text{mV}) = E_t - 0.198 (T - 25) + \sqrt{(a - b \cdot T)}$$

Donde E_t corresponde al valor de medido de ORP en mV; T es la temperatura del agua en °C; a y b son constantes que dependen del electrodo utilizado. En el caso de un electrodo de Ag/AgCl en solución saturada de KCl, a y b son 49655 y 401, respectivamente.

Muestra F-Q	Muestra								
	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6	MJ7	MJ8	MJ9
t (°C)	18,2	18,3	20,4	17,9	20,0	19,9	19,7	19,6	20,0
EC (mS/cm)	1,30	0,73	0,89	0,30	3,30	0,83	2,52	3,64	6,00
pH	3,0	7,6	4,4	6,9	2,3	4,7	3,1	2,9	2,7
Oxi (%)	100,2	96,2	18,2	99,4	117	19	20,4	22,1	39
Oxi (ppm)	8,5	9,0	1,59	9,71	10,5	1,64	1,77	1,9	3,53
TDS(mg/l)	0,6	0,4	0,45	0,2	1,56	0,41	1,26	1,79	3,01
ORP (mV)	577,0	306,0	475,0	268,0	688,0	476,0	588,0	580,0	588,0
Eh (mV)	781,0	510,0	677	472	890	678	790	782	790

Tabla 1. Resumen de los parámetros físico-químicos.

Los datos indican que las áreas analizadas presentan tanto aguas afectadas por AMD como aguas no afectadas por AMD. El comportamiento del pH en los diferentes puntos de muestreo se puede observar en la figura 20A. Las muestras afectadas por AMD presentan aguas de un pH bastante ácido a moderadamente ácido, además de presentar aguas de tonalidad rojiza. Por lo general, las aguas a un pH entre 2,3 a 3,5 presentan una tonalidad rojiza debido a presencia de hierro y otros óxidos disueltos que no precipitan a dicho pH (Aduvire, 2006). En cuanto a la muestra MJ4 no afectadas por AMD el valor del pH es aproximadamente neutro. No obstante, se observa que la muestra MJ2 proveniente del Arroyo Valdeoscuro presenta un pH neutro debido a que el punto de muestreo se encuentra a la salida de la Estación depuradora de aguas residuales (EDAR) por consiguiente disminuye las concentraciones de metales tóxicos dando lugar a un pH neutro. Es un dato para considerar en las estrategias de remediación de aguas ácidas, dado que el drenaje de una estación urbana de depuración de aguas residuales es capaz de contrarrestar la acidez que define a un río ácido, y por tanto de disminuir transporte de metales, en muchos casos tóxicos, a lo largo de la cuenca fluvial.

Los datos de conductividad y potencial redox son los esperados (Figura 20B y 20C), ya que las muestras presentan valores bajos para aguas no contaminadas por AMD; y valores altos para aguas contaminadas por AMD (Leiva et al., 2020). Como en el caso anterior, los valores de conductividad y potencial redox descienden como consecuencia del aporte del agua drenada por la EDAR sobre el arroyo Valdeoscuro. La conductividad de las aguas afectadas por AMD es directamente proporcional a la concentración de sulfatos derivados de la biooxidación de materiales piritíferos. Cuando se comparan el arroyo Valdeoscuro (muestra MJ1) con la ribera de Agustín (muestras MJ5 y MJ), se observan valores más elevados de EC, Eh y un valor de pH más bajos en las muestras de la ribera de Agustín. Al respecto, debe considerarse que los parámetros físico-químicos de los cursos de agua afectados por AMD dependen de muchos factores: paragénesis mineral, rojas encajantes, pluviometría, procesos de atenuación natural, etc. Por ello, esta diferencia probablemente se pueda explicar por las razones esgrimidas anteriormente (Carro et al., 2006; Sarmiento, 2014).

El oxígeno disuelto en las muestras MJ1, MJ2, MJ4 y MJ5 tuvo valores elevados. Sin embargo, en las muestras MJ3, MJ6, MJ7, MJ8, MJ9 se presentan niveles bajos de concentración de oxígeno disuelto (menor al 40%) como consecuencia de la reacción de oxidación que consume oxígeno (Sarmiento, 2014) y del grado de oxigenación del agua, el cual a su vez depende del caudal y velocidad de la corriente de agua. La zona de muestreo MJ5 se encuentra en condiciones fuertemente óxicas con saturación del oxígeno disuelto, posiblemente una de las razones puede ser porque los ecosistemas en condiciones de acidez son estructuralmente simples con baja biodiversidad, por lo que el consumo de oxígeno es menor y las concentraciones de oxígeno en el medio empiezan a crecer.

Aunque parezca una contradicción, un caso contrario ocurre en la zona de muestreo MJ4 procedente del Arroyo Tía Sebastiana que, aunque los niveles altos de oxígeno disuelto sean altos presenta ecosistemas con alta biodiversidad y por lo tanto constante actividad fotosintética que genera altas concentraciones de oxígeno en el medio. Este arroyo se seca casi totalmente a finales de la primavera; la pérdida de caudal provoca un descenso muy notable de la concentración de oxígeno, llegando en algunos encharcamientos a valores próximos a cero (F. Córdoba, comunicación personal).

Mediante el análisis de componentes y el análisis jerárquico de aglomerados podemos detectar ciertas agrupaciones entre los diferentes puntos de muestreo dependiendo de los parámetros físico-químicos.

En el análisis multivariante observamos tres agrupaciones. La agrupación MJ1-MJ5 corresponde a las muestras más afectadas por AMD. La agrupación entre las muestras MJ3-MJ6-MJ7-MJ8-MJ9 proceden de muestras levemente afectadas por AMD y que resultan de la mezcla de aguas limpias (MJ2 y MJ4) con aquellas derivadas de los cursos de agua más ácidos. Por el contrario, la agrupación entre MJ2 y MJ4 se encuentra sumamente alejadas ya que proceden de aguas limpias. Al respecto, volvemos a considerar que la muestra MJ2 se corresponde con un río muy ácido (Valdeoscuro) cuyas características se ven anuladas por la influencia de la EDAR de Alosno (Figura 21A).

Del mismo modo, en el análisis del dendrograma (Figura 21B) observamos resultados similares al análisis multivariante. Como en el caso anterior, se observan dos agrupaciones que se corresponden con los ríos afectados por AMD y con los no afectados. Para el primer caso, se distinguen dos subclústers formados, como en el caso anterior, por los ríos más afectados por AMD (MJ1 y MJ5) y los levemente afectados (MJ3-MJ6-MJ7-MJ8-MJ9)

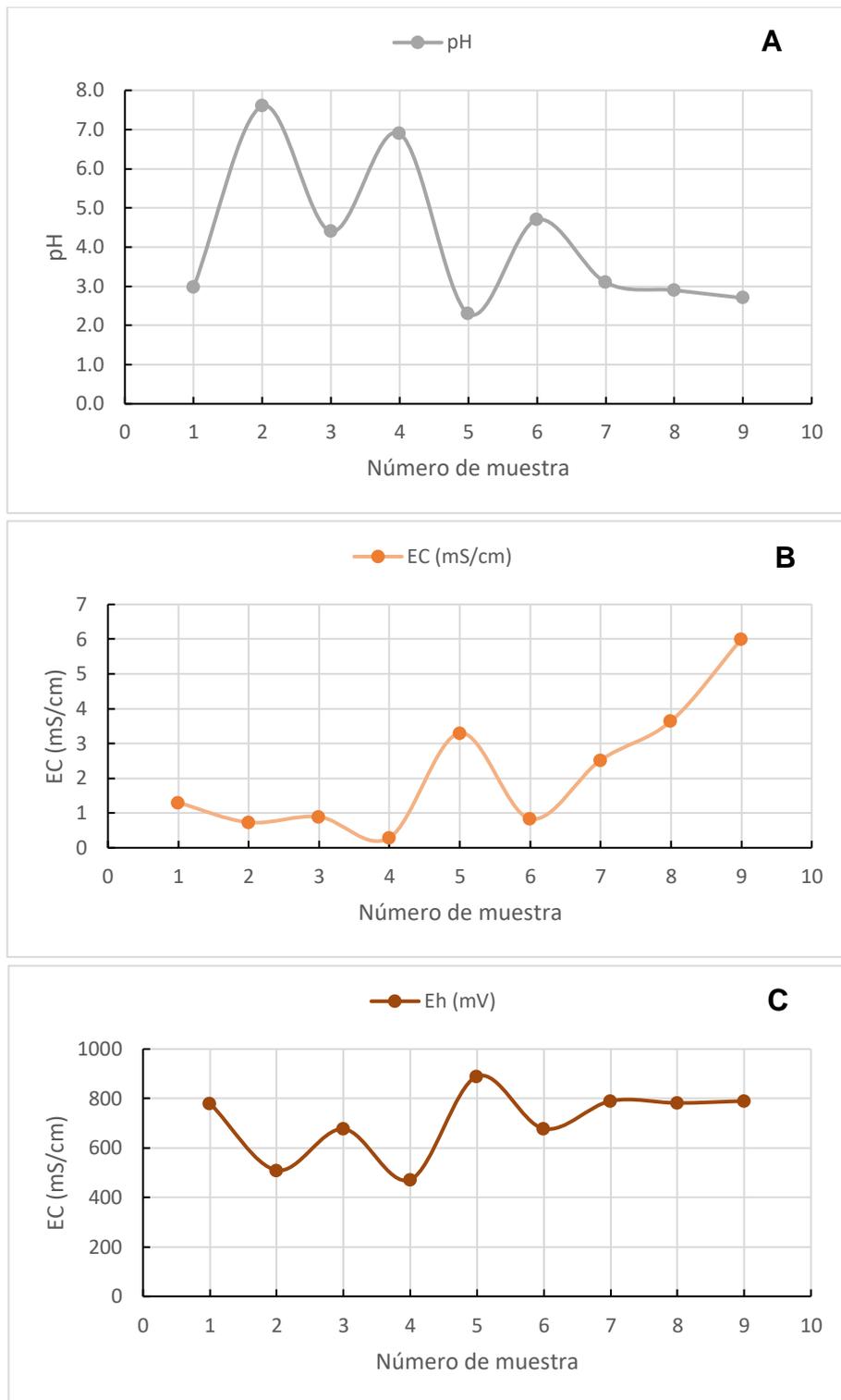


Figura 20. Representación del análisis físico-químico teniendo en cuenta el pH (A), conductividad (Ec) (B) y potencial redox (Eh) (C).

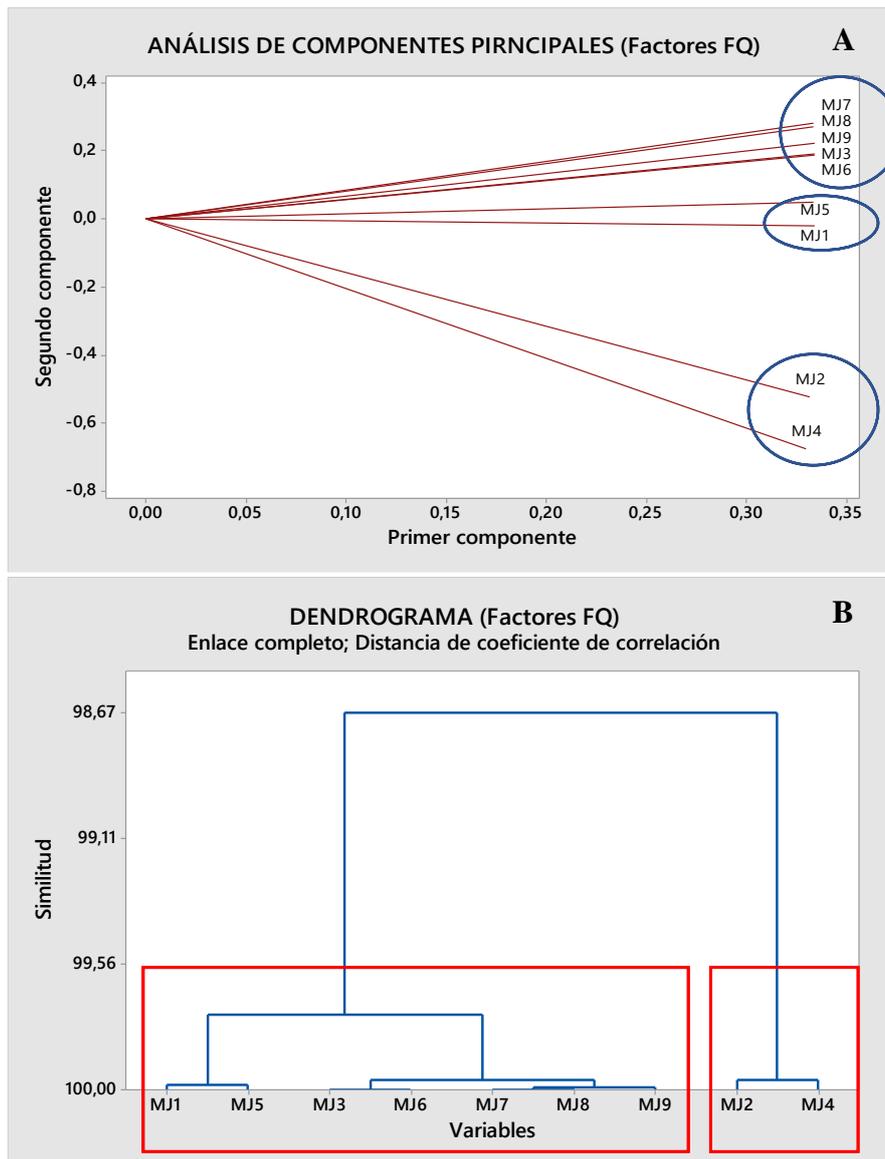


Figura 21. Análisis multivariante de los parámetros físico-químicos. (A) Análisis de componentes principales; (B) Análisis de aglomerados.

4.2. Composición elemental

En la tabla 2 se muestran los valores del análisis de metales mediante ICP-óptico. Como se podía esperar, las muestras provenientes de cursos afectados por AMD presentan valores elevados de metales tóxicos. Mientras que los cursos provenientes de aguas neutras contienen muy bajas cantidades de metales.

Metales	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6	MJ7	MJ8	MJ9
Al	51,2	0,1	16,3	0,1	696,1	18,7	132,1	229,6	464,5
As	0,09	0,09	0,09	0,09	8,60	0,09	0,64	1,19	2,66
Ba	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Ca	38,90	42,88	45,36	35,78	121,50	43,70	58,45	70,32	102,78
Cr	0,09	0,09	0,09	0,09	0,40	0,09	0,09	0,13	0,27
Cu	10,37	0,31	2,97	0,09	80,90	3,40	15,17	25,60	50,03
Fe	12,89	0,32	0,93	0,30	1583,40	0,40	193,98	349,14	779,32
K	1,33	11,51	9,01	0,79	0,90	6,70	5,71	4,42	1,36
Mg	55,35	27,42	40,34	23,13	661,20	39,90	140,17	226,59	436,61
Mn	4,75	0,28	2,65	0,09	80,90	3,30	16,34	27,60	53,99
Na	26,54	76,50	57,59	31,18	32,90	50,70	45,43	39,41	24,98
Ni	0,16	0,09	0,09	0,09	2,20	0,10	0,47	0,76	1,46
P	0,09	0,09	0,09	0,09	4,20	0,09	0,47	0,88	1,69
Pb	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,20
S	218,04	55,26	120,75	13,35	3608,50	120,80	611,18	1108,53	2290,01
Sr	0,10	0,09	0,15	0,13	0,30	0,09	0,09	0,19	0,21
Ti	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
V	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09
Zn	2,02	0,12	0,83	0,09	228,60	0,90	37,06	68,89	141,44
Mo	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Co	0,34	0,09	0,13	0,09	3,70	0,20	0,82	1,41	2,73
Cd		0,09	0,09	0,09	0,50	0,09	0,09	0,15	0,31

Tabla 2. Análisis de metales mediante ICP-óptico

La figura 22A y 22B muestran los elementos más abundantes presentes en las muestras analizadas. Generalmente en aguas procedentes de procesos mineralógicos existe una gran contribución del no metal S y el catión mayoritario Fe, que juega un papel importante en la hidroquímica de las aguas ácidas (Sarmiento, 2014).

La muestra MJ5 proveniente de la Ribera de Agustín presentar los valores más elevados de metales sobre todo de S y Fe. Este río discurre desde Corta Esperanza en Tharsis y se nutre esencialmente del agua de la denominada Laguna de Canaleos. En su curso no hay prácticamente influencia antrópica salvo la reservada a los cotos de caza de su entorno.

Como cabía esperar, la muestra de aguas neutras del arroyo de Tía Sebastiana (MJ2) presenta bajas concentraciones de S, Fe y de otros metales. En cuanto a las muestras MJ6, MJ7, MJ8 y MJ9 de dicho arroyo, se observa que a medida que se acercan al punto de unión con Rivera de Agustín van aumentando las concentraciones de S y Fe. En los puntos más próximos la confluencia de dicho arroyo con el Agustín se observaron numerosos individuos de *Erica andevalensis*, un brezo endémico indicador de la contaminación de suelos por ríos afectados por AMD, lo cual indica que el río Agustín afecta intensamente al arroyo de Tía Sebastiana en su último tramo.

Por lo que respecta a la muestra MJ1, el arroyo Valdeoscuro, procedente del filón Norte de Tharsis y formado en la galería Sabina, discurre por varias huertas y tierras ganaderas en el entorno de Alosno, lo que puede explicar la relativamente baja concentración de metales -con relación a la ribera de Agustín- por aportes de aguas de riego y materia orgánica, lo que conllevaría la precipitación de oxihidroxisulfatos de hierro que circulan por los cauces afectados por AMD (Olías et al., 2007). Además, la posible presencia de minerales carbonatados disueltos neutralizarían parcialmente la acidez y, por tanto, producirían la precipitación Fe, Al y de otros metales (Aduvire, 2006b). La influencia de la EDAR vuelve a ser muy relevante ya que la concentración de metales desciende abruptamente (puntos MJ2 y MJ3).

En la figura 23 se ha representado el sumatorio de Ficklin, donde se considera la suma de concentraciones de metales base (Zn, Cd, Co, Ni, Cu y Pb) que son derivados exclusivamente de los procesos de oxidación de sulfuros (Ficklin et al., 1992). Se observa que la muestra MJ5 destaca por presentar los valores más elevados de contenido metálico con relación al resto de muestras.

Por otro lado, la concentración diferencial de los metales en los distintos puntos de muestreo nos permite un análisis jerárquico de clúster de los propios puntos de muestreo (Figura 24). Como se observa, se puede distinguir la formación de dos clústeres. El primero agrupa a todas muestras provenientes de aguas ácidas presentando en conjunto un índice de similitud de aproximadamente 87; y el segundo agrupa a las muestras procedentes de aguas neutras con un índice de similitud de aproximadamente 93.

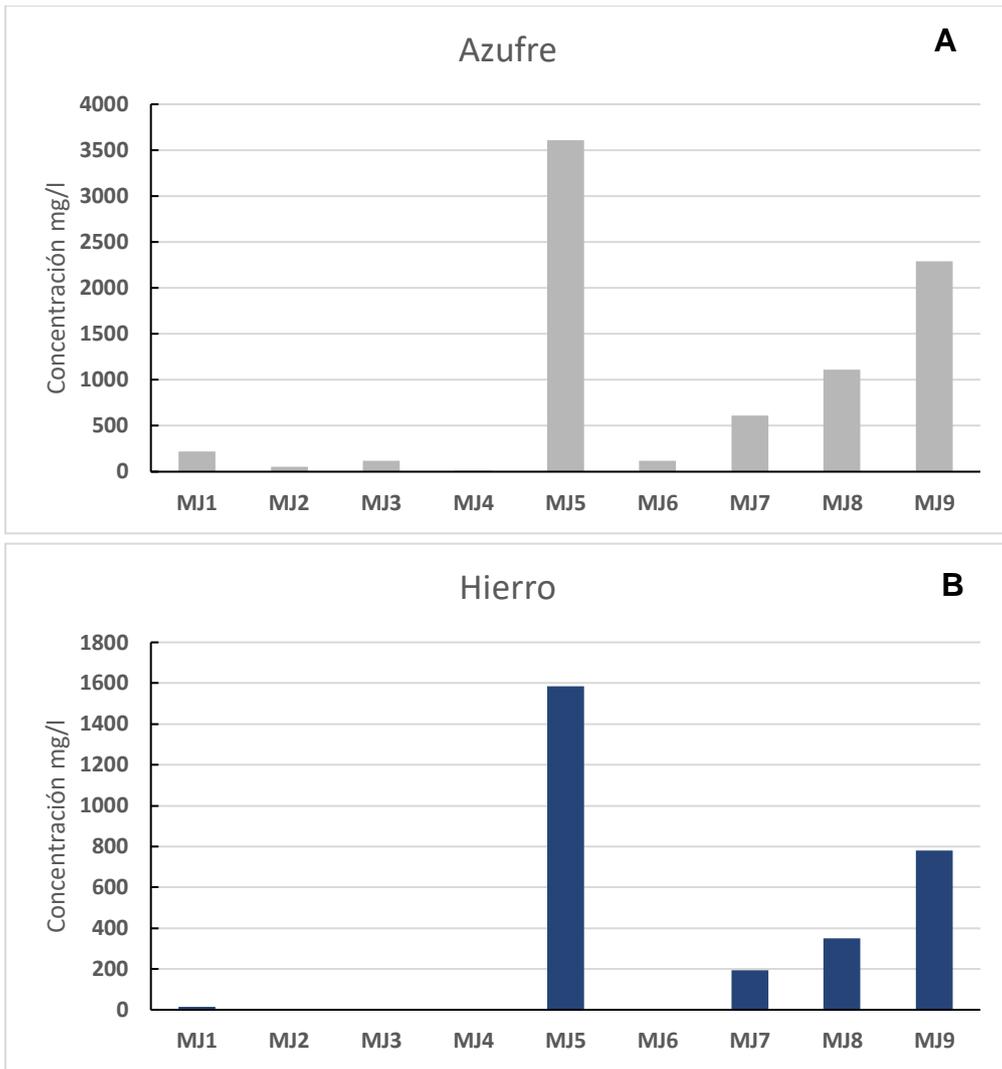


Figura 22. Concentración de azufre (A) y de hierro (B) en función del punto de muestreo.

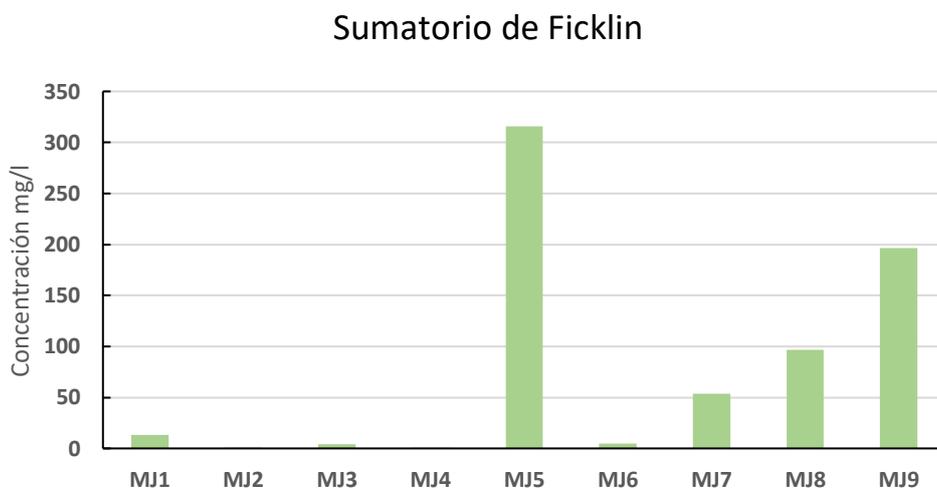


Figura 23. Sumatorio de Ficklin

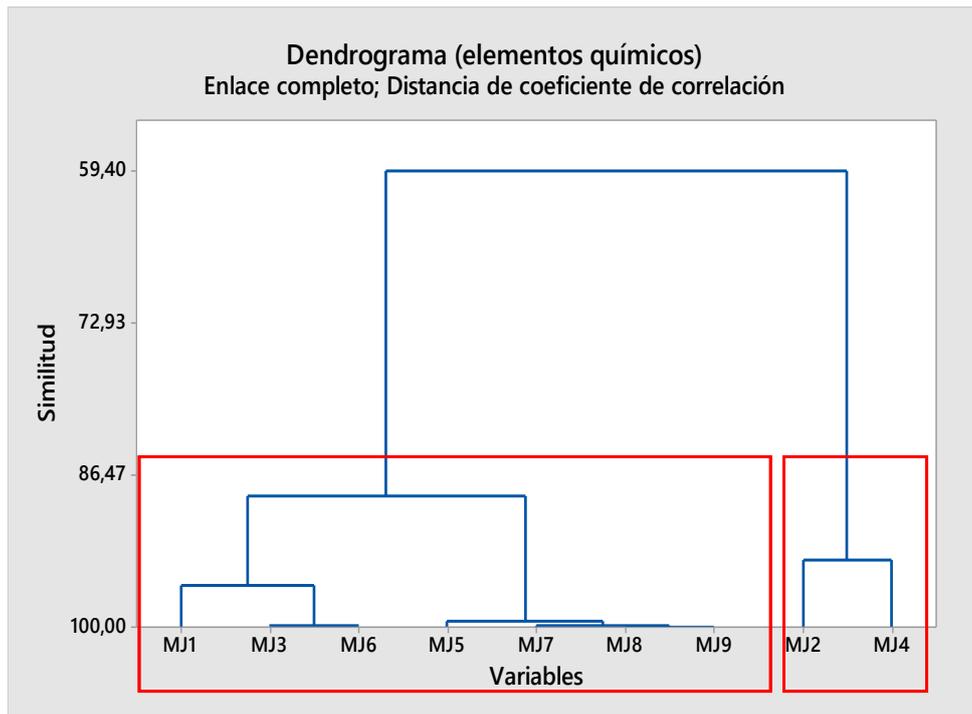


Figura 24. Análisis de aglomerados de los puntos de muestreo en función de la concentración de elementos químicos en las diferentes zonas de muestreo.

Se analizó también la correlación de Pearson entre los distintos metales obteniendo los siguientes resultados donde se muestra que todos los metales se correlacionan positivamente entre sí, excepto, K, Na, Pb. Sin embargo, K y Na se correlacionan entre sí positivamente (Figura 25). En la figura, el color azul destaca las correlaciones positivas, mientras que el color rojo destaca las negativas. El tamaño de los círculos es proporcional al valor de la r de Pearson. Sólo se muestran las correlaciones significativas ($p < 0,05$). Obsérvese que el Na y el K, metales alcalinos, se correlacionan negativamente con el resto de metales -de transición, alcalíneo-térreos como el Ca, y metaloides como el Al y As. El plomo muestra una correlación muy débil con el resto de elementos químicos, dado que su concentración fue prácticamente despreciable en todos los puntos de muestreo, como en los casos del bario, titanio y molibdeno

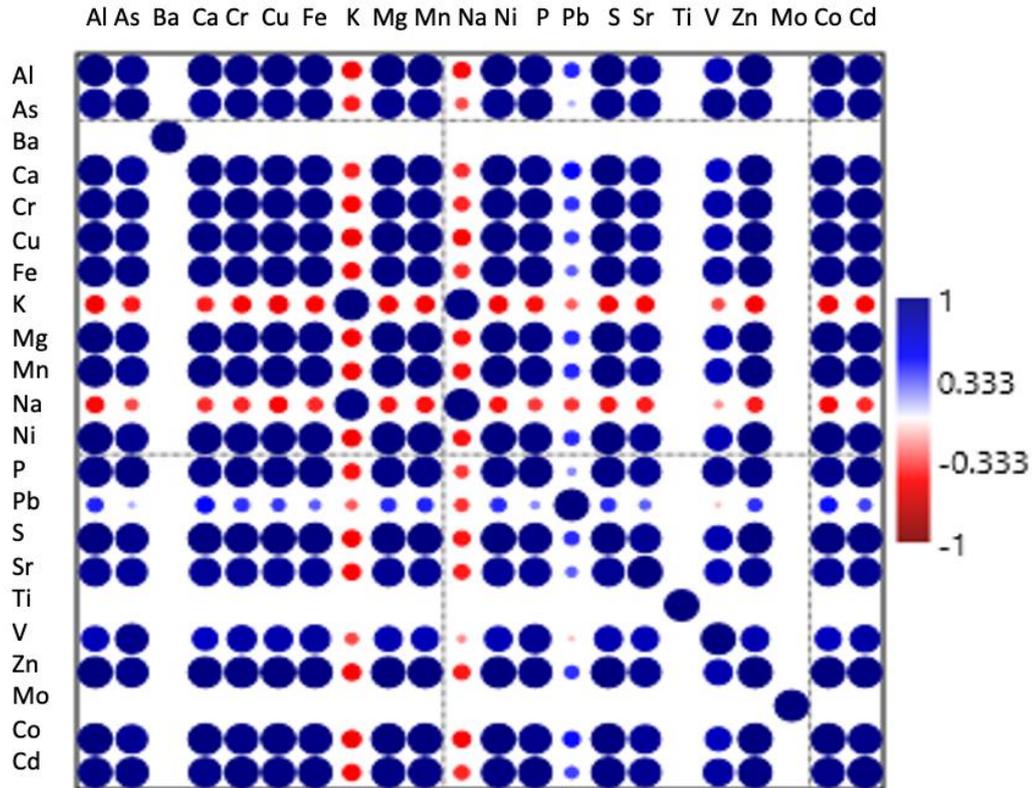


Figura 25. Análisis de correlación de Pearson entre los diferentes metales

4.3. Análisis de diatomeas

Para este análisis se procedió al conteo de 3600 valvas en donde se identificaron 44 especies de diatomeas en el total de las 9 muestras. En el anexo I se muestra una tabla con las diferentes especies identificadas y sus siglas, también se indica el número de individuos contabilizados en cada muestra analizada. El anexo II incluye una fotografía tomada en el microscopio de cada especie identificada.

Las especies más ampliamente distribuidas en la zona de estudio son, por orden de abundancia, *Eunotia exigua* (EEXI) > *Pinnularia subcapitata* (PSCA) > *Pinnularia acidophila* (PACI) > *Achnanthis minutissimum* (ADMI) > *Nitzschia palea* (NPAL) > *Gomphonema lagenula* (GLGN) > *Planothidium frequentissimum* (PLFR) > *Pinnularia aljustrellica* (PALJ) > *Melosira varians* (MVAR) > *Nitzschia acidoclinata* (NACD) (Figura 26). Estas especies agrupan al 93% de todas las especies identificadas. En la figura 27 se pueden observar una gráfica de barras con las frecuencias acumuladas de las diatomeas identificadas en los distintos puntos de muestreo.

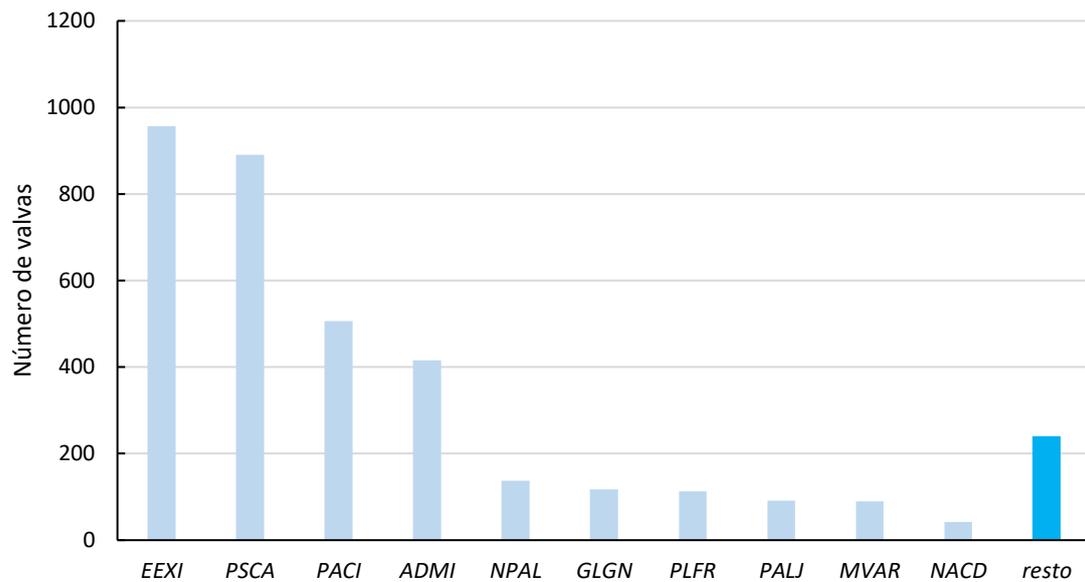


Figura 26. Especies mas abundantes (Abundancia relativa > 1 %).

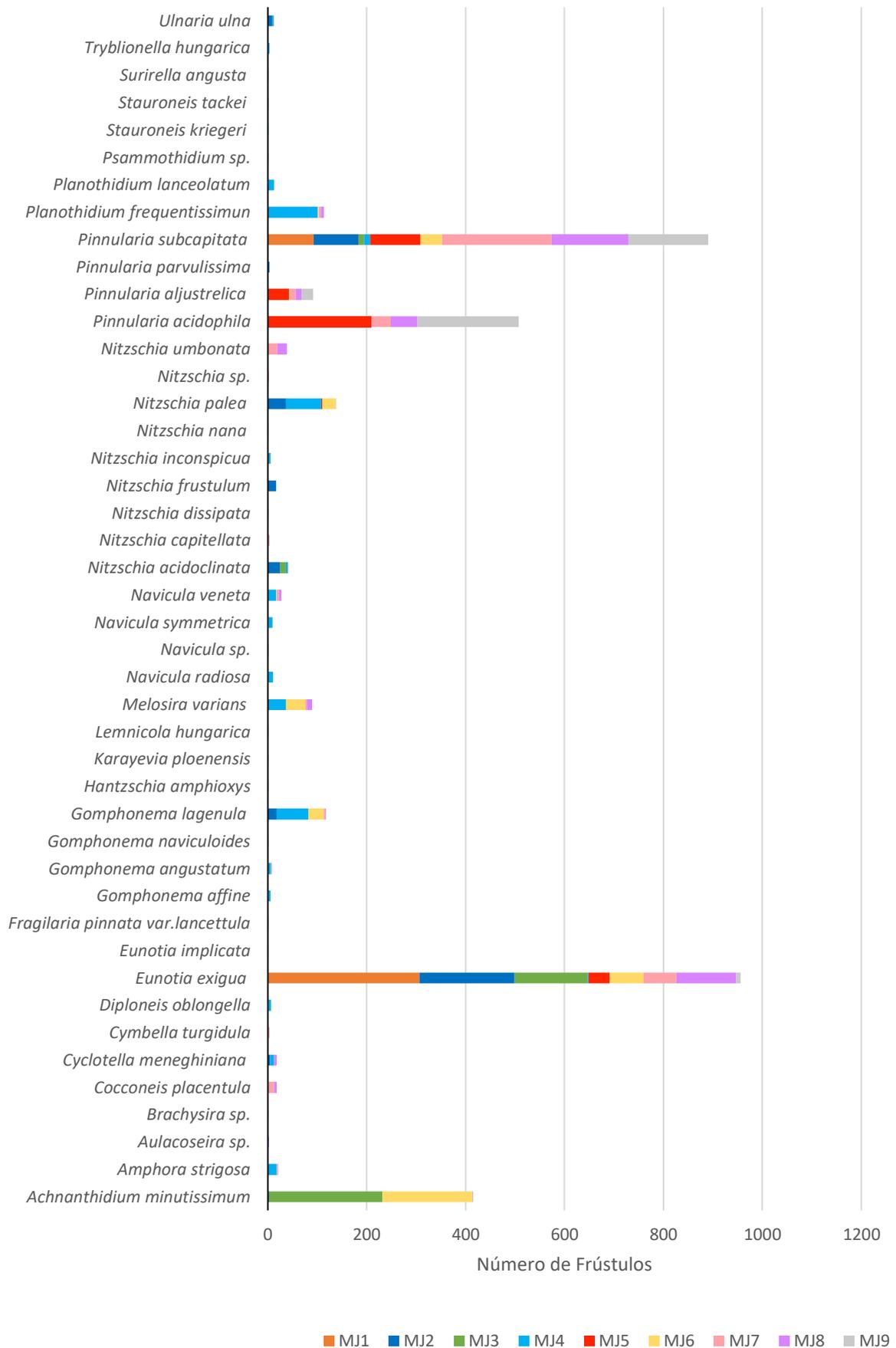


Figura 27. Número de valvas ordenados por cada especie de diatomea identificada.

Con el análisis de componentes principales y el análisis de aglomerados (Figura 28A y 28B) podemos apreciar la formación de agrupaciones en función al número de especies y de individuos, la primera agrupación proviene del Arroyo Valdeoscuro (MJ1 y MJ2). Obsérvese que los análisis de factores físico-químicos y de elementos químicos demostraron que la EDAR provocaba un cambio brusco de los mismos. Sin embargo todas las diatomeas halladas en MJ2 (después de la EDAR) sólo pueden proceder del curso superior del arroyo, y de ahí su agrupamiento. Por el contrario, la muestra de aguas limpias, no afectadas por AMD, del arroyo de Tía Sebastiana (MJ4) se aíslan del resto de muestras.

MJ3 y MJ6 también están asociados. MJ3 es un punto de muestreo del arroyo Valdeoscuro alejado de la EDAR y MJ6 lo es del arroyo de Tía Sebastiana una vez incorporadas las aguas de arroyo Valdeoscuro. El agrupamiento por similitud de las comunidades de diatomeas puede explicarse esencialmente por una leve afectación de aguas ácidas (pH 4,4-4,7; EC 0,83-0,89) y sobre todo por la acción antrópica ya que ambos puntos se localizan en zonas de cultivo y de ganadería. MJ5 y MJ9 corresponden a la Ribera de Agustín, muy afectada por AMD y MJ7-MJ8 son puntos del arroyo de Tía Sebastiana próximos a su desembocadura en la ribera de Agustín. Como hemos comentado previamente, estos últimos puntos están muy influidos por la entrada de aguas ácidas del río más caudaloso, y de ahí la presencia de *Erica andevalensis* en la ribera de arroyo de Tía Sebastiana. De hecho, entre los puntos MJ5-MJ7-MJ8-MJ9 la variación de pH es 2,3-3,1 y la de EC se sitúa entre 2,52-6,00, siendo el valor más elevado el que corresponde al punto de encuentro entre ambos ríos.

Es importante destacar las diferencias de las agrupaciones muestrales según se consideren o no las diatomeas presentes en los cursos de agua investigados. Las comunidades de diatomeas registran cierta estabilidad en función de sus ciclos de vida y de su tasa de renovación, mientras que los parámetros físico-químicos son muy inestables al estar influidos por numerosas variables entre la que destacamos la pluviometría y temperatura, además de las derivadas de las paragénesis minerales en el caso de aguas afectadas por AMD, las propiedades de los materiales encajantes, la presión antrópica, etc. Los cambios ambientales deben de prolongarse en el tiempo para que las comunidades de diatomeas se estabilicen en función de su tolerancia/sensibilidad a diversos parámetros físico-químicos. Las comunidades de diatomeas muestran una elevada resiliencia frente a los cambios ambientales mediante su rápida reproducción y recolonización de las zonas de crecimiento (Townsend et al., 1997).

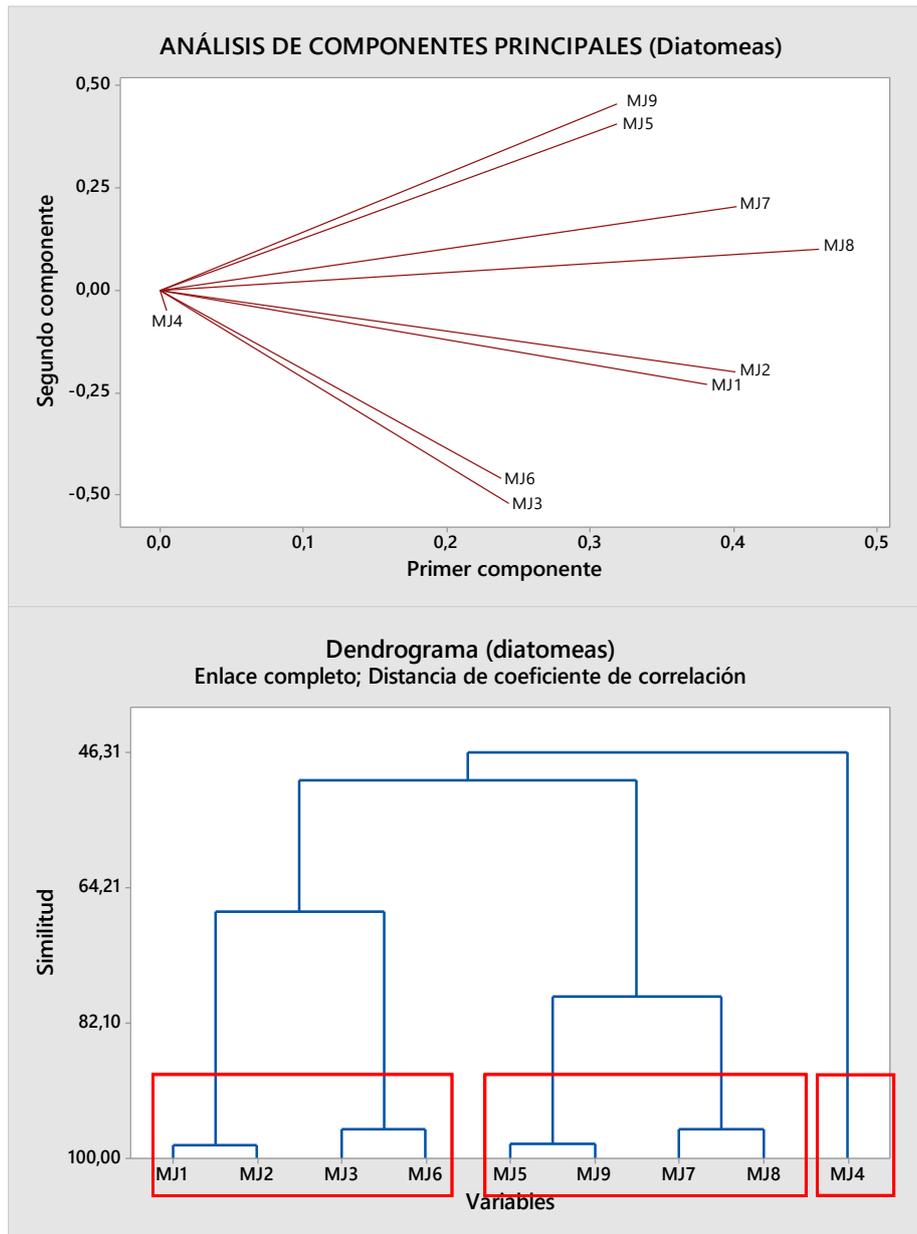


Figura 28. Análisis multivariante de las especies de diatomeas. (A) Análisis de componentes principales; (B) Análisis de aglomerados.

En el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), basado sobre el índice de similitud de Bray-Curtis, y tomando como criterio el pH para la formación de agrupaciones de diatomeas (Figura 29), se observa la formación de dos grupos de comunidades de diatomeas, el primer grupo se encuentra por encima del pH 4 pertenecientes a las muestras MJ2, MJ4, MJ6, MJ3; y el segundo grupo por debajo de pH 4 de las muestras MJ7, MJ1, J8, MJ9, MJ5.

También se realizó un estudio sobre la correlación de Spearman en las diatomeas más abundantes en función del pH, conductividad (EC) y potencial redox

(Eh). Se observa una alta correlación negativa ($r > [0,6]$) con el pH donde predominan *Pinnularia acidophila* (PACI), *Pinnularia aljustrellica* (PALJ) y *Pinnularia subcapitata* (PSCA); mientras que, en función de EC y Eh presentan correlación positiva ($r > 0,8$). En cuanto a la especie *Achnanthis minutissimum* (ADMI), *Eunotia exigua* (EEXI), *Gomphonema lagenula* (GLGN), *Melosira varians* (MVAR), *Nitzschia acidoclinata* (NACD), *Nitzschia palea* (NPAL), *Planothidium frequentissimum* (PLFR) la correlación es positiva ($r > 0,2$) con el pH; en función de EC y Eh presentan correlación negativa ($r > [0,2]$) (Figura 30 A, B, C).

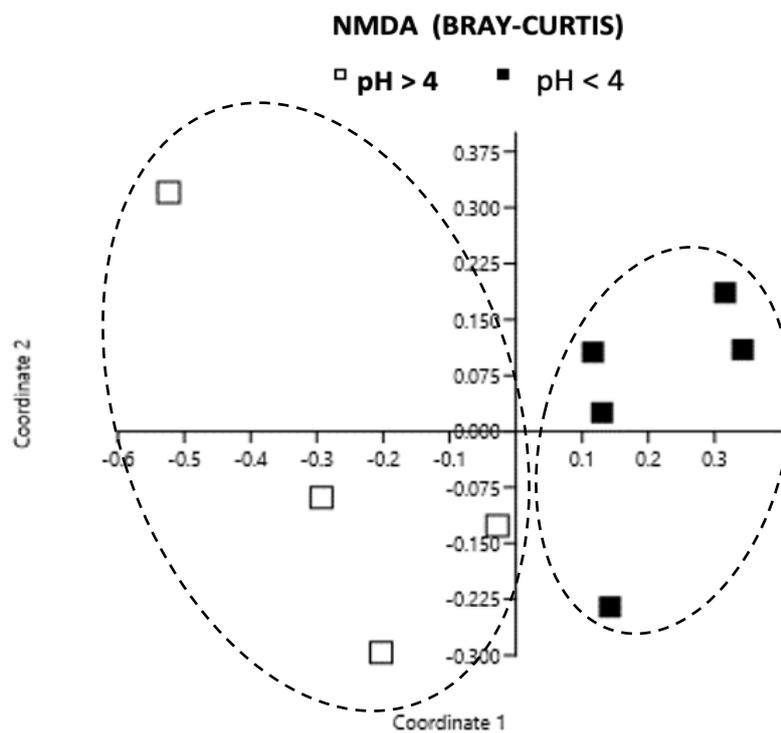


Figura 29. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado sobre el índice Bray-Curtis, donde se tomó en cuenta el criterio del pH para representar la formación de grupos de diatomeas.

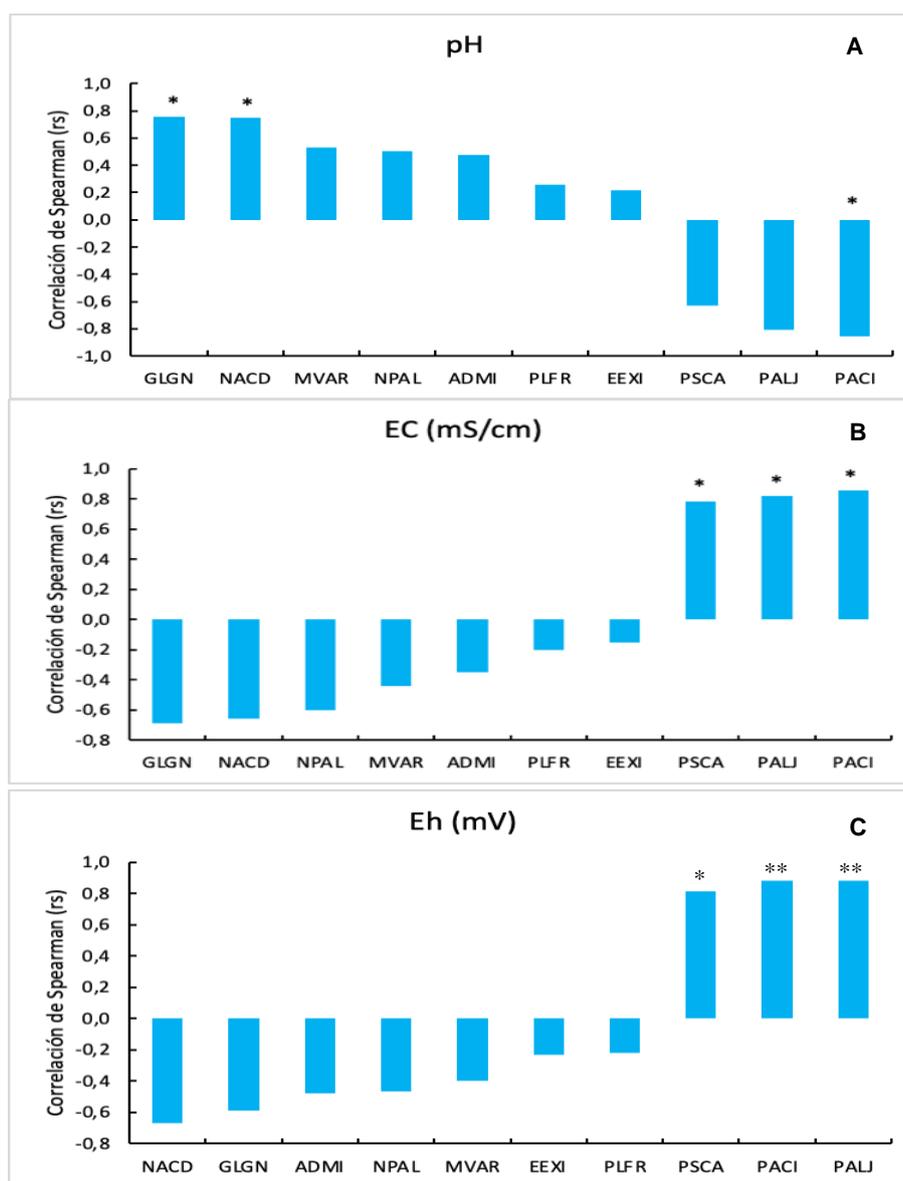


Figura 30. Representación de la Correlación de Spearman teniendo en cuenta las especies de diatomeas en función del pH (A), en función de EC (mS/cm) (B), y en función de Eh (mV) (C). (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$).

Al estar descritas aproximadamente 20.000 especies, la identificación de cada especie es la parte más compleja del estudio ya que estas se diferencian mediante sus características morfológicas, aunque también se considera la autoecología puesto que estos seres vivos actúan como biosensores naturales y permanentes de la calidad del agua.

Para el análisis de las comunidades de diatomeas se considera la frecuencia y abundancia de cada taxón. Al respecto, las especies más abundantes en el estudio son del género *Eunotia exigua* que es indicador de aguas en condiciones ácidas generados por actividades antropogénicas (Alles et al., 1991). En la FPI, *E. exigua* ha sido observada en ríos afectados por AMD a pH inferiores a 4 (Whitton y Díaz, 1980; Urrea y Sabater, 2009; Fernández et al. 2018; Suárez et al., 2018; Leiva et al., 2020).

De Nicola (2000), en una revisión sobre diatomeas de aguas ácidas, señala que *E. exigua* se desarrolla en un margen de pH entre 2,2 y 3,3. Sin embargo, en este trabajo se muestra que *E. exigua* se desarrolla en un amplio rango de pH (2,3-7,6) y de conductividad (0,29-3,6 mS/cm). En un artículo sobre ríos de Galicia se proporcionan valores óptimos de pH 6,3 y conductividad de 38,5 μ S/cm para las poblaciones de *E. exigua* (Leira et al., 2017). Por otra parte, Lorin y Cambra (2007) hallan a *E. exigua* en aguas de ríos del norte de España a pH entre 4,4-7,4 con márgenes de conductividad entre 17,4 y 518 μ S/cm. Por tanto, *E. exigua* debe ser considerada como especie acidobionte, mejor que acidófila, al tolerar amplias variaciones de pH y de conductividad., si bien su pH óptimo de crecimiento es <5,5 (Van Damm et al., 1994). En el listado general de especies de diatomeas de la Península Ibérica (ID-TAX), *E. exigua* se describe como una especie acidobionte (Blanco et al., 2012), y presenta valores bajos ($r < 0,3$) de correlación en cuanto a los parámetros de conductividad y potencial redox.

Obsérvese que las especies propiamente acidófilas descritas en este trabajo son del género *Pinnularia*, concretamente, *P. acidophila*, *P. aljustrellica* y *P. subcapitata*, estas especies han sido previamente descritas en un trabajo de investigación llevado a cabo por Leiva et al. (2020). En otro estudio llevado a cabo en aguas procedentes de la FPI hallaron como diatomeas abundantes a los mismos géneros de *Pinnularia* a un pH <3 (Valente et al., 2016). Este género de diatomeas también ha sido hallado en ambientes similares en un estudio realizado por Rivera et al. (2019) Por lo tanto, la taxocenosis encaja con el patrón de contaminación minera que caracteriza a estas aguas.

Achnantheidium minutissimum, ha sido identificada en aguas ligeramente ácidas (MJ3, MJ6) como en la investigación llevada a cabo en la cuenca del Río Odiel donde *A. minutissimum* fue la especie más frecuente de un total de 102 especies de diatomeas identificadas (Leiva et al., 2020).

También se observó la presencia de determinadas especies del género *Nitzschia* que generalmente están presentes en ambientes eutróficos. En este trabajo se ha detectado la presencia de *Nitzschia palea* que se desarrolla en ambientes donde la literatura resulta ser muy ambigua. Van Dam et al. (1994) menciona que es una especie saprótrofa, polisapróbica e hipereutrófica, mientras que el ID-TAX la describe como dulceacuícola, neutrófila, polisapróbica, hipereutrófila y subaérea. Por otro lado, Cholnoky (1962) considera a *N. palea* como una especie característica de ecosistemas eutróficos alcalinos y que prefieren lugares oxigenados; características que concuerdan con las muestras de aguas neutras (MJ2, MJ4) presentes en este estudio. En cuanto a *Nitzschia acidoclinata* se ha descrito que prefiere aguas ligeramente ácidas con bajos niveles de conductividad y bajo niveles de nutrientes (Bahls, 2016); mostrándose características similares a nuestros resultados.

Estudios realizados han demostrado que *Gomphonema lagenula* es una especie tolerante a la contaminación, presenta débil adherencia al sustrato por lo que prefieren ambientes en zonas con bajo caudal (Michels, 1998; Ramírez y Plata-Díaz, 2008). Otros estudios llevados a cabo por Urrea-Clos y Sabater (2009) en las cuencas de ríos ácidos Tinto y Odiel y río alcalino Piedras, indican que una de las diatomeas más abundantes en aguas neutras fue *Planothidium frequentissimum*. En cuanto a *Melosira varians* que fue hallada en este estudio y también reportada en el estuario del río Ebro, España, se considera que esta especie es indicadora de ambientes bien oxigenados, llegando a ser catalogada como especie eutrófica por su tolerancia a gran cantidad de ambientes (Quesada, 2018; Rovira et al., 2012)

4.4. Índices de Biodiversidad

La tabla 3 muestra los índices de diversidad que se calcularon del conjunto de datos de las diatomeas identificadas.

	RIQUEZA (S)	DOMINANCIA (1-D)	DIVERSIDAD (H')	UNIFORMIDAD (J)
MJ1	2	0,3569	0,5423	0,7823
MJ2	14	0,7025	1,611	0,6103
MJ3	5	0,5328	0,8987	0,5584
MJ4	25	0,8625	2,392	0,7433
MJ5	5	0,6362	1,193	0,7411
MJ6	12	0,731	1,625	0,6537
MJ7	22	0,6511	1,601	0,5178
MJ8	15	0,7352	1,666	0,6154
MJ9	6	0,5715	0,9884	0,5517

Tabla 3. Valores de los índices de diversidad en función del punto de muestreo.

Se puede observar que la riqueza es mayor en puntos menos afectados por AMD. La dominancia de Simpson (1-D) apenas discrimina las muestras. El mayor valor del índice de Shannon corresponde al punto muestreo de aguas más limpias (MJ4); en aguas más o menos contaminadas por AMD su valor oscila entre 1 y 1,6, con la excepción del valor obtenido para el arroyo Valdeoscuro antes de recibir las aguas de la EDAR, cuyo valor fue el más bajo, dado que su riqueza es también extremadamente baja. Con el índice de Pielou se pretende saber si en una muestra todas las especies están igualmente representadas, por lo que, al presentar un valor de 1 es cuando todas las especies son igual de abundantes; a aproximarse a 0, las especies son menos equitativas. Los rangos observados oscilan entre 0,5 y 0,8 sin que se aprecie una clara asociación con el grado de afectación por AMD.

Para calcular la diversidad beta se aplicó el índice Whittaker, que indica el cambio de comunidades de diatomeas a lo largo de gradientes geográficos o ambientales. En este trabajo, se obtuvieron los resultados reflejados en la tabla 4. Se observa que entre las muestras MJ1-MJ5-MJ9 (las más afectadas por AMD) y la muestra MJ4, la más limpia, más del 80% de las especies han cambiado. La incidencia del agua procedente de la EDAR es muy elevada dado que se produce un recambio del 75% entre las muestras MJ1 y MJ2. La contunidad de las propiedades de la Ribera de Agustín, el río más afectado por AMD de los estudiado, se manifiesta en que los puntos MJ5 Y MJ9 apenas presentan una variación del 9% en las comunidades de diatomeas.

Muestra	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6	MJ7	MJ8	MJ9
MJ1		0,75	0,42857	0,85185	0,42857	0,71429	0,83333	0,76471	0,5
MJ2			0,57895	0,48718	0,68421	0,53846	0,66667	0,58621	0,7
MJ3				0,8	0,6	0,64706	0,77778	0,7	0,63636
MJ4					0,8	0,45946	0,57447	0,55	0,80645
MJ5						0,52941	0,7037	0,6	0,090909
MJ6							0,52941	0,25926	0,55556
MJ7								0,40541	0,71429
MJ8									0,61905

Tabla 4. Matriz de valores relativos del índice de Whittaker

Considerando los índices de diversidad además del pH, conductividad (EC) y potencial redox (Eh) (Tabla 5) se realizó un análisis de la correlación de Pearson. Se observa que ningún índice presenta correlación con los factores físico-químicos, lo que confirma (eg. Leiva et al., 2020) que los índices carecen de utilidad práctica cuando se comparan comunidades de diatomeas ya que las poblaciones son muy heterogéneas. Sin embargo, el índice de dominancia muestra una correlación muy significativa ($p < 0,001$) con el índice de riqueza. El índice de diversidad tiene una correlación muy significativa ($p < 0,001$) con el índice de riqueza y dominancia. En cuanto los parámetros físico-químicos la conductividad (EC) muestra una correlación significativa ($p < 0,05$) con el pH, mientras que el potencial redox (Eh) presenta una correlación muy significativa y significativa con el pH y EC respectivamente, como se ha comentado en previamente en este trabajo.

	RIQUEZA (S)	DOMINANCIA (1-D)	DIVERSIDAD (H')	UNIFORMIDAD (J)	pH	EC	Eh
RIQUEZA (S)		0,0099136	0,00058394	0,61614	0,18395	0,47962	0,14452
DOMINANCIA (1-D)	0,79821		2,61E-05	0,79041	0,1618	0,67289	0,16327
DIVERSIDAD (H')	0,91313	0,96476		0,90305	0,10447	0,45451	0,091309
UNIFORMIDAD (J)	-0,19445	-0,10381	-0,047679		0,9346	0,38178	0,93814
pH	0,48671	0,50887	0,57611	0,032133		0,036158	7,35E-06
EC	-0,27158	-0,16421	-0,28668	-0,33263	-0,69898		0,046193
Eh	-0,5274	-0,50734	-0,59455	-0,030387	-0,97555	0,6747	
p<0,001		p<0,01			p<0,05		

Tabla 5. Matriz de correlación de Pearson entre los índices de diversidad. Se muestran los valores de r. Los colores indican el grado de significación.

Finalmente, considerando tanto los parámetros físico-químicos: pH, conductividad (EC), potencial redox (Eh), como los índices de diversidad de las poblaciones de diatomeas: riqueza (S), Simpson (1-D), Shannon (H') y Pielou (J), y las comunidades de diatomeas más abundantes en las zonas de muestreo, se realizó un análisis de componentes principales (basados en la r de Pearson). Con estos datos se generó la siguiente gráfica (Figura 31), donde se puede observar que hay una correlación inversa entre pH y Eh puesto que a mayor pH menor Eh, mientras que entre EC y Eh hay correlación positiva. Se puede apreciar que el pH tiene una relación próxima a la riqueza (S) y a los índices de diversidad de Shannon (H') y de uniformidad de Pielou (J). En el mismo cuadrante donde se hallan los vectores de H' y de J se localizan la mayoría de las diatomeas de aguas no afectadas y con bajo AMD. A medida que el pH aumenta, el valor de los índices también mejora, es decir que hay más diversidad, más riqueza y más equitabilidad de las especies. En cuanto a la conductividad (EC) y potencial redox (Eh) se observa que están más vinculados a las diatomeas de aguas afectadas con AMD pertenecientes al género *Pinnularia*. Sin embargo, en el caso de *E. exigua*, al ser una especie acidobionte, su situación en un cuadrante independiente revela su elevada tolerancia a las variaciones de pH, EC y/o Eh.

En el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en el índice Bray-Curtis, se pueden observar dos agrupaciones claramente diferenciables en función del grado de afectación por AMD. El análisis ANOSIM indicó que ambos grupos difieren entre sí muy significativamente ($p=0,0064$).

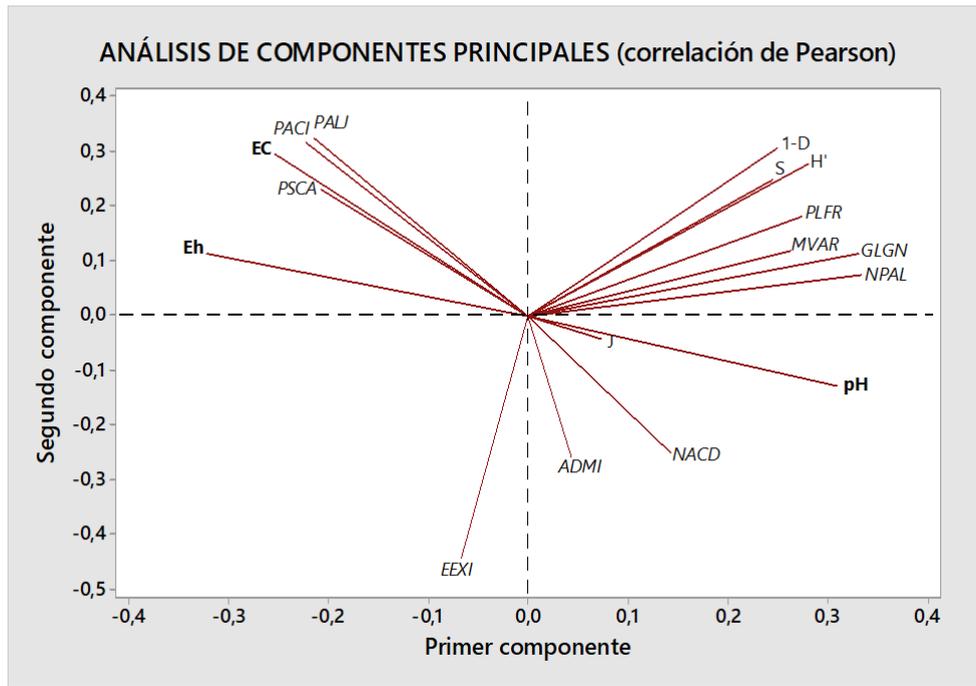


Figura 31. Análisis de componentes principales integrado los datos físico-químicos, índices de diversidad y diatomeas.

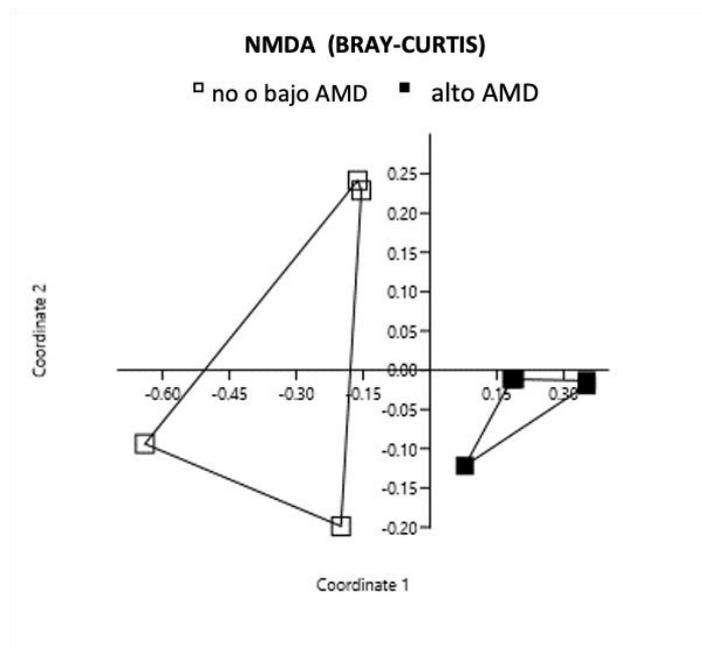


Figura 32. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico basado sobre el índice Bray-Curtis, integrado los datos físico-químicos, índices de diversidad y diatomeas.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha confirmado la utilidad y eficacia de aplicar la metodología establecida conforme a la Norma Europea UNE-EN 13946:2014 para la recolección, tratamiento, identificación y recuento de muestras de diatomeas.
2. Factores como la concentración de metales, acidez de las aguas y conductividad han influenciado en la presencia de poblaciones de diatomeas. Se han identificado 44 especies de diatomeas con una distribución muy heterogénea y en ciertos casos poco frecuente en aguas afectadas o no afectadas por AMD.
3. Las especies de diatomeas asociadas a cursos de aguas afectadas por AMD denominadas acidófilas son del género *Pinnularia*: *P. acidophila*, *P. aljustrellica* y *P. subcapitata*. En aguas de baja acidez o neutras se hallaron a, *Achnanthis minutissimum*, *Melosira varians*, *Gomphonema lagenula*, *Melosira varians*, *Nitzschia acidoclinata*, *Nitzschia palea* y *Planothidium frequentissimum*. Mientras que *Eunotia exigua* al ser acidobionte y de elevada tolerancia, se halló tanto en aguas afectadas y no afectadas por AMD.
4. Se ha demostrado que el efluente derivado de la EDAR de Alosno es capaz de alterar y mejorar sensiblemente las condiciones de un río afectado por AMD, obteniéndose cambios significativos en los parámetros físico-químicos, concentración de metales y en la composición de la comunidad de diatomeas.
5. Los parámetros físico-químicos nos han proporcionado una información puntual de lo que sucede en las aguas vinculadas al entorno de la Mina de Tharsis, mientras que las diatomeas, al actuar como biosensores naturales permanentes, son una herramienta útil que nos han brindado información mucho más precisa sobre el estado ecológico de los cauces en estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aduvire, O. (2006a). Drenaje Ácido de Mina. Instituto Geológico y Minero de España Dirección de Recursos Minerales y Geoambiente, 140.
- Aduvire, O. (2006b). Drenaje Ácido de mina generación y tratamiento. Instituto Geológico y Minero de España Dirección de Recursos Minerales y Geoambiente, 140.
- Alles, E., Nörpel-Schempp, M., y Lange-Bertalot, H. (1991). Taxonomy and ecology of characteristic Eunotia species in headwaters with low electric conductivity. *Nova Hedwigia*, 53, 171-213.
- Almodóvar, G., Sáez, R., Toscano, M., Moreno, C., Donaire, T., Nieto, J., Gonzalez, F., Yesares, L., y Pascual, E. (2012). La Faja Piritica Iberica. Hidrotermalismo submarino de hace mas de 350 millones de años. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*, 20, 210-212.
- Bahls, L. (2016). *Nitzschia acidoclinata* | Species—Diatoms of North America. https://diatoms.org/species/nitzschia_acidoclinata
- Bahls, L., Boynton, B., y Johnston, B. (2018). Atlas of diatoms (Bacillariophyta) from diverse habitats in remote regions of western Canada. *PhytoKeys*, 105, 1-186.
- Barjau, E. (2012). Estructura comunitaria y diversidad taxonómica de los peces en la bahía de la paz y la Isla de San José, Golfo de California. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Blanco Lanza, S., Cejudo Figueiras, C., Álvarez Blanco, I., Bécares Mantecón, E., Hoffmann, L., y Ector, L. (2010). Atlas de las diatomeas de la Cuenca del Duero = Diatom atlas of the Duero Basin. Universidad de León.
- Blanco, S. (2015). Diatomeas: bioindicación en aguas dulces e invasiones biológicas (p. 1). Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León.
- Blanco, S., Álvarez, R., y Corrochano, A. (2012). Id-Tax. Catálogo y claves de identificación de organismos fitobentónicos utilizados como elementos de calidad en las redes de control del estado ecológico. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España.

- Blanco, S., Barrios, E., Puig, A., Ruza, J., Alvarez Troncoso, R., Ventosa, M., Ávila, R., Codorníu, A., Rodríguez-Carreño, B., y Fernández, R. (2012). Id-tax. Catálogo y claves de identificación de organismos fitobentónicos utilizados como elementos de calidad en las redes de control del estado ecológico.
- Blanco, S., Bécares, E., Hernández, N., y Ector, Y. L. (2007). Evaluación de la calidad del agua en los ríos de la cuenca del Duero mediante índices diatomológicos. 5.
- Bozarth, A., Maier, U.-G., y Zauner, S. (2009). Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 195-201.
- Canizal, A. (2009). Catálogo ilustrado de diatomeas dulceacuícolas mexicanas. [Universidad Nacional Autónoma de México]. http://repositorio.fcencias.unam.mx:8080/jspui/bitstream/11154/139763/1/PDF_unificado.pdf
- Carmona, V., y Carmona, T. (2013). La diversidad de los análisis de diversidad. *Bioma*, 14, 20-28.
- Carro, B., Borrego, J., López-González, y Lozano-Soria. (2006). Procesos de Mezcla de un estuario afectado por drenaje de aguas ácidas (Ría de Huelva, España). *GEOGACETA*, 39, 4.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K., y Vyverman, W. (2004). Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology*, 237, 91-154.
- Cholnoky, B. J. (1962). Beiträge zur Kenntnis der Ökologie der Diatomeen in Ost-Transvaal. *Hydrobiologia*, 19, 57-119.
- Coste, M., y Tison-Rosebery, J. (2011). Guide iconographique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomée 2007 (p. 241) [Report, irstea]. <https://hal.inrae.fr/hal-02595261>
- De Nicola, D.M. (2000). A review of diatoms found in highly acidic environments. *Hydrobiologia* 433: 111-122
- Espinosa, E. (2003). Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos: ciencia y cultura*, 5.

- Fernández, M.R., Martín, G., Corzo, J., et al. (2018) Design and Testing of a New Diatom-Based Index for Heavy Metal Pollution. *Arch Environ Contam Toxicol* 74: 170-192
- Ficklin, W.H., Plumlee, G.S., Mchugh, J.B., 1992. Geochemical classification of mine drainages and natural drainages in mineralized areas. *Proceedings of the 7th international symposium on water - rock interation*, Park City, Utah.
- García Nieto, M. H. (2014). Aportaciones sobre las distribuciones del bastón roto y de pielou [Universidad de Salamanca]. <https://doi.org/10.14201/gredos.125453>
- González, R. M., Cánovas, C. R., & Olías, M. (2019). Evaluación de la carga de tierras raras (REE) en los lixiviados ácidos de las minas de Tharsis (Huelva). *Macla* no 24, 2.
- Grande, J. A. (2016). Drenaje ácido de Mina en la Faja Pirítica Ibérica—Técnicas de estudio e inventario de explotaciones. (Universidad de Huelva). <http://www.uhu.es/publicaciones/?q=libros&code=949>
- Hilaluddin, F., Leaw, C.-P., y Lim, P.-T. (2011). Morphological Observation of Common Pennate Diatoms (Bacillariophyceae) from Sarawak Estuarine Waters. 11, 12.
- Illana, C. (2008). Usos Industriales de las algas diatomeas (p. 6). Facultad de Biología - Universidad de Alcalá.
- ISPRA, I. S. per la P. e la R. A. (s. f.). Cosa sono le Diatomee. Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. Recuperado 18 de agosto de 2021, de <https://www.isprambiente.gov.it/it/banche-dati/banche-dati-folder/acque-interne/atlante-delle-diatomee-bentoniche-dei-corsi-dacqua-italiani/informazioni-general-1/cosa-sono-le-diatomee-1>
- Julius, M., y Theriot, E. (2010). The Diatoms: A primer. En *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences* (pp. 8-22).
- Kihara, Y., Tsuda, K., Ishii, C., Ishizumi, E., y Ohtsuka, T. (2015). Periphytic diatoms of Nakaikemi Wetland, an ancient peaty low moor in central Japan. *The Japanese Society of Diatomology*.
- Kooistra, W., Gersonde, R., Medlin, L., y Mann, D. (2007). The Origin and Evolution of the Diatoms: Their Adaptation to a Planktonic Existence. *Evolution of Primary Producers in the Sea*, 207-249.

- Lane. (2005). The use of diatoms as biological indicators of water quality, and for environmental reconstruction, in south-east Tasmania, Australia. University of Tasmania.
- Leira, M., López-Rodríguez, M., y Carballeira, R. (2017). Epilithic diatoms (Bacillariophyceae) from running waters in NW Iberian Peninsula (Galicia, Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 74(2), 062.
- Leiva, M., Bryka, K., Romero, S., Santisteban, M., Dávila, J., Sarmiento, A., Córdoba, F. (2020). Diatoms of the Odiel river basin: distribution according to the degree of pollution by Acid Mine Drainage. *Comunicações Geológicas*. 107, Especial II, 161-166 (ICDS 9,9)
- López, A. (2004). Inmigración Portuguesa y mercado de trabajo en la Cuenca Minera ONUBENSE, 1870-1930. Depósito de Investigación Universidad de Sevilla, 17.
- Lora, M. C., Pérez, C., y López, F. (2020). Algas de Cristal; Diatomeas. *Recursos Naturales y Sociedad*, 6 (1) 25-42, 17.
- Macías, F. (2012). Estudio mineralógico y geoquímico de la optimización de un sistema de tratamiento pasivo de drenaje ácido de mina con alta carga metálica. Universidad de Huelva.
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., Vargas, C. de, Bittner, L., Zingone, A., y Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1516-E1525.
- Márquez-García, B., y Córdoba, F. (2010). Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 58-65.
- Michels, A. (1998). Use of diatoms (Bacillariophyceae) for water quality assessment in two tropical streams in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 6, 143-152.
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. 86.
- Olías, M., Nieto, J. M., Galvan, L., y Sarmiento, A. M. (2007). Sobre la calidad del agua del futuro embalse de Alcolea (Cuenca del río Odiel, Huelva). *GEOGACETA*, 42, 4.
- Quesada Martínez, Z. (2018). Evaluación de las condiciones fisicoquímicas y la composición de algas fitoplanctónicas en lagunas derivadas de la actividad

minera mecanizada en diferentes periodos de abandono, en el Municipio de Cértegui, Chocó. Universidad de Manizales.

Ramírez, A. M., y Plata-Díaz, Y. (2008). Diatomeas Perifíticas En Diferentes Tramos De Dos Sistemas Lóticos De Alta Montaña (páramo De Santurbán, Norte De Santander, Colombia) Y Su Relación Con Las Variables Ambientales. *Acta Biológica Colombiana*, 13(1), 199-215.

Round, F. E., Crawford, R. M., y Mann, D. G. (2007). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.

Rovira, L., Trobajo, R., Leira, M., y Ibáñez, C. (2012). The effects of hydrological dynamics on benthic diatom community structure in a highly stratified estuary: The case of the Ebro Estuary (Catalonia, Spain). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 101, 1-14.

Sánchez, C., Cristóbal, G., y Bueno, G. (2019). Diatom identification including life cycle stages through morphological and texture descriptors. *PeerJ*, 7, e6770.

Santisteban Fernández, M. (2015). Incidencia de procesos AMD en la hidroquímica de embalses afectados en la Faja Pirítica Ibérica. <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/11379>

Sarmiento, A. M. (2014). Estudio de la contaminación por drenajes ácidos de mina de las aguas superficiales en la cuenca del río Odiel (SO España). Universidad de Huelva.

Schowe, K. S., Harding, J., y Broady, P. (2012). Diatom community response to an acid mine drainage gradient. *Hydrobiologia*, 705.

Suarez, F. (2018). Las diatomeas como organismos bioindicadores de aguas afectadas por drenaje ácido de mina. Trabajo Fin de Máster (Dir F. Córdoba y A.T. Luis). Universidad de Huelva. pp70

Tharsis Mining. (2019). Tharsis. Tharsis Mining. <https://tharsismining.com>

Townsend, C.R., Dolédec, S. y Scarsbrook, M.R. (1997). Species traits in relation to temporal and spatial heterogeneity in streams: a test of habitat templet theory, *Freshwat. Biol.*, 37, 367-387.

Urrea-Clos, G., y Sabater, S. (2009). Comparative study of algal communities in acid and alkaline waters from Tinto, Odiel and Piedras river basins (SW Spain). *Limnetica*, 28(2), 261-272.

- Vam Dam, H., Mertens, A., y Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherland. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 28, 117-133.
- Whitton, B.A., Diaz, B.M. (1981) Influence of environmental factors on photosynthetic species composition in highly acidic waters, *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 21:3, 1459-1465.
- Wolkersdorfer, C., 2008. Chapter 9.3: Physico-chemical measurements. *Water Management at Abandoned Flooded Underground Mines: Fundamentals, Tracer Tests, Modelling, Water Treatment*, pp. 172-194. Springer, Berlín, Heidelberg.

ANEXOS

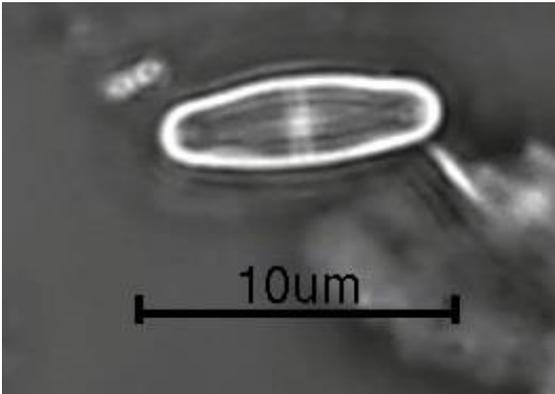
Anexo I:

<i>Especie</i>	Código OMNIDIA V 5.5	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6	MJ7	MJ8	MJ9	TOTAL
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	ADMI	0	2	230	0	0	182	0	1	0	415
<i>Amphora strigosa</i>	SMST	0	0	0	18	0	1	1	1	0	21
<i>Aulacoseira sp.</i>	AUSP	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Brachysira sp.</i>	BSP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Cocconeis placentula</i>	CPLA	0	0	0	0	0	0	13	5	0	18
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	CMEN	0	4	0	9	0	0	0	5	0	18
<i>Cymbella turgidula</i>	CTGL	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
<i>Diploneis oblongella</i>	DOBL	0	1	0	5	0	0	0	0	0	6
<i>Eunotia exigua</i>	EEXI	307	192	147	2	43	69	66	121	9	956
<i>Eunotia implicata</i>	EIMP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Fragilaria pinnata</i> <i>var.lancettula</i>	FPLA	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Gomphonema affine</i>	GAFF	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
<i>Gomphonema angustatum</i>	GANG	0	0	0	6	0	1	0	1	0	8
<i>Gomphonema naviculoides</i>	GGRA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

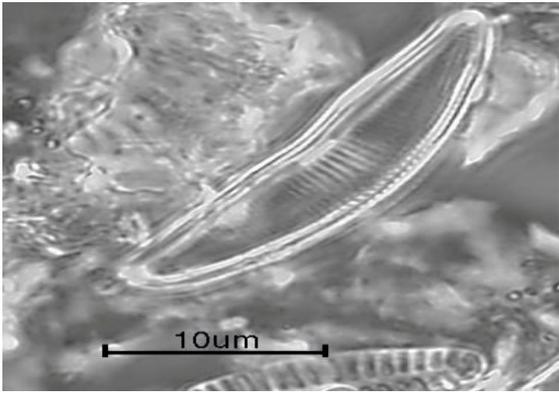
<i>Gomphonema lagenula</i>	GLGN	0	18	0	64	0	31	4	1	0	118
<i>Hantzschia amphioxys</i>	HAMP	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Karayevia ploenensis</i>	KAPL	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Lemnicola hungarica</i>	LHUN	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Melosira varians</i>	MVAR	0	2	0	34	0	40	3	10	0	89
<i>Navicula radiosa</i>	NRAD	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10
<i>Navicula sp.</i>	NSP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Navicula symmetrica</i>	NSYM	0	1	0	8	0	0	0	0	0	9
<i>Navicula veneta</i>	NVEN	0	0	0	17	0	1	4	5	0	27
<i>Nitzschia acidoclinata</i>	NACD	0	25	11	5	0	0	1	0	0	42
<i>Nitzschia capitellata</i>	NCPL	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
<i>Nitzschia dissipata</i>	NDIS	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Nitzschia frustulum</i>	NIFR	0	17	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>Nitzschia inconspicua</i>	NINC	0	0	0	5	0	1	0	0	0	6
<i>Nitzschia nana</i>	NNAN	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Nitzschia palea</i>	NPAL	0	36	0	72	2	27	0	0	1	138
<i>Nitzschia sp.</i>	NSP	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
<i>Nitzschia umbonata</i>	NUMB	0	0	0	0	0	0	19	20	0	39
<i>Pinnularia acidophila</i>	PACI	0	0	0	0	210	0	38	54	205	507
<i>Pinnularia aljustrellica</i>	PALJ	0	0	0	0	43	2	11	13	23	92

<i>Pinnularia parvulissima</i>	PPVS	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Pinnularia subcapitata</i>	PSCA	93	90	11	13	102	43	222	155	161	890
<i>Planothidium frequentissimum</i>	PLFR	0	0	0	101	0	2	4	6	0	113
<i>Planothidium lanceolatum</i>	PTLA	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13
<i>Psammothidium sp.</i>	PSP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Stauroneis kriegeri</i>	STKR	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Stauroneis tackei</i>	STAK	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Surirella angusta</i>	SANG	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Tryblionella hungarica</i>	THUN	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
<i>Ulnaria ulna</i>	UULN	0	8	0	4	0	0	1	0	0	13
TOTAL		400	3600								

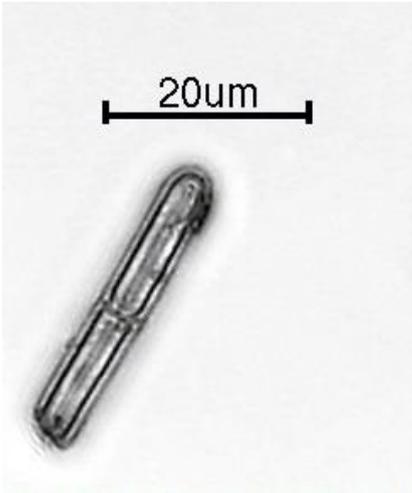
ANEXO II:



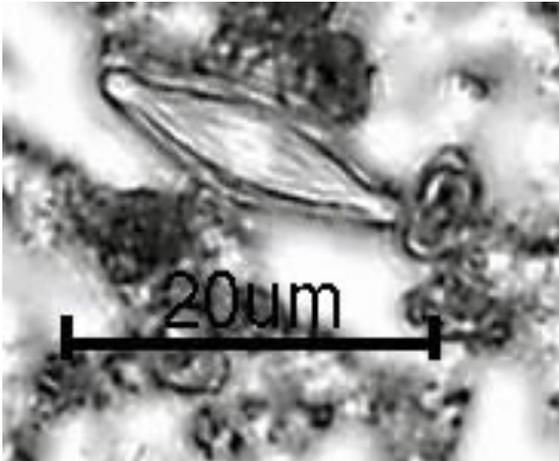
Achnanthydium minutissimum



Amphora strigosa



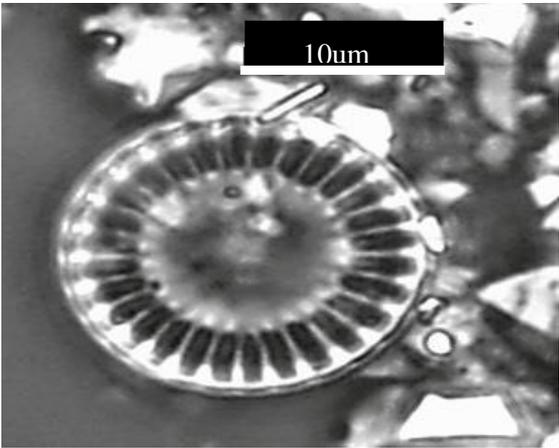
Aulacoseira sp.



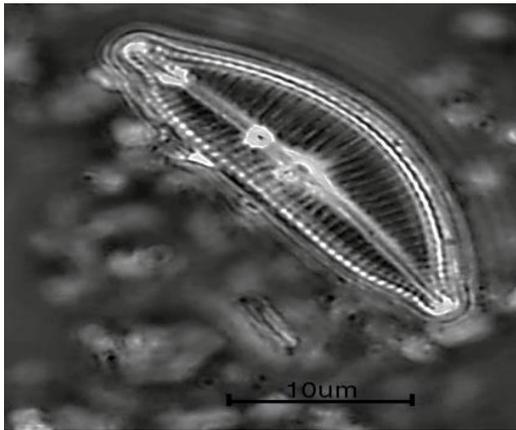
Brachysira sp.



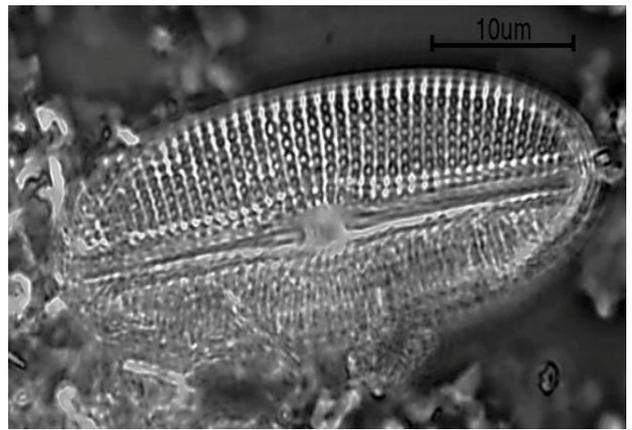
Cocconeis placentula



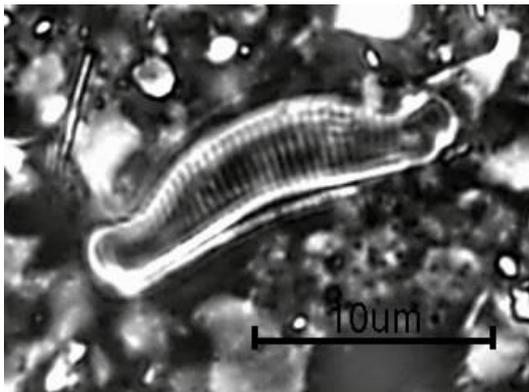
Cyclotella meneghiniana



Cymbella turgidula



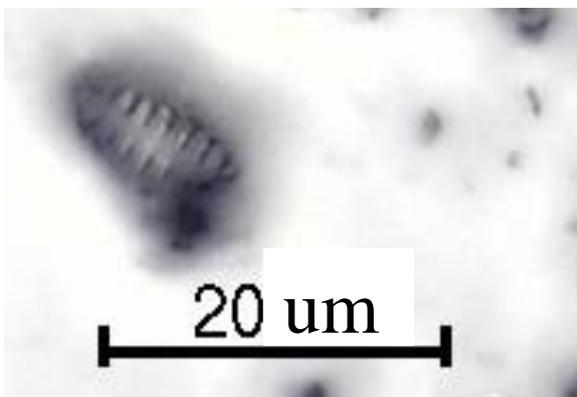
Diploneis oblongella



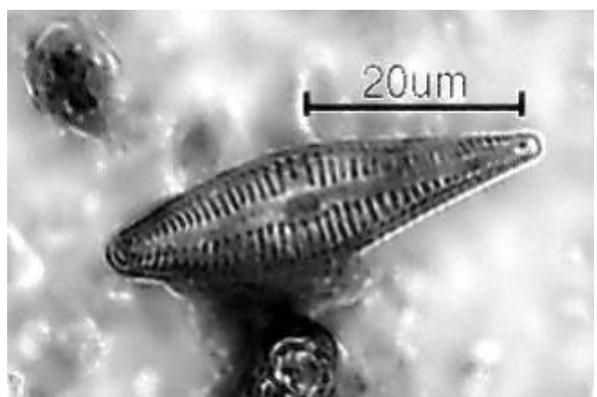
Eutonia Exigua



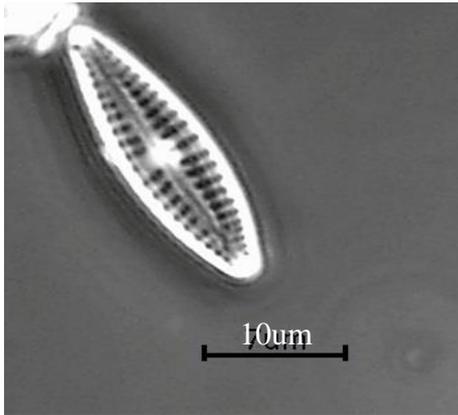
Eunotia implicata



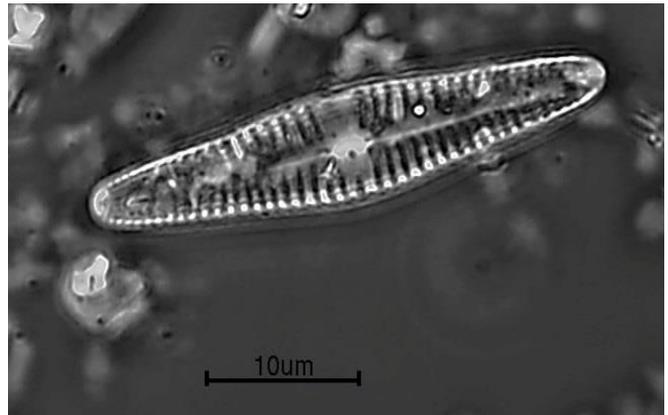
Fragilaria pinnata
var. lancettula



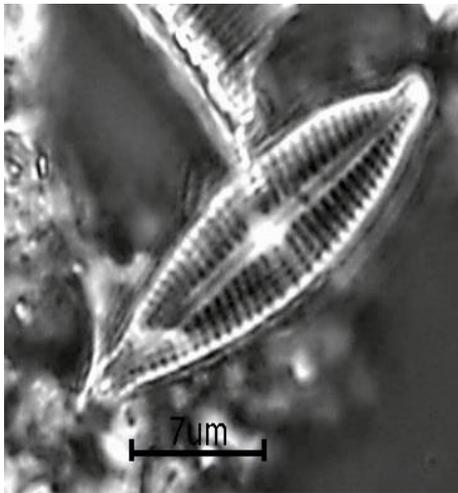
Gomphonema affine



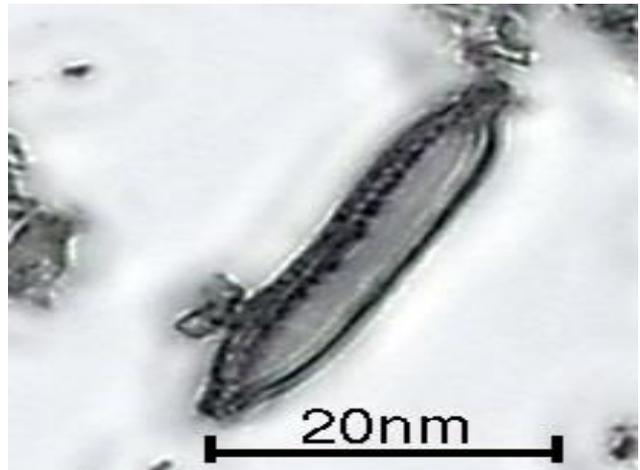
Gomphonema angustatum



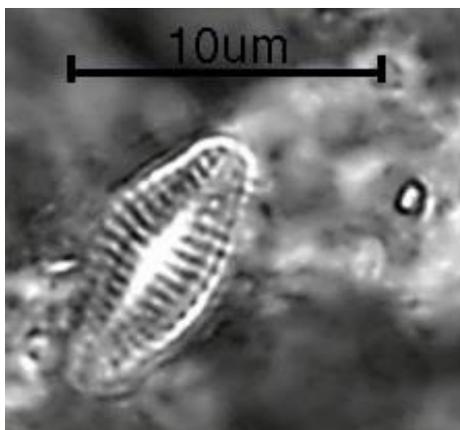
Gomphonema naviculoides



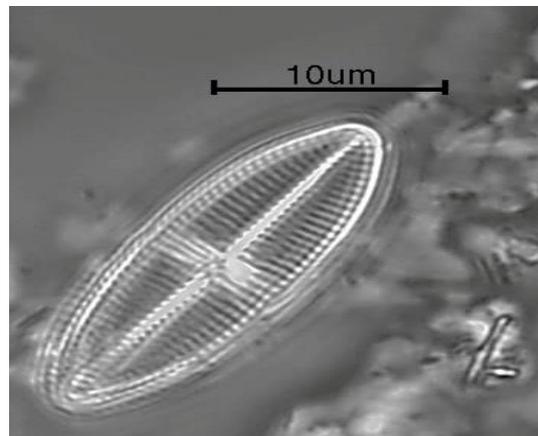
Gomphonema lagenula



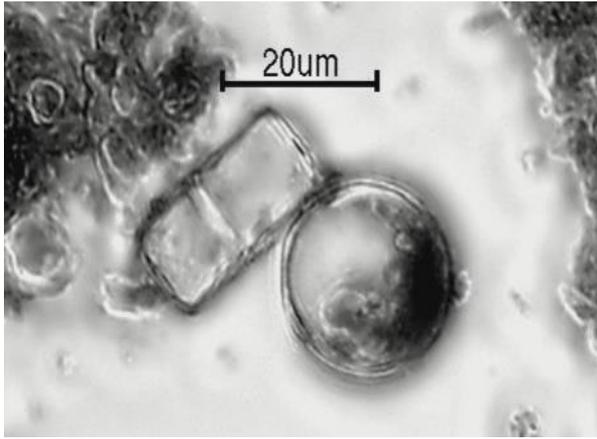
Hantzschia amphioxys



Karayevia ploenensis

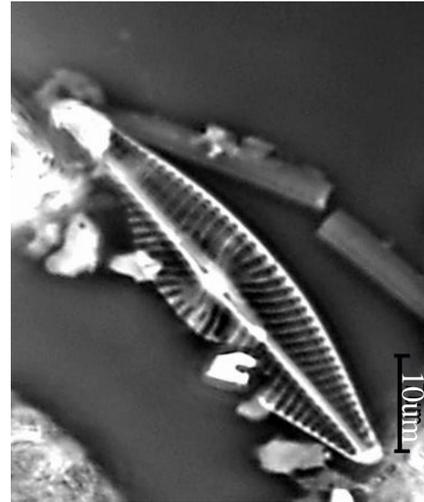


Lemnicola hungarica



Melosira varians

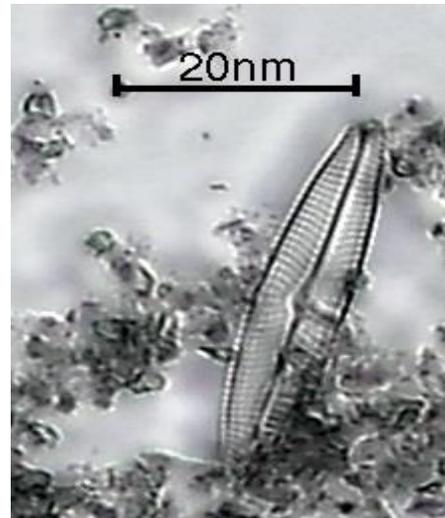
(izquierda: visión cingular ; derecha: visión



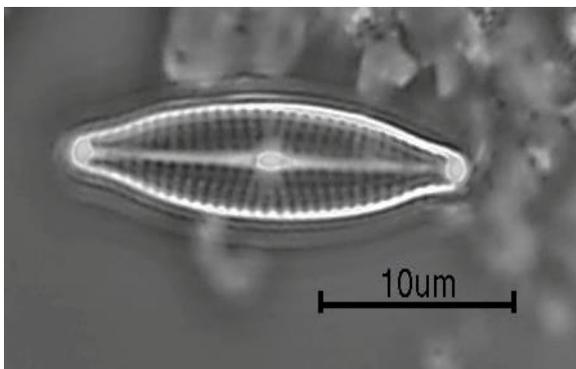
Navicula radiosa



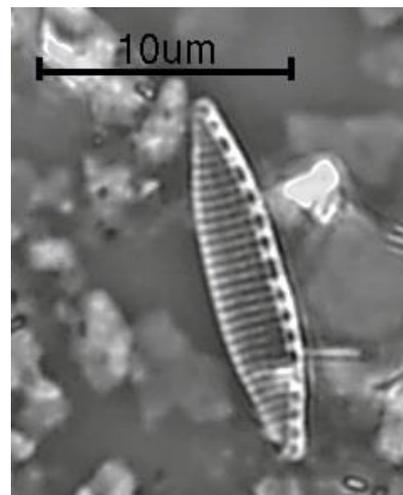
Navicula sp.



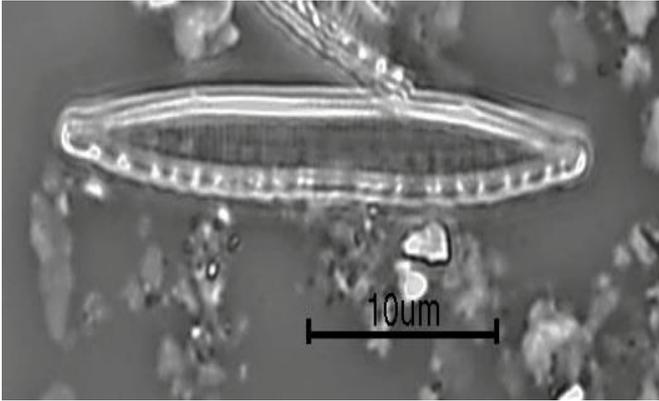
Navicula symmetrica



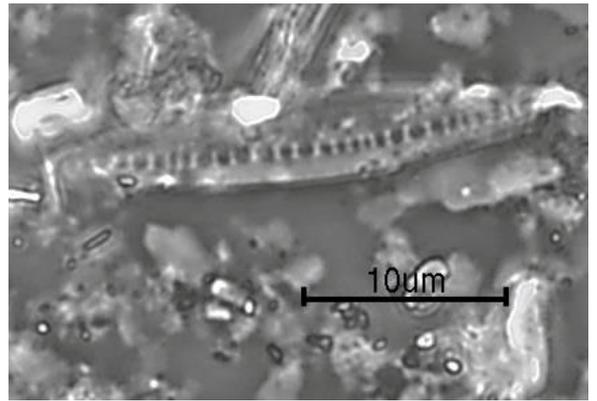
Navicula veneta



Nitzschia acidoclinata



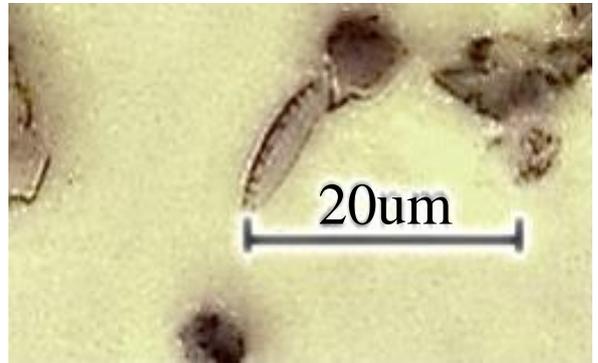
Nitzschia capitellata



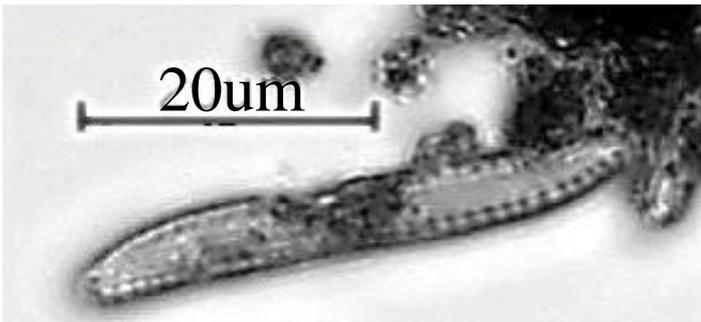
Nitzschia dissipata



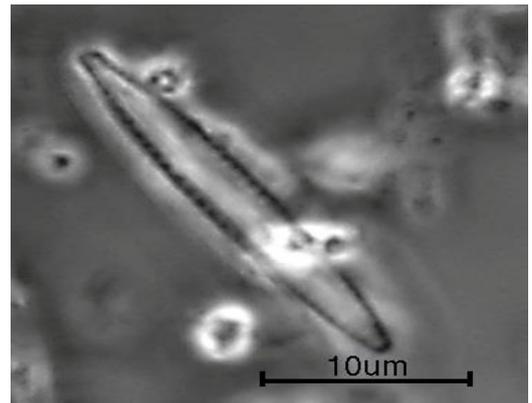
Nitzschia frustulum



Nitzschia inconspicua



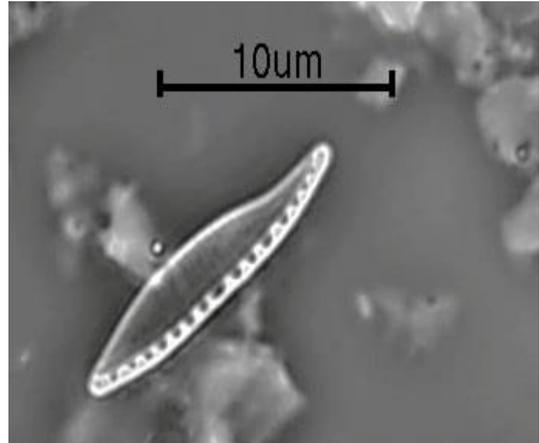
Nitzschia nana



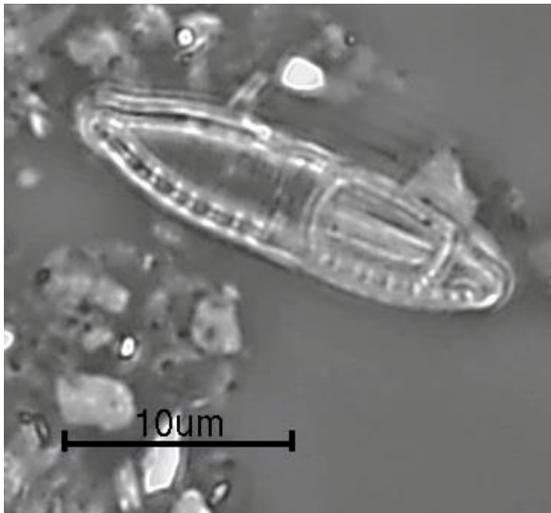
Nitzschia palea



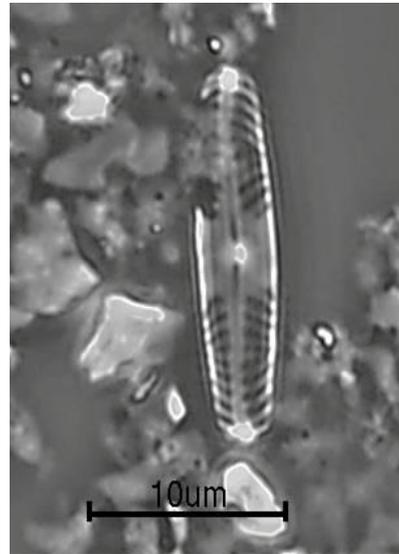
Nitzschia sp.



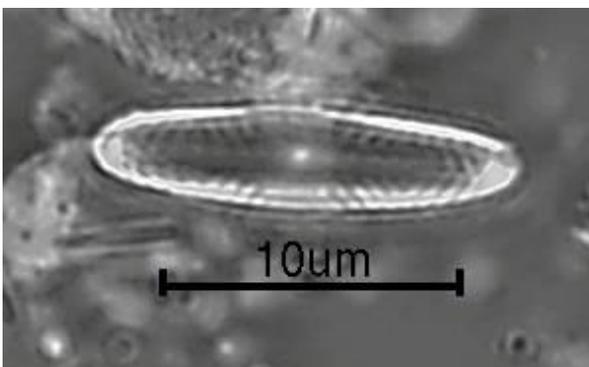
Nitzschia sp.



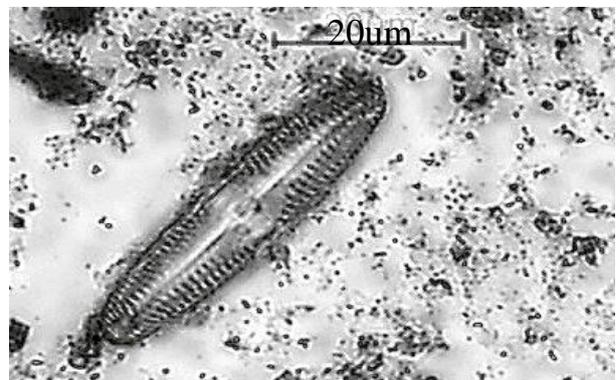
Nitzschia umbonata



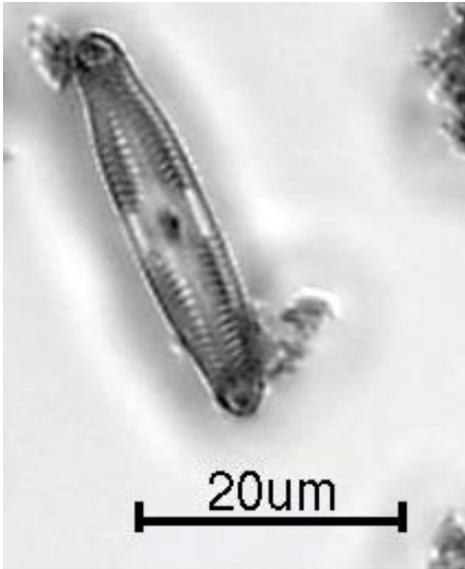
Pinnularia acidophila



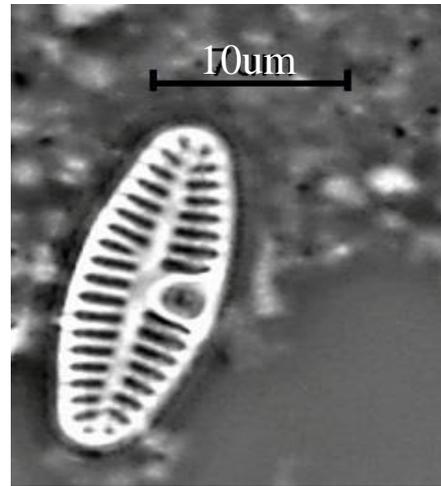
Pinnularia aljustrellica



Pinnularia parvulissima



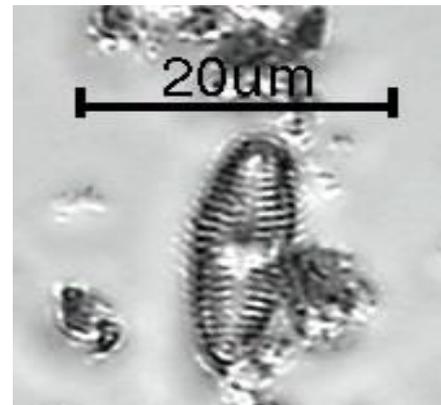
Pinnularia subcapitata



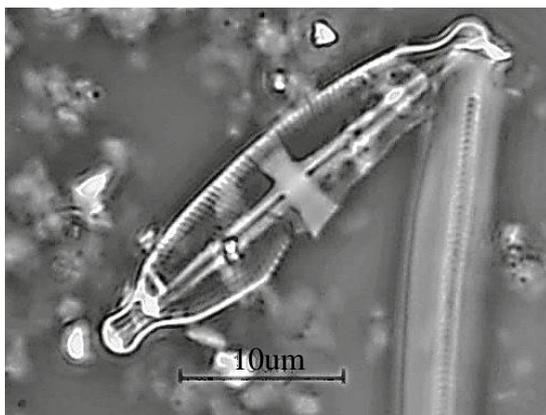
Planotidium frequentissimum



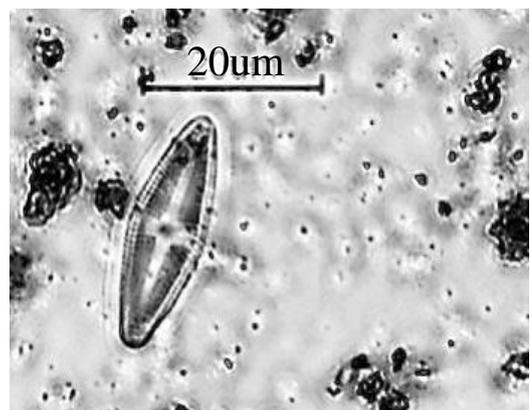
Planothidium lanceolatum



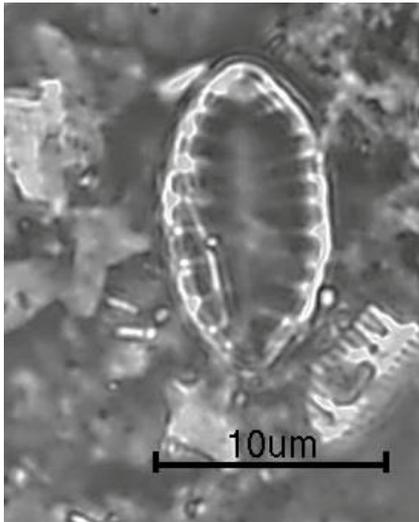
Psammothidium sp.



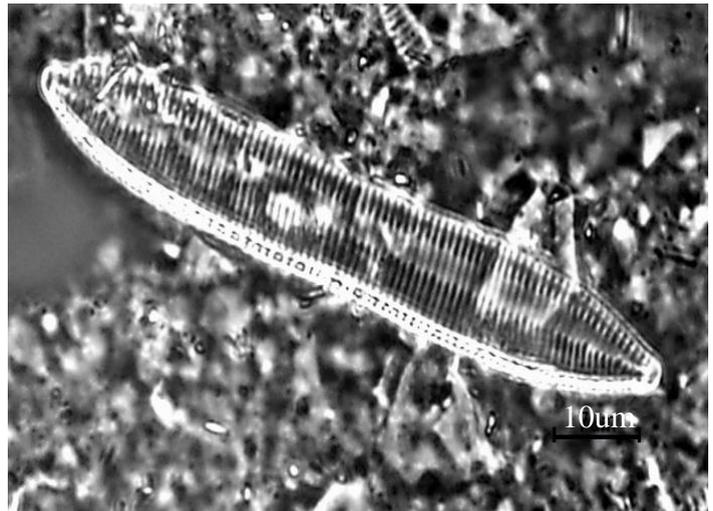
Stauroneis kriegeri



Stauroneis tackei



Surirella angusta



Tryblionella hungarica



Ulnaria ulna