



ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE LAS AGUAS DE RÍOS
Y EMBALSES DEL NORDESTE DE LA PROVINCIA DE
HUELVA BASADO EN EL USO DE DIATOMEAS
COMO BIOINDICADORES

Ángel Gutiérrez López

Trabajo entregado para la obtención del grado de Máster en
Tecnología Ambiental

Modalidad: Investigación

09 / 2023

Director:

Dr. Francisco Córdoba García

D. Francisco Córdoba García, Catedrático de Universidad,
Departamento de Ciencias Integradas de la Universidad de Huelva.

INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Análisis de la calidad de las aguas de ríos y embalses del nordeste de la provincia de Huelva basado en el uso de diatomeas como bioindicadores”** presentado por **D. Ángel Gutiérrez López**, con **D.N.I.: 77150713L**, ha sido realizado en **Departamento de Ciencias Integradas, en la sede del grupo de investigación “Respuestas y adaptaciones celulares frente al estrés ambiental”**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 17 de septiembre de 2023

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'F' followed by a surname, all enclosed within a large, sweeping oval flourish.

Agradecimientos

Transmitir mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado a lo largo de esta etapa.

En primer lugar, a mi tutor, el Doctor Francisco Córdoba García, por toda la ayuda prestada en la planificación, información y realización de este Trabajo de Fin de Máster.

En segundo lugar, a mi familia, por confiar en mí y estar siempre presentes, por apoyarme en la distancia durante los momentos difíciles. A mi abuelo, por todo lo vivido y aprendido. A mis amigos/as y compañeros/as, que han estado presentes a lo largo de toda esta etapa en todo momento animándome a seguir adelante. Al resto de profesores que han contribuido en mi formación y desarrollo académico a lo largo del Máster.

También, expresar mi más sentido agradecimiento a la Universidad Internacional de Andalucía y a la Universidad de Huelva por acogerme dentro de sus aulas, poner los recursos necesarios para el desarrollo de la actividad y hacerme sentir como en casa.

Después de este período de investigación escribo este apartado de agradecimientos para finalizar mi TFM. Sin duda, ha sido un período de aprendizaje científico y personal. Desarrollar este estudio ha tenido un gran impacto en mi persona y es por eso que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado durante este proceso.

A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

La calidad y disponibilidad del agua dulce es un tema preocupante a nivel mundial. Tan solo el 2,5% del agua del planeta es agua dulce por lo que es de vital importancia proteger este recurso. Para ello, la Unión Europea creó la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) como marco de referencia y de obligado cumplimiento para todos los estados miembros en materia de gestión de los recursos hídricos. En esta Directiva se establecen diversos métodos para el estudio del estado ecológico de las aguas continentales. En nuestro estudio aplicaremos las diatomeas como bioindicadores de calidad del agua. Las diatomeas son algas microscópicas provistas de una estructura de silicio característica que facilita su identificación taxonómica. Nuestra zona de estudio se ubicó al nordeste de la provincia de Huelva, zona no incluida en la Faja Pirítica Ibérica. Los métodos de recolección y análisis aplicados siguen la norma UNE-EN 13946:2014 “Guía para el muestreo de rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos y lagos”. Con los datos obtenidos se calcularon diversos índices de diversidad ecológica, se realizó un análisis de carácter físico-químico y se evaluó el Índice de Polusensibilidad Específica (IPS). Tras estos análisis concluimos que, salvo algunas excepciones, la calidad del agua en la zona de estudio es buena.

Palabras clave: Diatomea, UNE-EN 13946:2014, índice de polusensibilidad específica, índices de diversidad

ABSTRACT

The quality and availability of freshwater is an issue of global concern. Only 2.5% of the planet's water is freshwater, making it vitally important to protect this resource. To this end, the European Union created the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC) as a framework of reference and obligatory compliance for all member states in the management of water resources. This Directive establishes different methods for the study of the ecological status of inland waters. In our study we will apply diatoms as bioindicators of water quality. Diatoms are microscopic algae with a characteristic silicon structure that facilitates their taxonomic identification. Our study area was located in the northeast of the province of Huelva, an area not included in the Iberian Pyritic Belt. The collection and analysis methods applied follow the UNE-EN 13946:2014 standard "Guide for routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers and lakes". With the data obtained, several ecological diversity indices were calculated, a physico-chemical analysis was carried out and the Specific Polusensitivity Index (SPI) was evaluated. After these analyses we concluded that, with a few exceptions, the water quality in the study area is good.

Keywords: Diatom, UNE-EN 13946:2014, specific polusensitivity index, diversity index

ÍNDICE

Resumen

Abstract

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Estado de la cuestión.....	1
1.2. Características generales de las diatomeas.....	3
1.3. Diatomeas como bioindicadores de calidad del agua.....	4
1.4. Objetivos.....	5
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	6
2.1. Área de estudio.....	6
2.2. Toma de muestras.....	13
2.3. Preparación y análisis de las muestras.....	16
2.4. Análisis estadístico.....	22
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	24
3.1. Parámetros físico-químicos	24
3.2. Composición de las comunidades de diatomeas.....	25
Capítulo 4. Conclusiones.....	41
Referencias.....	42
Anexos.....	47

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estado de la cuestión

El agua es un recurso muypreciado a la par que escaso, según el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2020 el uso global de agua se ha multiplicado por seis en los últimos cien años y sigue creciendo a un ritmo constante de aproximadamente 1% al año. Nuestro planeta contiene unos 1.386 millones de kilómetros cúbicos de agua. El 97% del agua se encuentra en los océanos, el 80% del agua que se encuentra en los continentes está en la superficie y el 20% restante se encuentra bajo tierra o en forma de vapor de agua atmosférico. Sólo el 2,5% del agua que existe en la Tierra es agua dulce. De esa cantidad, el 0,5% se encuentra en depósitos subterráneos y el 0,01% en ríos y lagos (<https://www.fundacionaquae.org>).

Esta preocupación llevó a la Unión Europea a tomar medidas en materia de gestión de los recursos hídricos. Fue entonces cuando se publica la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) como marco de referencia y de obligado cumplimiento para todos los estados miembros. Esta directiva pretende evitar el deterioro de los recursos hídricos y mantener un buen estado ecológico de los mismos, por ello obliga al análisis y monitoreo de las masas de agua continentales, tanto superficiales como subterráneas (Blanco et al., 2010). En España, son las confederaciones hidrográficas las administraciones encargadas de llevar a cabo estos procedimientos.

El cambio climático y sus consecuencias ponen aún más en peligro los recursos hídricos, aunque los efectos del cambio climático son variables dependiendo de la zona. El cambio climático se ve reflejado en las anomalías registradas a nivel global sobre aumento de la temperatura media, variación en la cantidad y regularidad de las precipitaciones, deforestación, cambios de uso del suelo, etc., con graves repercusiones sobre la biodiversidad en función de la zona geográfica y el escenario (Sala et al., 2000). Uno de los organismos más relevantes en el estudio del cambio climático es el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) el cual, por medio de diversos informes, va presentando un seguimiento de la dinámica global del clima. En su último informe “AR6”, y en concreto en el informe especial sobre el calentamiento global hasta 1,5°C, habla sobre la estimación actual del incremento de temperatura por la actividad humana respecto a los niveles preindustriales de aproximadamente 1°C (rango de 0.8-1.2°C) y de las consecuencias derivadas del aumento de temperatura entre 1,5°C y 2°C. Se prevé que, para la región mediterránea, zona en la cual se centra nuestro estudio, tenga gran repercusión con una reducción drástica de las precipitaciones y un aumento de la torrencialidad. Dependiendo de los modelos empleados, se puede prever un aumento de las precipitaciones, aunque los más representativos llevan hacia un aumento de la desertización en el Mediterráneo

y un aumento de la temperatura de hasta 4°C (Alpert et al., 2008). Esta reducción del régimen de precipitaciones y el aumento de la temperatura son dos factores claves a tener en cuenta en el estudio de la dinámica de poblaciones y sus respuestas (Vitousek, 1994; Alonso y Valladares, 2007).

En España, aparte de los problemas asociados a la climatología propia, sufrimos también problemas de escasez de agua que son consecuencia del rápido desarrollo industrial, las actividades agrícolas y el aumento de la población (Suresh et al., 2023). Todo ello ha conducido a graves reducciones en los caudales de muchos ríos, a la pérdida de muchas zonas húmedas, a la salinización de acuíferos, etc. Por tanto, los temas asociados con la contaminación de las aguas continentales preocupan cada vez más tanto a las administraciones públicas como a los ciudadanos (Barceló y Carrera, 2008)

Por todo lo anteriormente comentado es preciso realizar estudios sobre calidad del agua y ecosistemas acuáticos, ya que pueden verse diezmados al estar estrechamente relacionados con la disponibilidad de agua y nutrientes (Jenny, 2020; Zhang et al., 2017). En lo que a limnología se refiere podemos distinguir dos tipos de ecosistemas acuático según si la masa de agua fluye, ecosistemas lóticos, a si el agua permanece algo más estática, lénticos.

En base a la Directiva Marcos del Agua nos centraremos en el uso de bioindicadores (de la Lanza-Espino y Pulido, 2000) para la evaluación de la calidad y del estado ecológico de los cursos de agua. Una de las definiciones más simples, pero a la vez más significativa de bioindicación, fue propuesta por Müller en 1980: “es la reducción del contenido de la información de los biosistemas de tal manera que permita evaluar zonas enteras” (Markert et al., 2013). De entre todos los índices biológicos aplicables: macroinvertebrados, fitobentos, macrófitos, fitoplancton, peces, macroalgas y plantas angiospermas (Oscoz et al., 2007; Licursi y Gómez, 2003) será el estudio de las diatomeas epilíticas, incluidas en el fitobentos, el objeto de este trabajo.

Nuestra zona de estudio se ubica en Huelva, Andalucía. Destacar que, además de los estudios realizados en las grandes cuencas hidrográficas de la Península Ibérica como la cuenca del Duero (Blanco et al., 2010) y la el Ebro (Durán y Pardos, 2015), en Andalucía existen estudios sobre diatomeas en las lagunas de alta montaña del Parque Nacional de Sierra Nevada (Linares et al., 2007) y de los ríos Tinto, Odiel y Piedras (Urrea-Clos y Sabater, 2009), además de una serie de trabajos realizados por especialistas de la Universidad de Huelva (Rivera et al., 2017; Luis et al., 2022; Córdoba et al., 2022).

Nuestras zonas de muestreo se sitúan al nordeste de la provincia de Huelva, zona poco estudiada en lo que a calidad del agua se refiere ya que la mayoría de estudios

se centra en la zona oeste. Esta densidad de estudios se debe a la problemática derivada de la minería y sus impactos en la calidad del agua, como puede ser el Drenaje Ácido de Mina (Olías et al., 2007; Grande et al., 2005).

1.2. Características generales de las diatomeas

Las diatomeas son algas microscópicas eucariotas pertenecientes a la división Bacillariophyta (Blanco et al. 2010). La primera cita sobre diatomeas se produjo en 1703; Kützing en 1844 ya trata a todas las diatomeas como plantas. Fue en el siglo XX cuando aparecen monografías más completas debido al desarrollo de las técnicas de microscopía (Soler, 2015). Se conocen unas 12.000 especies de diatomeas, aunque se calcula que pueden existir hasta 100.000 taxones (Taylor et al, 2007; Rimet y Bouchez, 2012; Mann y Vanormelinge, 2013).

Las diatomeas forman parte del fitoplancton, el cual es responsable del 45% de la producción primaria mundial (Benoiston et al., 2017). Las diatomeas son responsables del 25% de la producción primaria mundial y del 20% de la producción global de oxígeno (Field et al., 1998).

Las diatomeas están formadas por una estructura silíceea, que se divide en dos partes o tecas. La epiteca sería la parte de mayor tamaño, mientras que la hipoteca sería la de menor tamaño. Ambas partes se ensamblan perfectamente como si de una caja se tratase. La zona de unión entre ambas tecas se denomina cíngulo; también podemos distinguir entre el epicíngulo y el hipocíngulo. Algunas diatomeas presentan un surco que las recorre longitudinalmente, el rafe, además de estrías. Cada valva o teca presenta una morfología y ornamentación características que nos servirá para su identificación (Round et al., 1990).

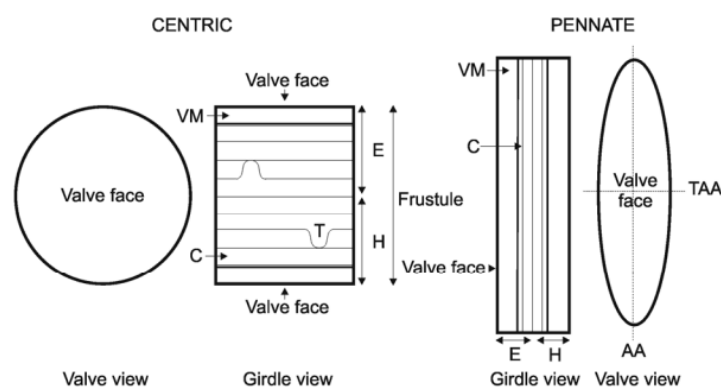


Diagram of diatom cells to show the relationships of the siliceous components.
E = epivalve + epicingulum; **H** = hypovalve + hypocingulum; **C** = copulae or girdle bands;
VM = valve mantle. Copulae (girdle bands) may have a tongue-like extension (**T**) which inserts into any space between the ends of the adjacent split copula. **AA** = apical axis, **TAA** = transapical axis

Figura 1. Fisionomía de las diatomeas. Taylor et al., 2007

En lo que a simetría respecta podemos distinguir dos grupos, céntricas o de simetría radial y pennadas o de simetría bilateral. Las céntricas presentan valvas circulares o elipsoides y su estructura se dispone en torno a un punto central, este tipo de diatomeas tiene dos ejes de simetría: el eje pervalvar (unión entre los centros de cada valva) y transapical (perpendicular al anterior). Las pennadas presentan valvas alargadas y sus estructuras se disponen en torno a una línea central, este tipo de diatomeas presentan tres ejes de simetría: eje pervalvar, transapical y apical (une ambos extremos de una misma valva). Referente al ciclo de vida y su reproducción, la forma más habitual de propagación es la reproducción asexual por medio de división celular. Este proceso comienza con la separación de las tecas; a cada una de las tecas se le acopla otra quedando la “teca madre” como epiteca. El inconveniente que presenta este método reproductivo es que una vez que se ha llevado a cabo varias veces una de las tecas es demasiado pequeña y se vuelve imposible continuar con este proceso, llegados a este tamaño crítico la estrategia reproductiva pasa a la vía sexual (Round et al., 1990; Soler, 2015).

En función de su ubicación en la columna de agua podemos clasificar las diatomeas en dos grupos: plantónicas, viven flotando en la columna de agua, y bentónicas, viven asociadas a algún tipo de sustrato. En este caso distinguimos tres grandes grupos dependiendo del sustrato donde se desarrollen. Rocas (epilíticas), sobre plantas (epifíticas) o en el sedimento (epipélicas) (Blanco et al., 2011).

1.3. Diatomeas como bioindicadores de calidad del agua.

Un bioindicador es un organismo vivo que nos proporciona información ambiental sobre el medio en el que se encuentra (Markert et al., 2013). Existen varios indicadores biológicos propuestos por la Directiva Marco del Agua, aunque el estudio de las diatomeas es uno de los más empleados (Masouras et al, 2021; Bellinger y Sigee, 2010). Las diatomeas, debido a su carácter cosmopolita, sensibilidad ambiental y la dominancia en el medio las ponen a la cabeza en lo que a bioindicadores se refiere (Lemarchand et al., 2004; Blanco et al., 2007) seguidas de los macroinvertebrados (Beyene et al., 2009).

En el caso particular de la Faja Pirítica Ibérica y de otros entornos afectados por Drenaje Ácido de Mina, la determinación de las especies de diatomeas es particularmente efectiva para valorar el grado de afección de las aguas (Córdoba et, 2022) e incluso la eficacia de la aplicación de medidas correctoras de aguas contaminadas (Pool et al., 2013).

1.4. Objetivos

Uno de los principales objetivos de nuestro trabajo es caracterizar, tanto a nivel biológico como físico-químico, las aguas de nuestra zona de estudio para poder evaluar la calidad de las mismas. Por otro lado, y paralelamente, aplicar técnicas de bioingeniería para el monitoreo de medios acuáticos como puede ser el uso de bioindicadores.

En cuanto a los objetivos secundarios destacar:

- Aplicar la norma UNE-EN 13946:2014 Guía para el muestreo de rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos y lagos.
- Aplicar los protocolos de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos.
- Calcular los índices diatomológicos y de biodiversidad como evaluadores del estado ecológico de las aguas continentales.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El estudio se centra en la provincia de Huelva (Andalucía), concretamente en la zona nordeste. Se establecen un total de nueve puntos de muestreo de los cuales dos corresponden a embalses y siete a ríos.

La región seleccionada se corresponde con la zona de Ossa Morena situada en NE de la provincia de Huelva, cuyas características geológicas están descritas por [Fernández y Díaz, 2008](#).

Esta zona no está incluida en la Faja Pirítica Ibérica (FPI). Sin embargo, en la mina de Cala se realizaron importantes explotaciones de cobre y de hierro, elementos que se obtenían a partir del tratamiento de las reservas de magnetita presente en la zona, aunque tanto su génesis como el tiempo de formación de estos yacimientos difiere de los de la FPI: las magnetitas de Cala están asociados con las formaciones carbonatadas que hay presentes en las estribaciones más occidentales de Sierra Morena. La mina se explotó hasta 2010 cuando cesan completamente sus actividades.

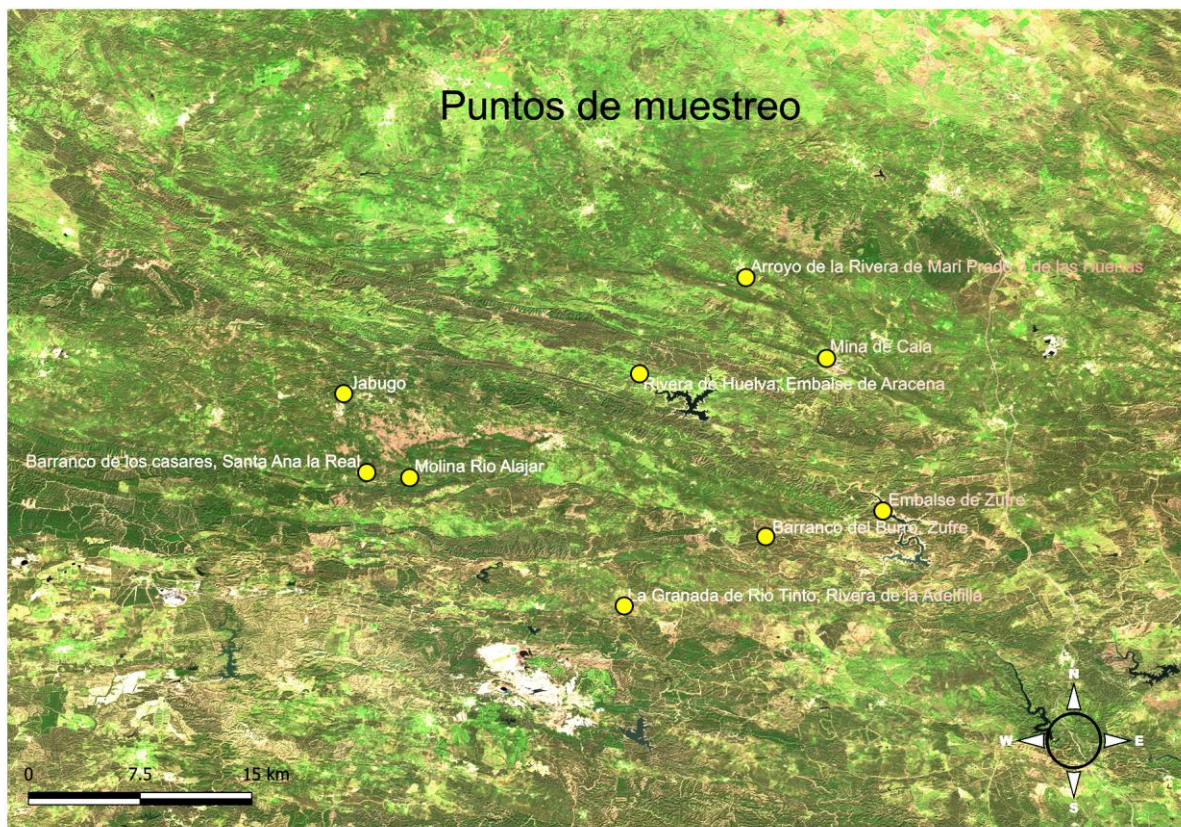


Figura 2. Distribución espacial de los puntos de muestreo.

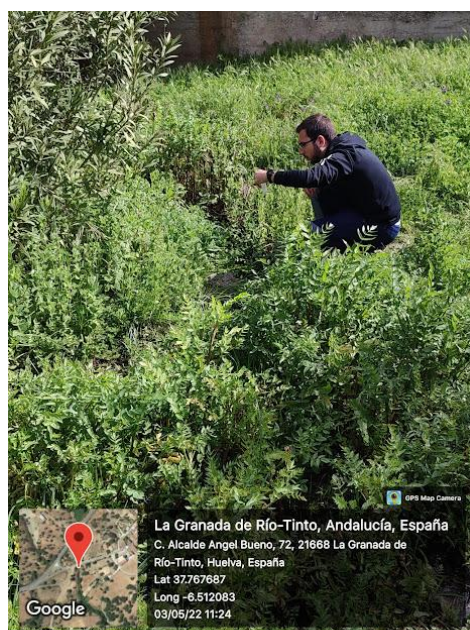
2.1.1. Puntos de muestreo

Tabla 1. Datos de los puntos de muestreo

ID	Latitud	Longitud	Descripción	Municipio
AG-1	37.767687	-6.512083	La Granada de Río Tinto, Rivera de la Adelfilla	La Granada de Río Tinto
AG-2	37.819262	-6.401761	Barranco del Burro, Zufre	Zufre
AG-3	37.840217	-6.3134	Embalse de Zufre	Zufre
AG-4	37.956781	-6.357702	Barranco de la Herrería	Cala
AG-5	38.017608	-6.41836	Arroyo de la Rivera de Mari Prado o de las Huertas	Arroyomolinos de León
AG-6	37.869444	-6.708108	Barranco de los casares, Santa Ana la Real	Santa Ana la Real
AG-7	37.86587	-6.674203	Molino Río Alajar	Alájar
AG-8	37.943549	-6.50014	Rivera de Huelva, Embalse de Aracena	Corteconcepción
AG-9	37.928924	-6.723811	Río Múrtiga	Jabugo

AG-1 La Granada de Río Tinto, Rivera de la Adelfilla

En este punto encontramos un arroyo estrecho, con una anchura máxima de 1m, bajo un puente cercano a la carretera. Es una zona rústica, rodeada de terrenos agrícolas y con presencia de vegetación de porte arbóreo como la encina. Es una zona semisombreada donde predomina la vegetación herbácea y arbustiva como las gramíneas y las adelfas, con presencia de algunos anfibios. Sin ningún aporte o vertido externo aparente. Profundidad aproximada de 20cm.



AG-1 Rivera de la Adelfilla

Figura 3. Punto de muestreo AG-1, La Granada de Río Tinto

AG-2 Barranco del Burro, Zufre

Arroyo con una anchura aproximada de 1m, rodeado de vegetación de ribera típica como juncos, adelfas, hinojo, zarzas etc. En el margen derecho del cauce encontramos eucaliptos y *Cistus*, en el margen izquierdo encontramos encinas, *Genista* y *Cistus*. La velocidad del agua es mayor que en AG-1, profundidad aproximada de 20cm.

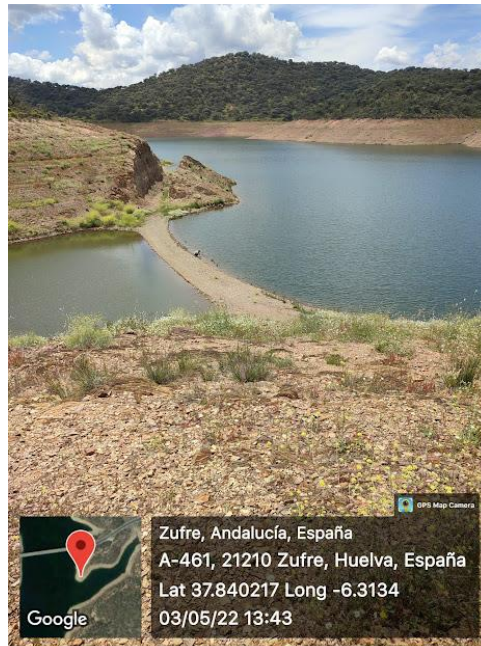


AG-2 Barranco del Burro

Figura 4. Punto de muestreo AG-2, Barranco del Burro

AG-3 Embalse de Zufre

Nos ubicamos en la orilla del embalse, retirados unos metros de la perpendicular del puente “Rivera de Huelva”. El nivel del embalse era bastante bajo, un 38% de su capacidad según datos del Sistema Automático de Información Hidrológica (S.A.I.H.) de la Cuenca del Guadalquivir. Presencia de plantas acuáticas y peces, la vegetación que rodea el embalse está compuesta por bosque de encinas, con presencia de matorral como *Cistus* y *Genista*, además de especies herbáceas como jaramago o margaritas. Profundidad aproximada de 20cm.

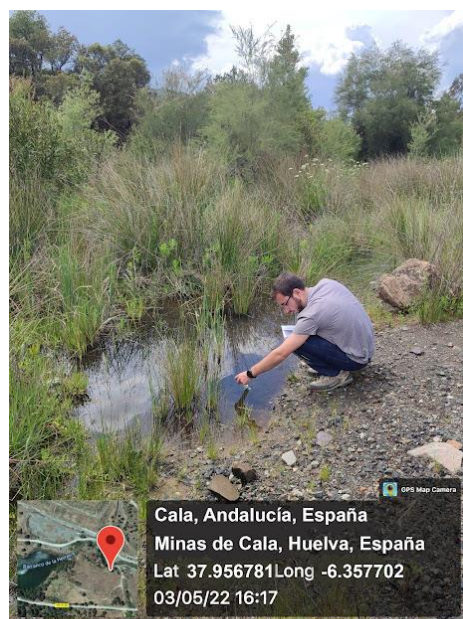


AG-3. Embalse de Zufre

Figura 5. Punto de muestreo AG-3, Embalse de Zufre

AG-4 Barranco de la Herrería (Mina de Cala)

Punto ubicado junto a la mina de Cala, es un entorno minero con escombreras cercanas propias de la actividad. Vegetación de ribera como juncos, adelfas, álamos y mimbres. Cauce rodeado de matorral, como retama y *Cistus*, encinas y eucaliptos. Observamos la presencia de macroinvertebrados, crustáceos (cangrejo de río) y reptiles (tortuga de río). Agua con muy poca velocidad, profundidad aproximada de 20cm.

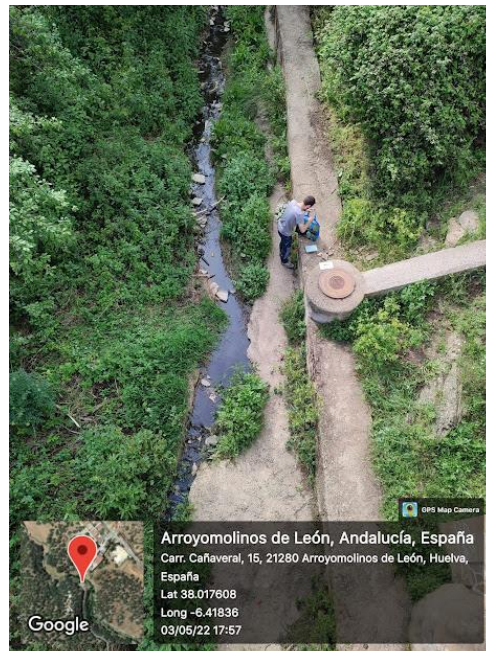


AG-4 Barranco de la Herrería

Figura 6. Punto de muestreo AG-4, Mina de Cala

AG-5 Arroyo de la Rivera de Mari Prado o de las Huertas

Punto ubicado bajo el puente de la carretera, el cauce es pequeño no superando el metro de anchura. Presencia de vegetación herbácea de ribera, rodeada de dehesa y pequeños huertos. Observamos gran cantidad de pequeños gusanos y de quironómidos en el agua. Profundidad aproximada de 20cm.



AG-5. Arroyo de la Rivera de Mari Prado o de las Huertas.

Figura 7. Punto de muestreo AG-5, Arroyo de la Rivera de Mari Prado o de las Huertas

AG-6 Barranco de los Casares, Santa Ana la Real

Punto ubicado cerca de la carretera, cerca del río discurre el sendero SL-A201. Anchura del cauce inferior a 1m, agua con poca velocidad. Es una zona más o menos llana, una alameda, que en la parte más cercana al río la vegetación dominante a juncos y helechos. Profundidad aproximada de 10cm. Se observan restos antrópicos, (¡basura!), dentro del cauce. Por lo que se toma la muestra aguas arriba de zona sucia para que no se vea influenciada la muestra y tener así unas condiciones más representativas del cauce.



Figura 8. Punto de muestreo AG-6, Barranco de los casares

AG-7 Molino del Río Alájar

Nos situamos en un vado inundable, cerca de zonas de cultivo con presencia de ganado ovino. Dentro del cauce hay gran presencia de algas. Referente a la vegetación que circunda el cauce, además de la herbácea propia de la ribera, destacar la presencia de encinas. El cauce tiene una anchura aproximada de 2m y una profundidad de 50cm. Discurre un carril cerca del cauce. Se observa buen caudal aparentemente.

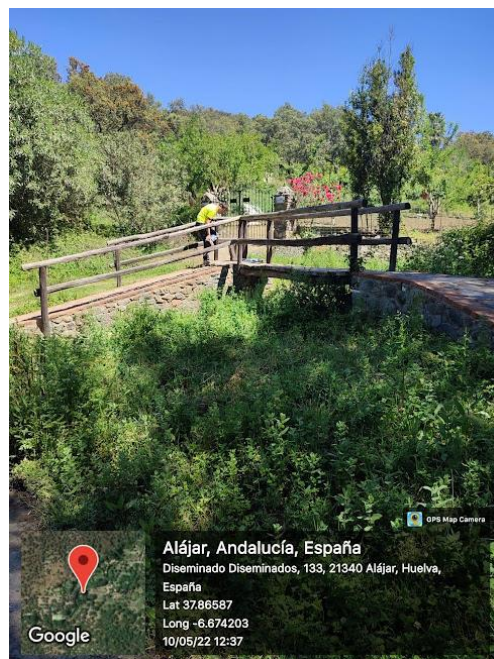


Figura 9. Punto de muestreo AG-7, Molino Río Alájar

AG-8 Rivera de Huelva, Embalse de Aracena

El punto de muestreo lo situamos en el río que llega al embalse, en condiciones normales el nivel del agua debería ser mayor de tal manera que este punto de muestreo formase parte de la “cola” del embalse, pero tal y como pasa en el embalse de Zufre el nivel es muy bajo debido a las escasas precipitaciones. La vegetación que se observa es la propia de zonas húmedas y pantanosas, respecto a lo a fauna respecta se observaron peces, anfibios (ranas) y hormigas. Profundidad aproximada de 50cm.

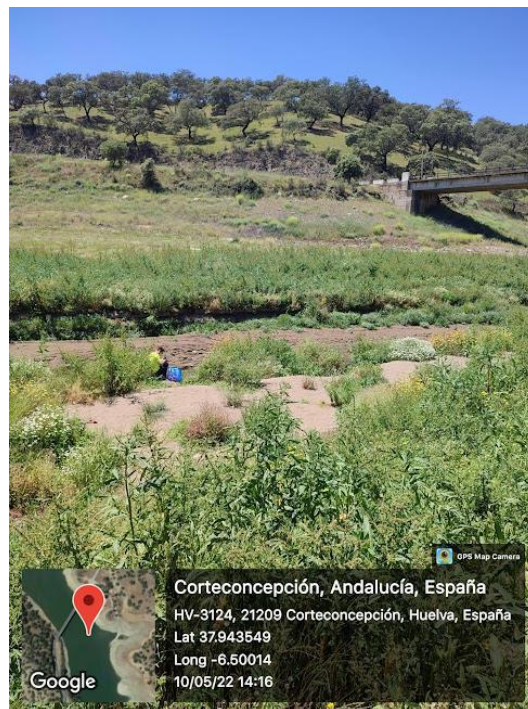


Figura 10. Punto de muestreo AG-8, Embalse de Aracena

AG-9 Río Múrtiga (Jabugo)

Este último punto es de mayor caudal y velocidad del agua, la anchura aproximada del cauce es de 5m. Se sitúa cerca de una pequeña presa con una casa rural cerca. La vegetación es de tipo herbácea con presencia de algunas especies de *Salix* y adelfas.

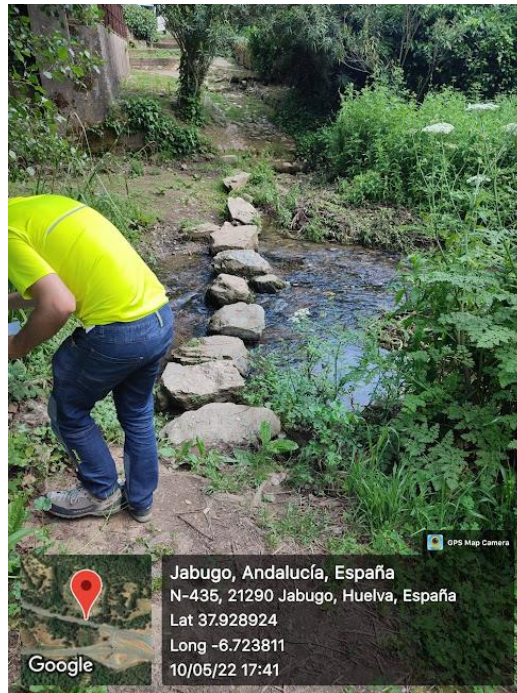


Figura 11. Punto de muestreo AG-9, Jabugo

2.2. Toma de muestras

Este trabajo se lleva a cabo en campo durante el mes de mayo de 2022, debido a la distancia que separa cada punto de muestreo se realizaron dos jornadas para completar la toma de muestras (3 y 10 de mayo de 2022). Para la realización del proceso de toma de muestras se ha tenido en cuenta el protocolo establecido por UNE-EN 13946:2014 “Guía para el muestreo de rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos y lagos”, además de lo dispuesto en el Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (código: ML-R-D-2013) del anterior Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. A día de hoy ese ministerio se divide en dos: Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

2.2.1. Técnica de muestreo de diatomeas epilíticas

Tal y como hemos comentado anteriormente este estudio se basa en la identificación de diatomeas epilíticas. Para llevar a cabo la recogida de la muestra se deben seleccionar una o varias rocas, sumergidas en el cauce, de tal modo que la superficie aproximada sea de 100 cm². En la cara de la roca expuesta a la radiación solar es donde, por medio de un cepillo de dientes, frotaremos con intensidad para desprender las diatomeas que están fijadas a la misma. Una vez se ha frotado la superficie se realiza una limpieza de la misma por medio de un frasco lavador con agua del propio punto de muestreo. Todo este proceso se lleva a cabo encima de una bandeja de muestreo para evitar perder la muestra. Para finalizar, se pasa de la bandeja de

muestreo a un tubo falcon de 50ml previamente etiquetado. Antes de almacenar la muestra se adiciona formaldehído al 4% para su fijación, se conserva en frío y alejado de la luz hasta su posterior análisis de laboratorio.



Figura 12. Materiales empleados para el muestreo en campo

2.2.2. Muestras para análisis físico-químico

En este caso la metodología de toma de muestras de muestras es bastante simple, para el análisis de elementos químicos se recoge una muestra de agua del cauce. Por medio de un frasco de polipropileno de 150ml, se enjuaga en el cauce y se llena con la muestra. Para la medida de pH, conductividad eléctrica (EC), temperatura ($t^{\circ}\text{C}$) y potencial redox en base al oxígeno (ORP) se utiliza una sonda multiparamétrica tipo HI 98120 de Hanna Instruments obteniendo los valores “in situ” de cada punto.

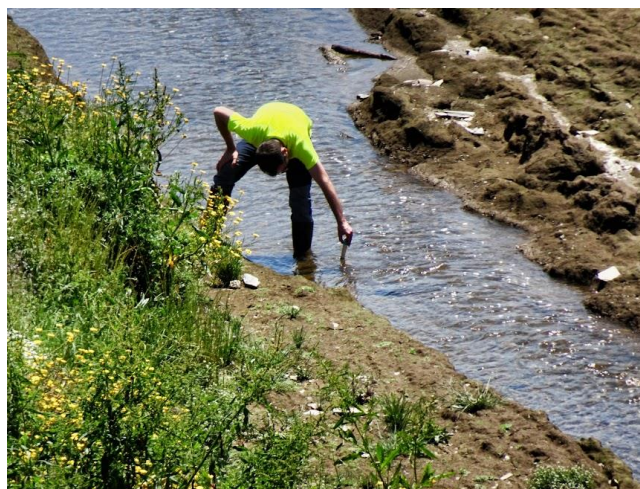


Figura 13. Medida de valores físico-químicos "in situ"

Se realizan dos procesos de análisis, cuantitativo y semicuantitativo, y uno de conversión de ORP a Eh:

Análisis cuantitativo

Se coge una alícuota del frasco de 150ml y se trasvasa a un tubo falcon pasando por un filtro de 0,45um, después se acidula con 0,5ml de ácido nítrico (HNO₃), se cierra y se etiqueta. Esta muestra se envía al Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (CIDERTA) para su análisis por medio de la técnica de ICP–OES, espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo.

Análisis semicuantitativo

Utilizando un test comercial, Quantofix, que se compone de tiras reactivas que por medio en un viraje de color nos dan información de los parámetros evaluados. En lo referente a este estudio los cuatro parámetros evaluados mediante esta técnica son amonio, nitrato, nitrito y fosfato.

Conversión del valor ORP a potencial redox en base al hidrógeno (Eh).

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

Ecuación 1. Conversión de ORP a Eh

Por medio de la fórmula anterior (Wolkersdorfer, 2008). y teniendo en cuenta nuestros valores de ORP y temperatura, ya que a y b son constantes que dependen del electrodo que lleva incorporado el equipo de medida, podemos realizar la conversión. Et 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. En nuestro caso se aplicó la siguiente tabla, donde Eh se calcula simplemente sumando un valor establecido al obtenido de ORP a determinada temperatura. Por ejemplo, si el valor de ORP a 15°C fue de 315, el valor de Eh será 315 + 207 = 522 mV.

Tabla 2. Valores para conversión directa de ORP a Eh

Temperature (°C)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Potential (mV)	222	219	211	207	202	198	194	191	186

2.3. Preparación y análisis de las muestras

Este trabajo se lleva a cabo en laboratorio. Para la realización del proceso de preparación y análisis de las muestras se ha tenido en cuenta el protocolo establecido por UNE-EN 13946:2014 Guía para el muestreo de rutina y el pretratamiento de diatomeas bentónicas de ríos y lagos. Además, lo dispuesto en el Protocolo de muestreo y laboratorio de flora acuática (organismos fitobentónicos) en ríos (código: ML-R-D-2013) y en Protocolo de cálculo del índice de polusensibilidad específica del anterior Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. También se analizan algunos índices de biodiversidad propuestos por diferentes autores ([Margalef, 1989](#); [Rodríguez, 2013](#); [Heip et al.,1998](#); [Licursi y Gómez, 2003](#)) y los pertinentes análisis estadísticos.

2.3.1. Preparación y análisis de muestras de diatomeas

Distinguimos tres procesos principalmente:

Preparación de las muestras

a) Retirada alcohol (formaldehído): 2ml de la muestra se centrifugan a 5000 rpm durante 3 minutos. Se retira el alcohol suspendido y se resuspende el precipitado con 2ml de agua destilada. Se repite el proceso tres veces.

b) Oxidación y eliminación de materia orgánica: el único material de la muestra que nos interesa para nuestro estudio son las estructuras silíceas de las diatomeas. Colocaremos 2ml de muestras en un tubo de ensayo y agregaremos 8ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%, pasamos los tubos de ensayo por un vortex para asegurar una correcta homogeneidad en la muestra. Colocamos todos los tubos de ensayo en un baño maría a $95^{\circ}C$ y lo dejaremos de 1-2h; en nuestro caso el tiempo empleado fue de 1h y 40min, después se dejan enfriar a temperatura ambiente (Fig. 14). Para finalizar debemos realizar el lavado del peróxido de hidrógeno, para ello usaremos una centrífuga realizando tres ciclos de lavado, en los que iremos sustituyendo el sobrenadante por agua destilada, en el siguiente orden: 1º 5000 RPM t=3min, 2º 7000 RPM t=4min, 3º 7000 RPM t=4min. Una vez finalizado el proceso de lavado las muestras se pasan a tubos eppendorf de 1,5ml previamente etiquetados y se almacenan en el frigorífico.



Figura 14. Proceso de oxidación de materia orgánica en la muestra con H_2O_2 en baño maría

c) *Fijación de muestras permanentes:* se colocan dos gotas de muestra, de los tubos eppendorf, en un portaobjetos para microscopio. Se dejan desecar en una placa calefactable a $60^\circ C$ (Fig. 15) hasta que se evapora el agua de la muestra. Una vez están secas las gotas de muestras se les añade resina Melmount, con índice de refracción de 1.74, colocando un cubreobjetos encima de cada gota y realizando un poco de presión homogeneizar la muestra. De este modo finaliza el proceso obteniendo así una muestra permanente.



Figura 15. Proceso de elaboración de muestras permanentes, evaporación de agua de la muestra en placa calefactable a $60^\circ C$

Identificación de diatomeas

Con la ayuda de un microscopio óptico binocular de campo claro y contraste de fase, modelo Nikon Eclipse E400, con objetivos x10, x40 y x100 (aceite de inmersión) al cual se le acopla una cámara. Se procede al fotografiado de las distintas muestras.

Para tomar las fotografías de las diatomeas se establece una ruta a través de la gota de muestras presente en la placa para evitar pasar dos veces por el mismo sitio y eliminar la posibilidad de contar un mismo individuo dos veces. El protocolo establece que se realice una ruta en zig-zag (Fig. 16).

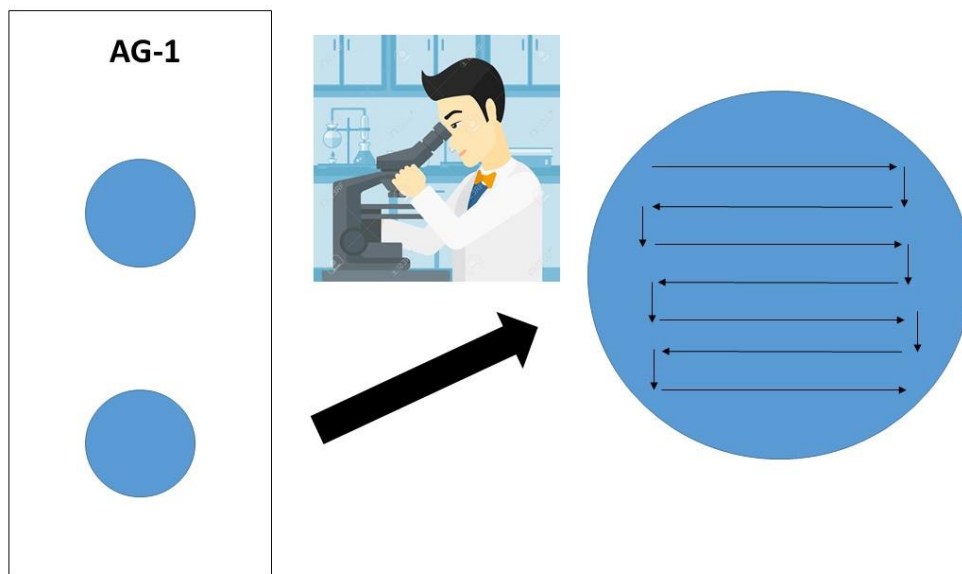


Figura 16. Desplazamiento por la muestra para el fotografiado de frústulos

Sera necesario contar un mínimo de 400 frústulos. Los que estén muy deteriorados o rotos no se tendrán en cuenta salvo que presenten las características suficientes para su correcta identificación. Una vez realizadas las fotos se utiliza el programa Picasa 3 para su recorte y edición facilitando así la identificación de las mismas.

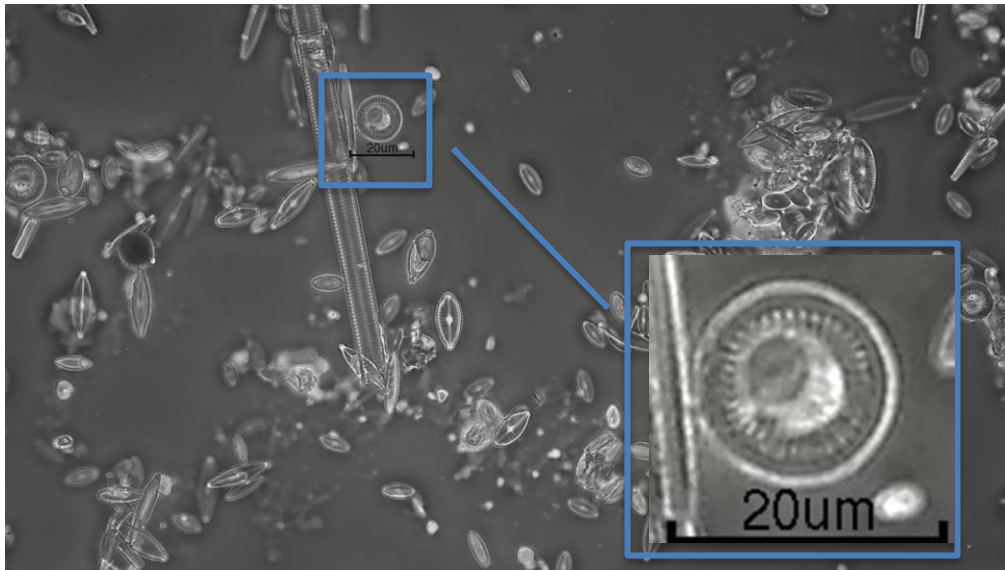


Figura 17. Proceso de recorte de frústulos de las imágenes brutas

Una vez finalizado el proceso de fotografía se procede a la identificación taxonómica hasta el nivel de especie para cada uno de los individuos. Para esta identificación se tendrán en cuentas los rasgos morfológicos y la distribución ecológica de cada especie reflejados en las diversas guías y trabajos publicados (Blanco et al., 2010; ID TAX-España; Coste y Rosebery, 2007; Taylor et al, 2007; diatoms.org).

Calculo de Índices

a) *Índice de polusensibilidad específica (IPS)*: para este índice se aplica el protocolo IPS-2013, “Protocolo de cálculo del índice de polusensibilidad específica del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.”, el cual determina la siguiente ecuación:

$$IPS = 4,75 * \frac{\sum A_j * S_j * V_j}{\sum A_j * V_j} - 3,75$$

Dónde:

Abreviatura	Nombre	Fuente
A _j =	Abundancia relativa de la especie j	Muestreo y analítica de laboratorio
S _j =	Valor de sensibilidad de la especie j	TAXAGUA
V _j =	Valor de tolerancia de la especie j	TAXAGUA

Ecuación 2. Índice de Polusensibilidad específica (IPS)

Tal como se muestras en la formula son tres los valores de interés, el valor de abundancia relativa se obtiene del análisis e identificación de las muestras, mientras que los otros dos valores están ya prefijados en base al tipo de especie y pueden

obtenerse de la web del Ministerio para la transición ecológica y reto demográfico en su aplicación ID TAX-Fitoplancton.

Una vez obtenemos nuestro índice lo comparamos con las categorías preestablecidas para la calidad de aguas continentales.

Tabla 3. Clasificación de la calidad del agua en base a los valores de IPS

Valor de S	5	4	3	2	1
IPS	17-20	13-17	9-13	5-9	1-5
Calidad del agua	Muy buena	Buena	Moderada	Deficiente	Mala

Este índice se aplica para dar cumplimiento a la Directiva Marco del Agua (2000/60/CE) la cual establece, entre otros, un protocolo de carácter obligatorio para la caracterización ecológica de las aguas continentales. Este índice es de aplicación por las distintas confederaciones hidrográficas del territorio nacional.

b) Índices de biodiversidad: con el objetivo de evaluar, no solo la calidad del agua, sino la calidad de sus comunidades biológicas se procede a la evolución de los índices de biodiversidad más comúnmente utilizados por los diversos autores (Margalef, 1989; Rodríguez, 2013; Heip et al., 1998; Licursi y Gómez, 2003).

· *Riqueza específica (S)*: hace referencia al número de especies presentes.

· *Índice de Margalef (I_{Mg})*: es uno de los índices más sencillos, compara la riqueza específica (S) con el logaritmo del tamaño de la muestra (N).

$$(S-1) / \ln(n)$$

Ecuación 3. Índice de Margalef

· *Índice de Simpson (1-D)*: no es un índice de biodiversidad propiamente dicho, mide la dominancia de las especies dentro de la comunidad.

$$D_{si} = \sum p_i^2 \quad p_i = \frac{n_i}{N} \quad 1-D = 1 - \sum p_i^2$$

Ecuación 4. Índice de Simpson

Este índice varía entre 0, una especie domina sobre toda la comunidad y 1, todas las especies están igual representadas. Los valores a tener en cuenta para desarrollar la ecuación son los siguientes, $n_i = n^0$ de individuos de la especie i ; $N =$ número total de individuos para todas las especies en la comunidad.

· *Índice de Shannon-Wiener (H')*: es uno de los índices más utilizados, se emplea para valorar la heterogeneidad de la comunidad.

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \cdot \ln p_i)$$

Ecuación 5. Índice de Shannon-Wiener

H' toma valores entre 0, cuando $S=1$ y por tanto la biodiversidad es muy baja, hasta el valor máximo de $H' = \ln S$. Cuanto mayor es S la comunidad es más heterogénea y por ende podemos asumir que más diversa, aunque antes de realizar una afirmación así debemos apoyarnos en el siguiente índice, ya que podría darse el caso de que existan 100 especies en una comunidad y dos de ellas acumulen el 70-80% de la abundancia relativa.

· *Índice de Pielou (J)*: para poder evaluar si el total de los individuos están repartidos equitativamente en el conjunto de las especies, de tal modo que se tiene en cuenta el valor de H' obtenido y cuál sería su máximo.

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

Ecuación 6. Índice de Pielou

De este modo podemos interpretar que cuando el valor tiende a 0 es porque los repartos de individuos entre especies se hacen menos equitativos y si tiende a 1 es porque todas las especies son igual de abundantes.

· *Índice de Whittaker (Q_w)*: mide la tasa de recambio de especies, es un índice muy robusto y se obtiene por medio de la siguiente fórmula.

$$\frac{S}{\bar{\alpha}} - 1$$

Ecuación 7. Índice de Whittaker

Evalúa la riqueza específica (S), del total de especies de las muestras a comparar, en comparación con el promedio de especies en el total de las muestras (α). Los resultados se localizan entre 0-1 de tal forma que si es igual a 1 todas las especies han cambiado y si es 0 ninguna ha cambiado.

· *Índice de Bray-Curtis (I_{BC})*: expresa la similitud entre las abundancias de cada especie existente en dos comunidades.

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

X_i = abundancia o densidad de especies en la comunidad 1.
 Y_i = abundancia de especies en la comunidad 2.

Ecuación 8. Índice de Bray-Curtis

En nuestro caso se realizó un análisis jerárquico de aglomerados (clúster) Bray-Curtis que clasifica los datos según la similitud entre sus variables.

2.4. Análisis estadístico

El primer paso a seguir, y tras realizar los procedimientos de estadística descriptiva, es realizar un test de normalidad para ver que distribución siguen nuestros datos. Para comprobar esta distribución se utilizó la Prueba Anderson Darling ([Razali y Wah, 2011](#)). Por estudios anteriores sabemos que la distribución de diatomeas no sigue una distribución normal por lo que debemos utilizar test no paramétricos ([Gómez-Gómez et al., 2003](#))

También es de nuestro interés estudiar la relación entre variables cuantitativas. Tal y como sucede en los casos anteriores, cuando queremos estudiar la correlación en el dominio de la estadística no paramétrica debemos usar la correlación de Spearman ([Gómez-Gómez et al., 2003](#)). Calculadas empleando: especies de diatomeas más representativas, elementos mayoritarios, pH, CE y Eh.

Para el estudio de variables correlacionadas se realizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual permite transformar las variables originales en un nuevo conjunto de variables (componentes principales) que se caracterizan por estar correlacionadas entre sí, ordenar los componentes por la cantidad de varianza que describen reduciéndose así el tamaño de la muestra. Esto permite identificar las relaciones entre los distintos elementos que entran en juego ([Olivares, 2014](#)). El

análisis de clúster o conglomerados -en función de la correlación- también se realizó dado que las relaciones entre variables son generalmente muy visibles.

Para los cálculos estadísticos y la elaboración de tablas y gráficas se utilizan dos softwares: Minitab v.17 y Microsoft Excel. Para el cálculo de IPS se utiliza Microsoft Excel y para el cálculo de los índices de biodiversidad y para análisis jerárquico de aglomerados (clúster) Bray-Curtis el software Past 3.0, especializado en la estadística aplicada en estudios ecológicos.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Parámetros físico-químicos

En primer lugar, empezaremos comentando los valores obtenidos “in situ” durante la campaña de campo para cada uno de los puntos de muestreo.

Tabla 4. Datos de parámetros "in situ"

Muestra	T (°C)	pH	EC (µS/cm)	ORP (mV)	Eh (mV)
AG-1	17,5	7,13	676	129	334
AG-2	17,4	7,79	391	130	335
AG-3	19,3	8,42	297	126	329
AG-4	19,1	7,31	1878	152	355
AG-5	16,5	7,30	644	80	286
AG-6	16,3	7,71	436	94	300
AG-7	16,6	7,68	614	136	342
AG-8	28,6	7,63	287	146	341
AG-9	17,7	7,73	572	107	312

Como se observa en la tabla 4 ninguna de las muestras presenta pH ácidos, resultados esperables tratándose de cursos naturales de agua dulce. Cabe destacar la elevada conductividad de la muestra AG-4. Todas las muestras presentan un potencial redox (Eh) de carácter oxidante.

En cuanto a la composición de elementos químicos (Anexo 1) destacar que no son muchos los metales presentes. La mayor concentración de metales se encuentra en la muestra AG-4, situación bastante peculiar ya que pese a su elevada conductividad y la elevada concentración de algunos metales (como el azufre 384,2mg/L) el pH se mantiene en torno a la neutralidad. Esto puede ser causado por el efecto de sustancia amortiguadoras como son el magnesio y el calcio que presentan una concentración considerable en la muestra AG-4 y que pueden estar actuando como tampón y contrarrestando así la acidez de la muestra (Fig. 18). Destacar también la baja concentración de sílice en la muestra AG-3, ya que es inferior a 0.1mg/L, valor bastante curioso ya que hay presencia de diatomeas (aunque es la muestra con el menor número de frústulos) y estas, como se ha comentado en apartados anteriores, presentan una estructura de silicio (Fig. 1).

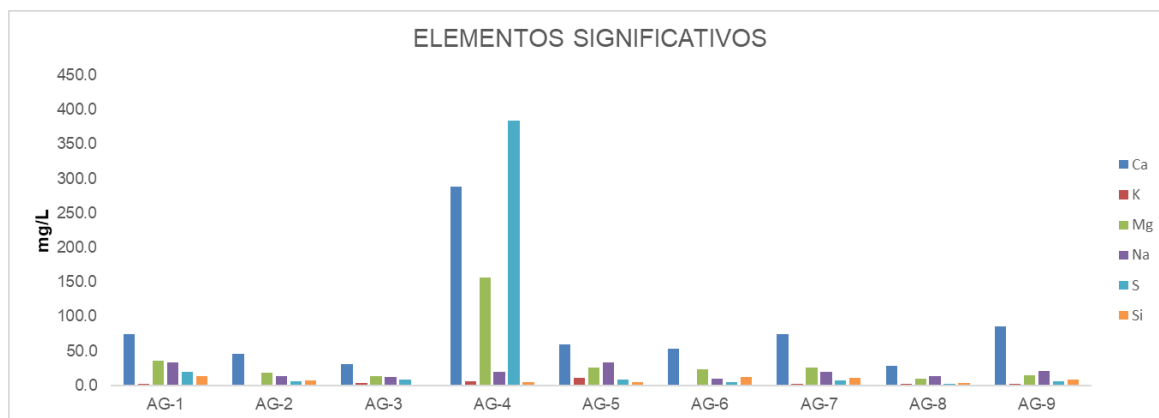


Figura 18. Concentración de los elementos más significativos

El análisis semicuantitativo proporciona una aproximación del contenido de las principales formas iónicas (Tabla 5), muy importantes por ser algunas de ellas nutrientes principales para el desarrollo vegetal o por ser indicativos de contaminación.

Tabla 5. Estimación de la concentración (mg/L) de las principales formas iónicas

Muestra	Amonio	Nitratos	Fosfatos	Nitrito
AG-1	10	25	3	0
AG-2	0	25	3	0
AG-3	0	25	0	0
AG-4	0	25	3	0
AG-5	25	25	3	0
AG-6	0	25	3	0
AG-7	0	25	10	0
AG-8	0	25	3	0
AG-9	0	25	3	0

En todas las muestras es destacable la presencia de nitrato (NO_3^-); en ausencia de contaminación las aguas naturales no superan los 10mg/L de NO_3^- (Antón y Lizaso, 2001). Esto nos puede llevar a pensar que exista una posible contaminación difusa por fertilizantes agrícolas, aunque al ser datos de carácter semicuantitativos solo es una aproximación.

3.2. Composición de las comunidades de diatomeas

Tras la identificación taxonómica se han contabilizado un total de 3405 frústulos (Anexo 2), los diez géneros más abundantes en el total de las muestras estudiadas son *Cocconeis* (16,06%), *Nitzschia* (12,98%), *Gomphonema* (12,57%), *Eolimna* (9,81%), *Fistulifera* (8,25%), *Planothidium* (6,99%), *Psammothidium* (6,52%) *Pinnularia* (5,26%), *Mayamaea* (4,14%) y *Navicula* (3,96%). No todos los géneros están igualmente representados en todas las muestras ya que, salvo en AG-3 y AG-9, existe una especie o género muy predominante. Este hecho se verá reflejado en

los resultados de los índices de biodiversidad que se muestran en los siguientes apartados. El resto de especies agrupan el 13,45% del total de individuos.

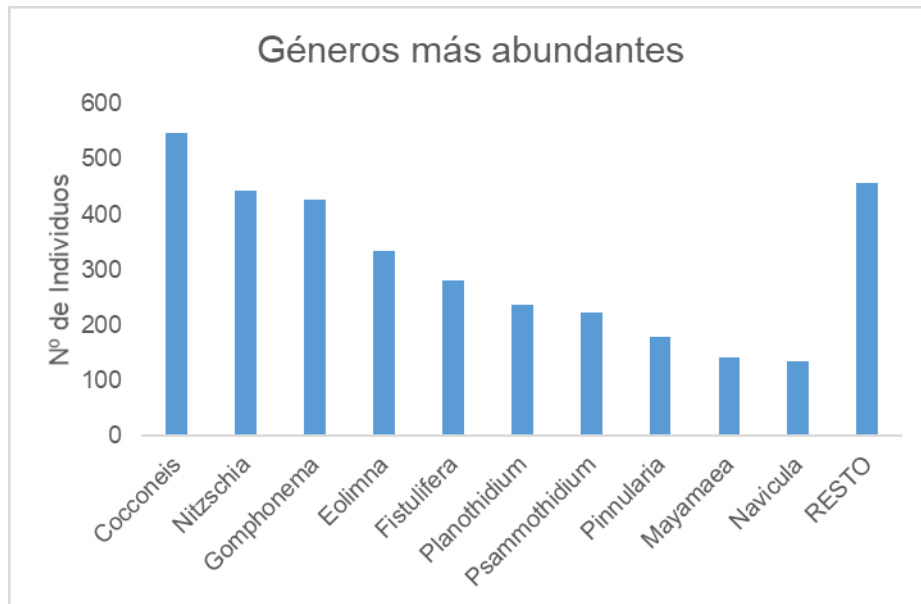


Figura 19. Géneros más abundantes en el total de las muestras

De los treinta y dos géneros identificados que compondrían el total de nuestras muestras los diez más abundantes (Fig. 19) representan el 86,55% del total de los individuos, siendo *Cocconeis* el más representado y acumulando más individuos que los veintidós géneros restantes menos representados.

Dejando a un lado los datos globales y pasando al análisis más profundo de cada una de las comunidades presentes en cada sitio de muestreo observamos que los géneros más abundantes cambian y no solo eso, sino, que una solo especie acumula la gran mayoría de los individuos.

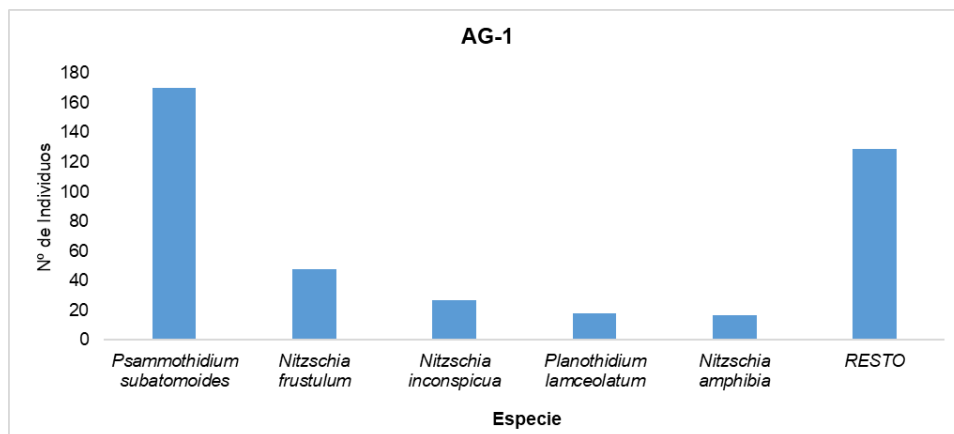


Figura 20. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-1

La muestra se compone de cuarenta y dos especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 68,46% de los individuos (Fig. 20). De entre las cinco, la especie más

abundante *Psammothidium subatomoides* con un 41,56% acumula más individuos que las 37 especies restantes. Seguida, aunque muy por debajo, de *Nitzschia frustulum* con el 11,74%. *Psammothidium subatomoides* se caracteriza por ser una especie oligo-mesotrófica.

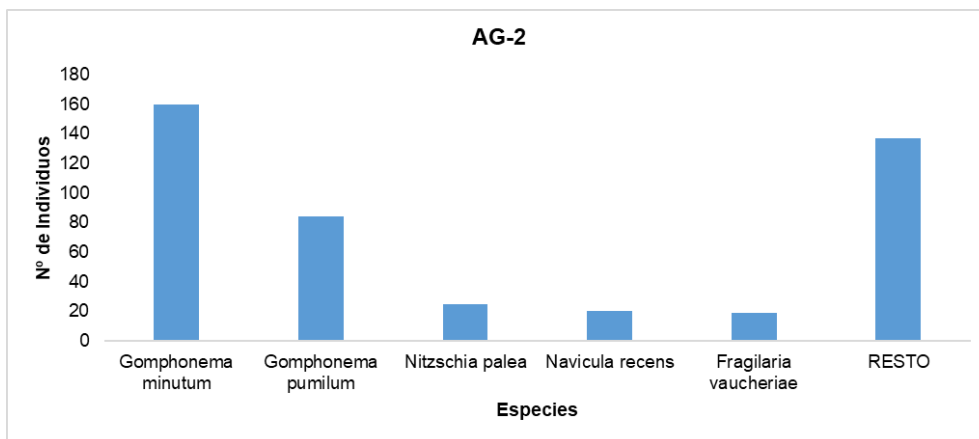


Figura 21. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-2

La muestra se compone de treinta especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 69,21% de los individuos (Fig. 21). De entre las cinco, la especie más abundante *Gomphonema minutum* con un 35,96% acumula más individuos que las veinticinco especies restantes. Seguida de *Gomphonema pumilum*, con el 18,88%, otra especie del mismo género y coincidente con el género más abundante del total. Ambas especies de *Gomphonema* son cosmopolitas, pueden indicar cierto grado de eutrofización, aunque no soportan valores altos de contaminación (Taylor et al., 2007).

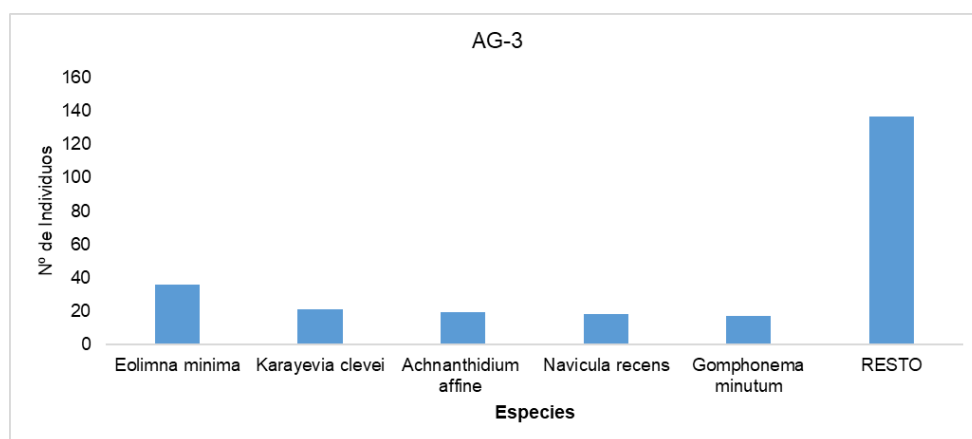


Figura 22. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-3

La muestra se compone de treinta y nueve especies, se pueden observar unos valores más homogéneos (Fig. 22) ya que las cinco especies más abundantes acumulan el 44,76% de los individuos, acumulando el 55,24% las treinta y cuatro especies restantes. De entre las cinco, la especie más abundante *Eolimna minima* con un 14,52%. Seguida de *Karayevia clevei*, *Achnanthyidium affine*, *Navicula recens* y *Gomphonema minutum*, con un promedio del 7,56%.

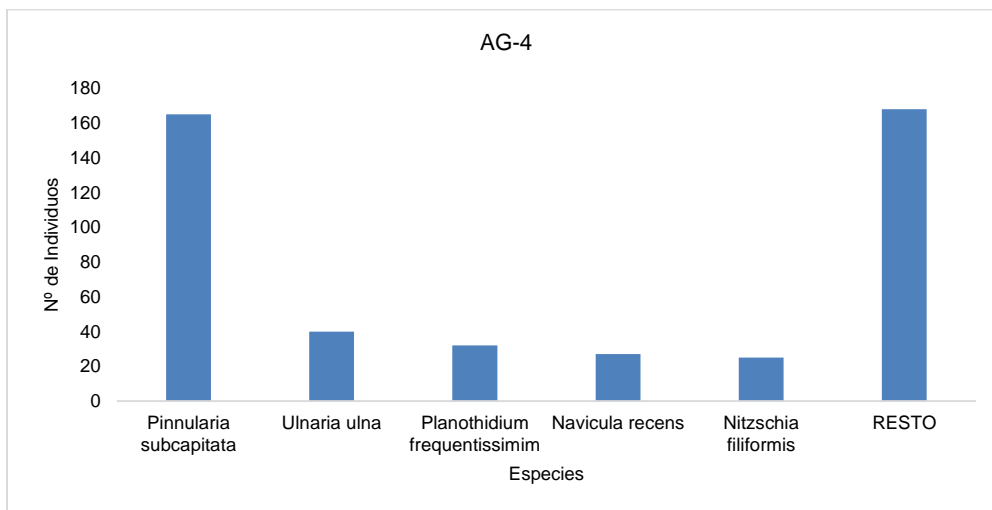


Figura 23. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-4

La muestra se compone de veintisiete especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 63,24% de los individuos (Fig. 23). De entre las cinco, la especie más abundante *Pinnularia subcapitata* con un 36,11% acumula casi el mismo número de individuos que las 22 especies restantes (36,76%). *P. subcapitata* está asociada a aguas ácidas con alta conductividad (Hirst et al., 2022), siendo frecuente en ríos contaminados por Drenaje Ácido de Mina en la F.P.I. (Córdoba et al., 2022), aunque como vimos en el apartado “3.1. Parámetros físico-químicos” el pH es neutro. La concentración de metales no es demasiado elevada salvo el azufre y el magnesio. Esto nos demuestra los vestigios de la actividad minera en el entorno de Cala (minería de magnesita) y como ambos elementos junto con los demás propician las reacciones químicas oportunas para neutralizar la acidez aun presentando un alto potencial oxidante.

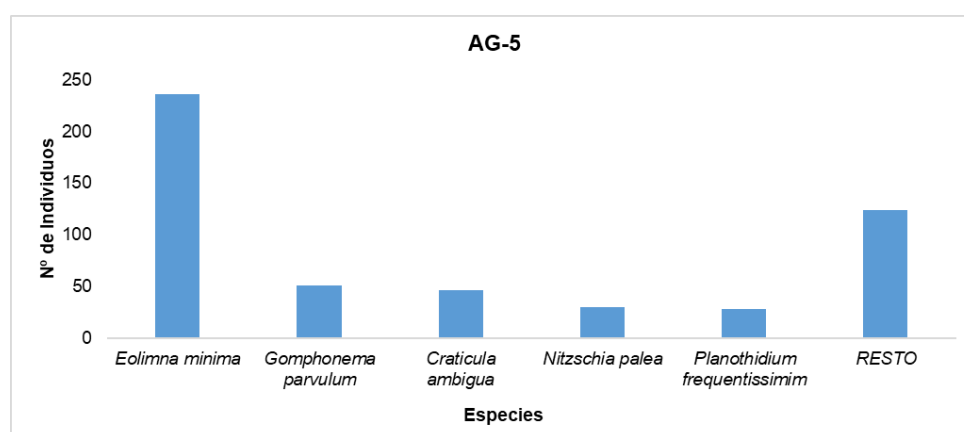


Figura 24. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-5

La muestra se compone de treinta y ocho especies, de las cuales cinco de ellas acumulan 75,92% de los individuos (Fig. 24). Nos volvemos a encontrar con una especie muy abundante, en este caso *Eolimna minima* que representa casi a la mitad

de los individuos (45,83%). Las otras cuatro especies más abundantes suman el 30,10% del total de los individuos. *Eolimna minima* es una especie cosmopolita, se puede ubicar en casi cualquier tipo de masa de agua, soportan altos niveles de contaminación y se asocia a masa de agua con gran cantidad de detritus orgánicos (Taylor et al., 2007).

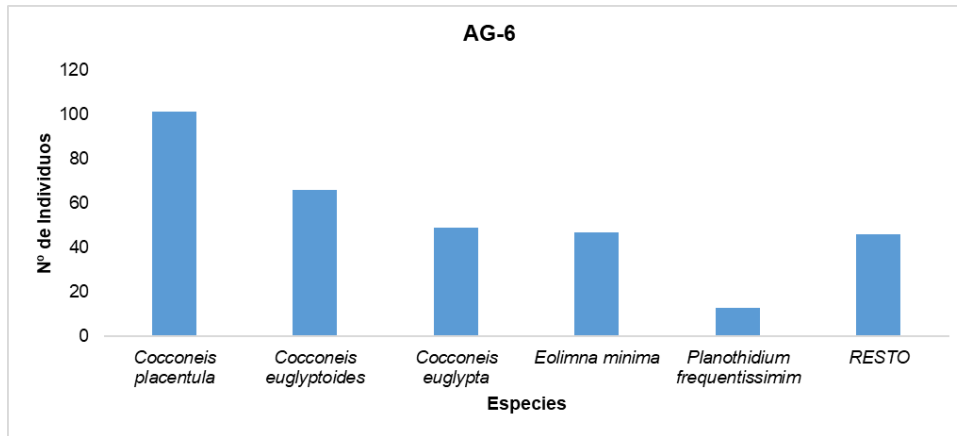


Figura 25. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-6

La muestra se compone de veinticuatro especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 85,71% de los individuos (Fig. 25). De entre las cinco, la especie más abundante *Cocconeis placentula* con un 31,37% acumula casi el mismo número de individuos que la segunda y la tercera especie más abundante (35,72%). Las tres especies más abundantes corresponden al mismo género, aunque se podrían agrupar en dos especies ya que en algunas bibliografías (Blanco et al., 2011; ID-TAX España) *Cocconeis euglyptoides* se presenta como una variedad de *Cocconeis placentula* bajo el sinónimo *Cocconeis placentula* var. *euglyptoides*. Este género se caracteriza por desarrollar su vida en aguas meso- o eutróficas, donde la corriente no es muy elevada y está asociado a la presencia de plantas y especies leñosas (Taylor et al., 2007), como es el caso del punto donde nos encontramos.

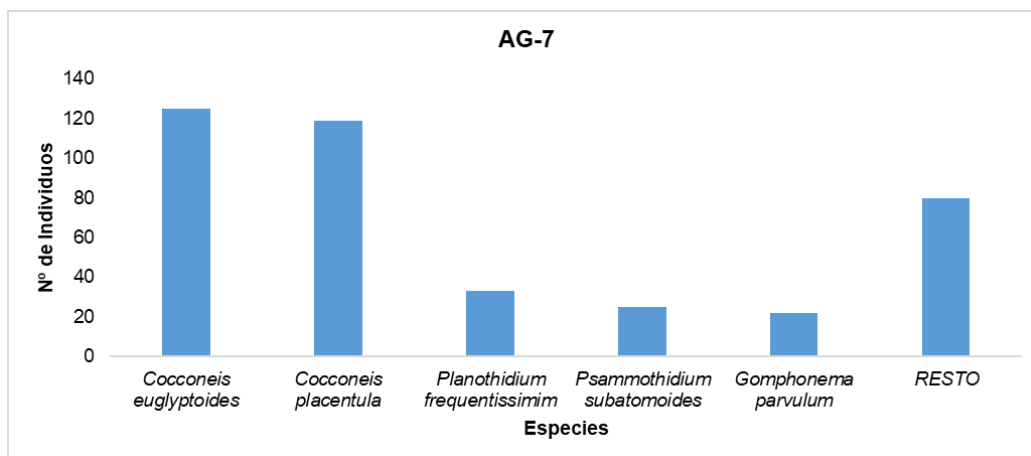


Figura 26. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-7

La muestra se compone de veintiséis especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 80,20% de los individuos (Fig. 26). Al igual que en la muestra anterior las dos especies más abundantes son del género *Cocconeis* y suponen el 60,40% del total de individuos. El hábitat de esta especie se confirma ya que, como se describió anteriormente, el punto AG-7 está ubicado en una zona cercana a cultivos y con presencia de ganado lo que puede suponer un aporte de nutrientes extra aumentando el potencial eutrófico del agua.

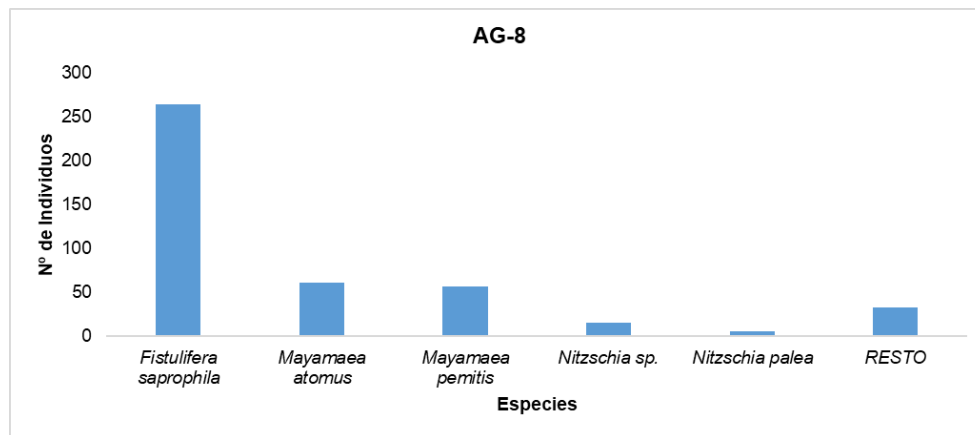


Figura 27. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-8

La muestra se compone de dieciocho especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 92,45% de los individuos (Fig. 27). Existe una gran dominancia de *Fistulifera saprophila*, la cual acumula el 60,64% de los individuos presentes. Es una especie cosmopolita que se encuentra en aguas muy eutróficas, antropogénicamente impactadas y muy contaminadas. Pertenece al grupo de especies pobres de las diatomeas más resistentes de todas (Taylor et al., 2007). El punto AG-8 ubicado en el río Rivera de Huelva, entrada al Embalse de Aracena, se encontraba al mínimo de su capacidad. La abundancia de esta especie nos puede indicar que las condiciones de esa masa de agua no son las más idóneas para el desarrollo de la vida acuática. La segunda y tercera especie más representadas son del género *Mayamaea*, que también están asociadas a aguas contaminadas. Son diatomeas de las más resistentes a la contaminación, pero también se encuentra en aguas de calidad moderada, probablemente asociada a un microhábitat, por ejemplo, detritus orgánicos (Taylor et al., 2007).

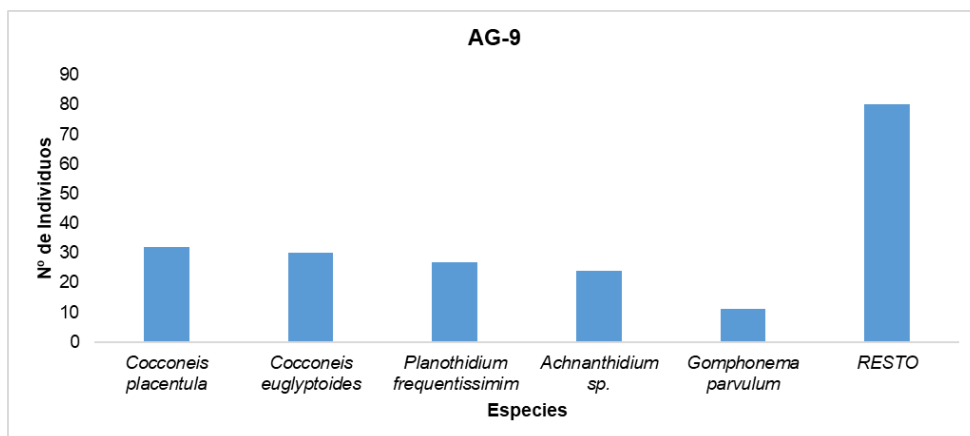


Figura 28. Especies más abundantes en el punto de muestreo AG-9

La muestra se compone de veintiocho especies, de las cuales cinco de ellas acumulan el 60,78% de los individuos (Fig. 28). En esta última muestra el reparto de individuos entre las especies más abundantes es más equitativo, donde las cuatro especies más abundantes presentan un promedio del 13,85% de los individuos cada una. Del género *Cocconeis* ya hemos comentado en gráficas anteriores sus características en lo a que al hábitat se refiere. Con respecto al género *Planothidium* decir que es un género común y que soportan un contenido de electrolitos de moderado/alto capaz de tolerar la contaminación (Taylor et al., 2007).

Antes de continuar vamos a tratar de resumir las relaciones existentes entre las distintas muestras en lo que a géneros representados se refiere.

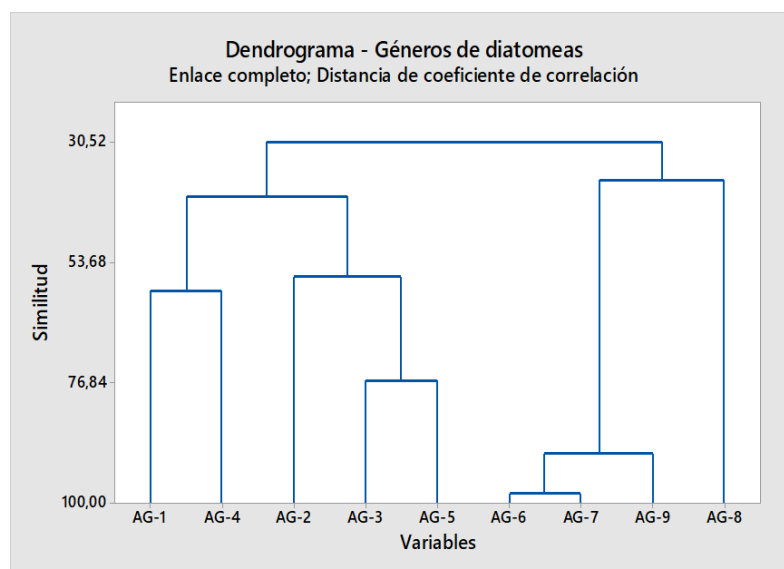


Figura 29. Resultados del análisis "Cluster" para comprobar la similitud entre muestras

El dendrograma (Fig. 29) trata de explicar la similitud entre los puntos de muestreo basada en los géneros presentes en cada muestra. Podemos observar que se existe una división en dos bloques, en uno estarían las muestras AG-1 a AG-5 y en el otro de AG-6 a AG-9. Entre ambos bloques existe una diferencia del 70%

aproximadamente (1-similitud). Las dos muestras más similares, con más de un 90% de similitud sería AG-6 y AG-7, seguidas de la similitud entre AG-9 y las dos muestras mencionadas anteriormente.

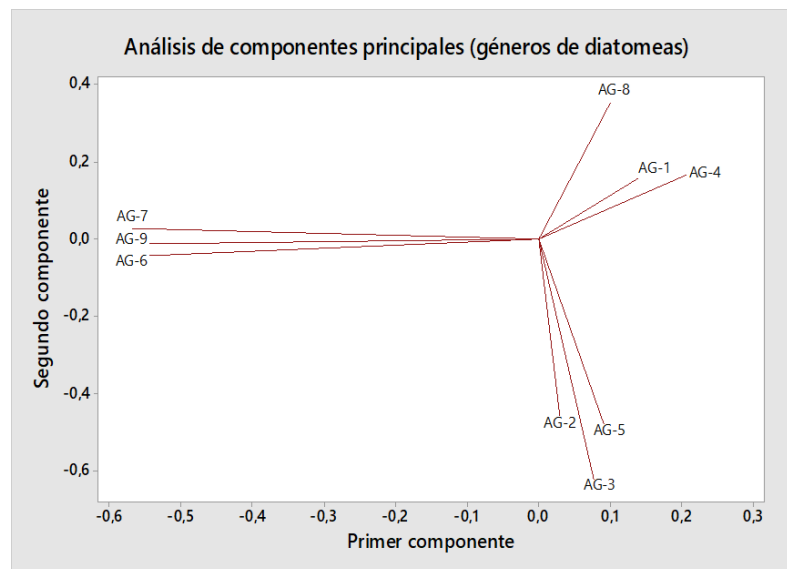


Figura 30. Análisis de componentes principales (PCA) en relación a los géneros representados en cada muestra

Tras realizar un análisis más exhaustivo (Fig. 30) por medio de la técnica de análisis de componentes principales (ACP) podemos reordenar nuestra clasificación anterior y definir tres grupos de “parentesco” en relación a los géneros que los constituyen. Si echamos un vistazo a la composición por géneros de cada muestra (Figs. 20-28) podremos corroborar que realmente el resultado del ACP arroja un resumen de la similitud composicional de cada punto de estudio.

Tras realizar la prueba de Anderson Darling y confirmar que nuestros datos no se ajustan a una distribución normal se procedió al estudio de la correlación entre géneros, por medio de la correlación de Spearman (Fig. 31).

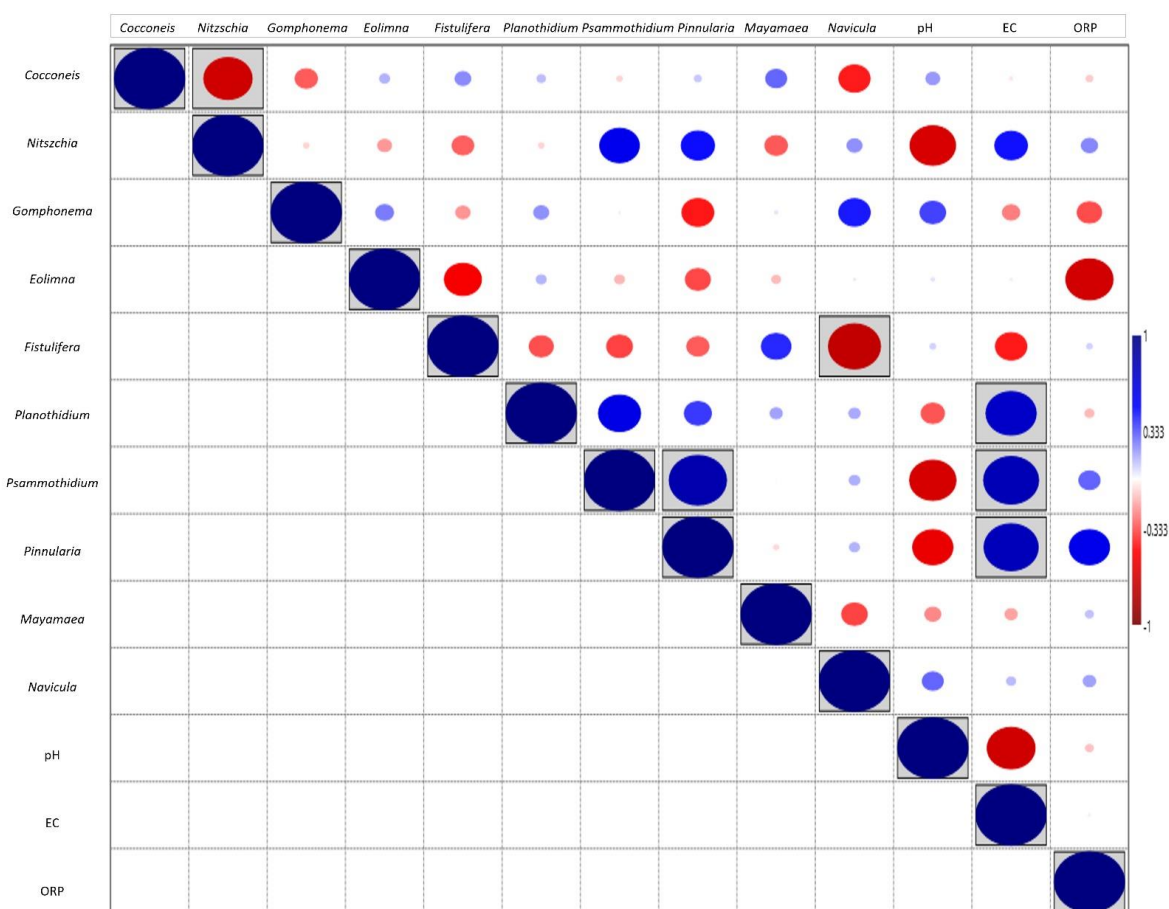


Figura 31. Correlación de Spearman

Observamos correlación significativa ($p < 0,05$) negativa entre *Cocconeis* y *Nitzschia* y entre *Navicula* y *Fistulifera*, y positiva entre la conductividad y *Planothidium*, *Fistulifera* y *Pinnularia*. También es positiva y significativa entre *Psammothidium* y *Pinnularia*.

3.2.1. Índices de biodiversidad

Tabla 6. Índices de biodiversidad

	AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5	AG-6	AG-7	AG-8	AG-9
Riqueza (S)	42	30	39	27	38	24	26	18	28
Individuos	392	426	248	457	515	322	404	437	204
Dominancia (D)	0.22	0.19	0.06	0.16	0.24	0.19	0.20	0.41	0.09
Simpson (1-D)	0.78	0.81	0.94	0.84	0.76	0.81	0.80	0.59	0.91
Shannon (H')	2.39	2.28	3.15	2.44	2.22	2.03	2.09	1.40	2.75
Margalef (I_{mg})	6.87	4.79	6.89	4.25	5.93	3.98	4.17	2.80	5.08
Pielou (J)	0.64	0.67	0.86	0.74	0.61	0.64	0.64	0.48	0.82

Comenzaremos explicando los valores obtenidos para el índice de Simpson (1-D), como ya se ha comentado no es un índice de biodiversidad propiamente dicho, sino que se encarga de explicar si dentro de una misma comunidad existe dominancia de algunas especies sobre otras. En el caso de nuestras zonas de estudio el valor más bajo de 1-D se presenta en la muestra AG-8, esto quiere decir que existe una especie que se alza sobre el resto. Este valor tan bajo es debido a que como ya vimos en apartados anteriores (Fig. 27) existía una especie que acaparaba el 60% del total de individuos. Por el contrario, los índices de 1-D más altos y por ende las zonas de estudio más heterogéneas, los puntos AG-3 y AG-9 representan comunidades donde existe una dominancia menor o casi nula y un mejor reparto de los individuos en el total de las especies.

A continuación, pasaremos a comentar el índice de Shannon (H'). Este índice cuantifica la denominada biodiversidad alfa (α), la biodiversidad propia de una zona concreta. El índice de Shannon suele encontrarse entre 0,5 y 5, por debajo de 2 suele considerarse poca diversidad y por encima de 3 se consideran altos. Raramente sobrepasa 4,5.

Todos los puntos de muestreo, salvo AG-3 y AG-8, presentan valores entre 2 y 3 lo que podemos interpretar como un nivel de biodiversidad medio o moderado. Los dos puntos de muestreo mencionados son completamente antagónicos, puesto que AG-3 presenta el valor de H' más elevado (3,15) y por lo tanto catalogado como alta biodiversidad frente a AG-8 (1,40) y de biodiversidad más pobre.

Para comprender mejor la estructura que siguen las especies dentro de una comunidad no basta solo con medir su dominancia o heterogeneidad, también es necesario saber si las especies se distribuyen de una forma equitativa. Para ello se emplea el índice de Pielou (J) el cual nos dice que cuando el valor se aproxima a 1 la equitatividad dentro de la comunidad es elevada. Tal y como cabe esperar, ya que J es un reflejo de H' las comunidades más equitativas corresponden a AG-3 y AG-9, con valores de 0,86 y 0,82 respectivamente.

Para finalizar estudio de la diversidad alfa, pasaremos a comentar uno de los índices más antiguos y simples que podemos utilizar en cuanto al análisis de la diversidad se refiere, el índice de Margalef. Este índice será mayor cuanto mayor sea la riqueza (S) de especies en una zona concreta, interpretándose como una zona de mayor biodiversidad. El índice de Margalef nos sirve para hacernos una idea aproximada de la biodiversidad presente pero no tiene en cuenta el peso o la importancia de la especie dentro de esa comunidad.

A modo de resumen sobre la diversidad alfa en nuestra zona de estudio comentar que, tanto AG-3 como AG-9 son las zonas de mayor diversidad aun no siendo las

comunidades que más individuos poseen. El resto de zonas de muestreo, a excepción de AG-8, se catalogan como zonas de diversidad moderada. AG-8 es sin duda el punto de muestreo que peores valores de diversidad ofrece, asociados a una calidad del agua deficiente según el IPS, como veremos posteriormente. Para el punto AG-5, no se muestran valores bajos de diversidad ni de equitatividad.

Por último, estudiaremos la diversidad beta (β), diversidad entre hábitats o intercambio de especies. Para ello procederemos al análisis del índice de Whittaker, comparando por pares de muestras el valor β .

Tabla 7. Índice beta de Whittaker, comparación por pares

	AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5	AG-6	AG-7	AG-8	AG-9
AG-1		0,56	0,63	0,62	0,60	0,61	0,47	0,67	0,63
AG-2			0,68	0,61	0,56	0,48	0,64	0,63	0,59
AG-3				0,73	0,58	0,62	0,54	0,72	0,67
AG-4					0,66	0,73	0,74	0,73	0,71
AG-5						0,65	0,66	0,64	0,70
AG-6							0,52	0,57	0,62
AG-7								0,68	0,56
AG-8									0,78
AG-9									

La interpretación de este índice no debe tomarse a la ligera, es un índice de disimilitud por lo que valores altos indican que la tasa de recambio y/o la diferencia entre especies de una comunidad a otra es elevada. Es decir, si comparamos dos comunidades donde no hay ni una sola especie común entre ambas el índice toma el valor de 1.

De este modo, y expresando los datos en forma de porcentaje, podemos afirmar que las dos comunidades de diatomeas que más difieren entre sí son AG-8 y AG-9 donde el 78% de las especies son diferentes (Tabla 7). Por el contrario, AG-1 y AG-7 comparten el 53% de las especies, seguido de AG-6 y AG-2 que comparten el 52%. El resto de puntos de muestreo difieren entre sí entre un 52-74%. La diferencia total de las comunidades estudiadas se distribuye homogéneamente con un promedio de un 63% de diferencia de especies entre ambas (Fig. 32).

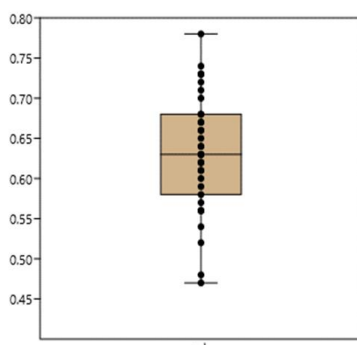


Figura 32. Diagrama de cajas y bigotes con la distribución del índice de Whittaker

3.2.2. Relaciones entre parámetros físico-químicos y los diversos índices.

Para comprender de una forma global la relación existente entre todo lo anteriormente expresado debemos realizar un análisis de las relaciones existentes entre los distintos componentes que entran en juego.

En primer lugar, se procede a comparar como la diversidad interactúa con las características físicas y químicas del medio.

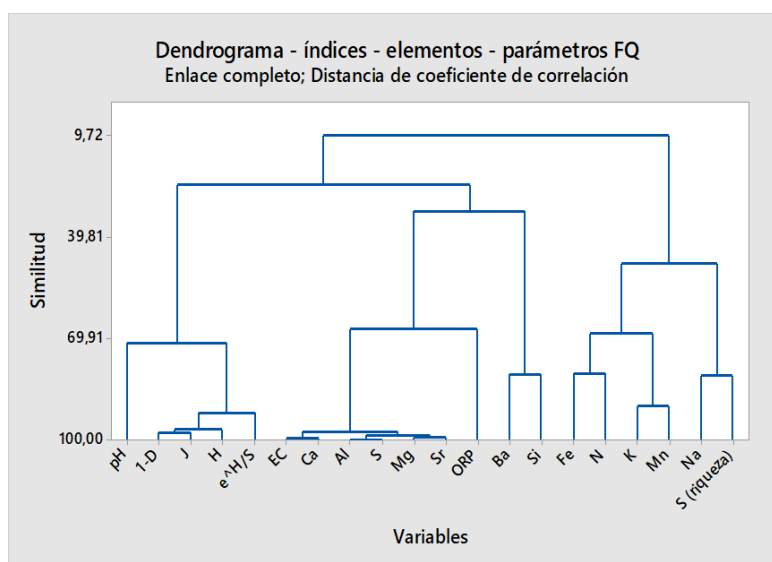


Figura 33. Análisis "Cluster". Relaciones entre índices y características químicas

La figura 33 nos muestra la estrecha relación existente entre algunos elementos químicos (Al, S, Ca, etc) presentes en el agua y la conductividad eléctrica (Ec) de la misma, ya que se correlacionan prácticamente en un 100%. También muestra la relación de los elementos anteriores con el potencial de óxido reducción (ORP) de un

70% aproximadamente, ya que no son solo esos elementos los que influyen en el valor de ORP. También podemos comprobar como los índices de diversidad, además de relacionarse entre sí, presentan una alta relación con el pH ya que este actúa como factor limitante al desarrollo de algunas especies. En función de los valores de pH pueden presentarse unas especies u otras. Por ejemplo, en aguas ácidas (pH 2-3) como en Drenaje Acido de Mina el ambiente es tan extremo que solo algunas especies de diatomeas pueden sobrevivir, además este pH es el que controla la química de los metales presentes en la disolución (Leiva et al., 2020).

Continuando con nuestras comparaciones, y por medio del ACP de la figura 34 podemos agrupar los parámetros en función del componente que explican. Comprobándose así que efectivamente los índices de diversidad tienen relación entre sí y que tanto ORP como Ec son dependientes de la concentración de S, Al, Ca, Sr y Mg.

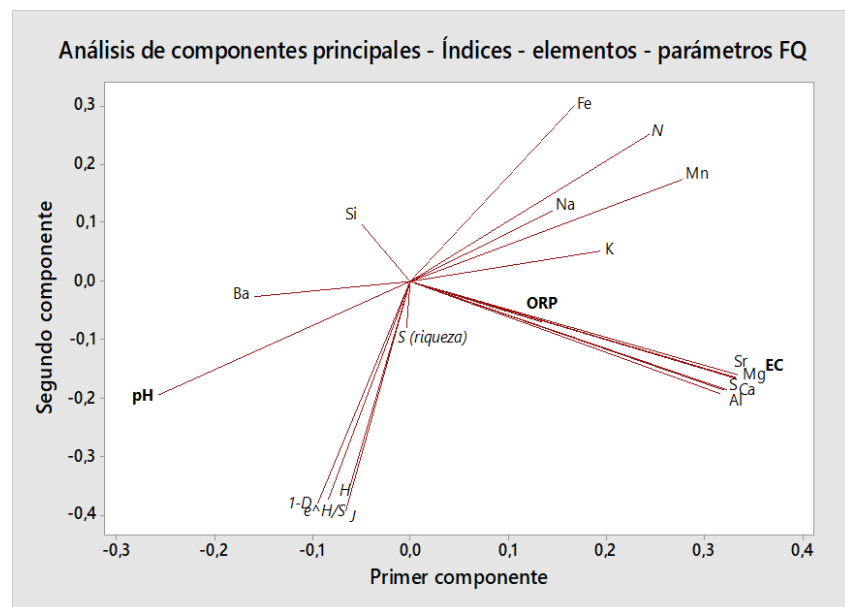


Figura 34. Análisis de componentes principales, diversidad vs características físicas y químicas.

Por último, añadiremos al análisis anterior un factor. En este caso tendremos en cuenta los géneros que están presentes en puntos de muestreo (Fig. 35).

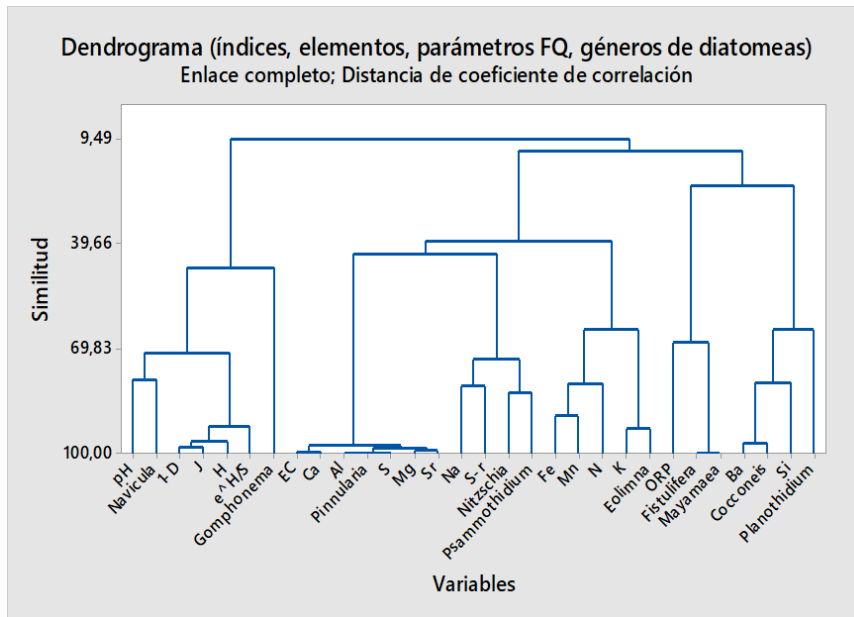


Figura 35. Análisis "Cluster". Relaciones entre índices, características química y géneros

De este modo se pueden visualizar que factores influyen en el desarrollo de cada especie. Por ejemplo, el género *Navicula* está altamente condicionado por el pH y tanto *Fistulifera* como *Mayamaea* son fuertemente dependientes del potencial de óxido reducción.

En lo que al análisis de componentes principales se refiere (Fig. 36) podemos observar que la presencia de *Pinnularia* se asocia a la concentración de metales, algo completamente lógico puesto que *Pinnularia subcapitata* es una especie predominante en aguas ácidas (Leiva et al., 2020).

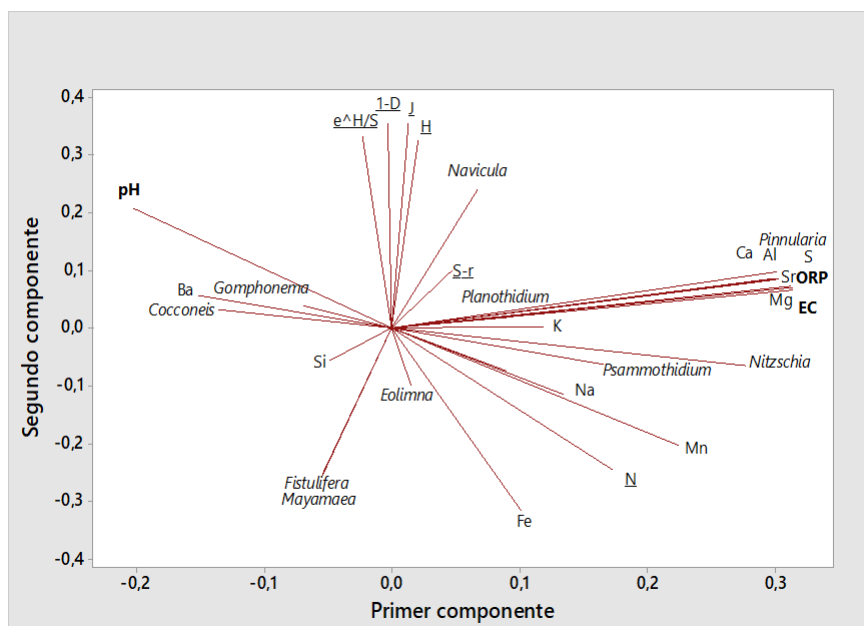


Figura 36. Análisis de componentes principales, diversidad vs características físicas y químicas vs géneros.

Utilizando similitud de Bray-Curtis y un algoritmo matemático que se llama algoritmo de Fruchterman-Reingold se puede hacer una gráfica de redes o “network” (Fig. 37), que indica las relaciones entre los puntos de muestreo.

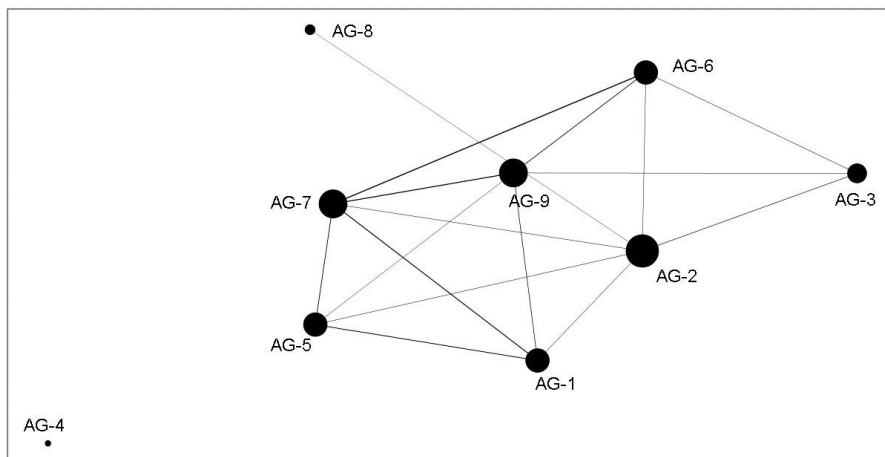


Figura 37. Análisis de Redes

Podemos observar que AG-4 no se relaciona con ningún otro punto de muestreo. AG-8 también es singular, aunque hay una relación débil con AG-9. Cuando las líneas son más gruesas mayor es la relación, en este caso es AG-9 quien más relaciones establece con el resto de muestras. El tamaño de los círculos indica el número de nodos. Cuanto más pequeño habrá menos nodos con los que se relacione. Lógicamente el más pequeño es el punto AG-4. El punto de muestreo con mayor número de nodos sería AG-2. Los dos puntos de muestreo con más relación entre sí serían AG-6 y AG-7. Los nodos representan los objetos o variables de estudio y las aristas representan las conexiones entre los nodos.

3.2.3. Índice de Polusensibilidad específica

Este índice se calcula con la ecuación 2. Para ello se han tenido en cuenta las diez especies más abundantes de cada muestra y los valores de IPS-V e IPS-S que pueden consultarse en ID-TAX para el caso de las diatomeas de España. No se han tenido en cuenta para este cómputo los individuos identificados a nivel de género, aunque su abundancia relativa fuese significativa ya que no se le puede aplicar valores de S_j y V_j . En el caso de que en la selección de las diez especies con mayor número de individuos se llegase al punto de que en la décima especie la abundancia sea igual a las sucesoras se continuará la selección hasta que esta abundancia cambie.

En la tabla 8 se muestran los valores de IPS obtenidos y su clasificación en función de la calidad del agua (Tabla 3).

Tabla 8. Valores de IPS y clasificación de la calidad del agua

Muestra	IPS	Calidad del agua
AG-1	14.9	Buena
AG-2	12.5	Moderada
AG-3	13.6	Buena
AG-4	15.0	Buena
AG-5	6.5	Deficiente
AG-6	13.9	Buena
AG-7	14.3	Buena
AG-8	6.1	Deficiente
AG-9	11.8	Moderada

Como podemos observar la mayoría de los puntos de estudio presentan una calidad del agua de buena a moderada, salvo AG-5 y AG-8 que ambas masas se catalogan como deficientes. Estos resultados deficientes en cuanto a lo que IPS se refiere viene dados por la gran presencia de géneros como *Eolimna* o *Fistulifera*, asociados a zonas de peor calidad por su gran resistencia y tolerancia a la contaminación y a las malas condiciones de vida, soportando también los efectos antrópicos y los altos niveles de eutrofización.

Que la gran mayoría de las muestras presenten buena calidad del agua es bastante reconfortante a la vez que lógico, al encontrarnos en una zona que no está afectada por drenaje ácido de mina (DAM), ambiente muy extremo para el desarrollo de la vida, fenómeno por el cual la calidad del agua se reduce (Leiva et al., 2020).

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En general la calidad del agua de nuestra zona de estudio es buena. Existen algunos puntos de peor calidad, como el embalse de Aracena y la muestra próxima a Arroyomolinos de León, aunque en ninguno de ellos se presentan aguas ácidas. En cuanto a contaminación por metales tan solo una de las ubicaciones, la muestras AG-4, presenta concentraciones algo más elevadas de lo normal, pero no preocupantes. Como podemos observar este punto difiere completamente del resto. Referente a la diversidad, al igual que la calidad general del agua, es buena en todos los puntos muestreados salvo en el embalse de Aracena. Esta baja calidad se debe al poco caudal y a la presencia de eutrofización incipiente.

Por otro lado, se verifica la validez de las diatomeas como bioindicadores de calidad del agua y se pone de manifiesto la funcionalidad de la norma UNE-EN 13946:2014. Además de la aplicación de los índices de diversidad para mejorar la comprensión del estado ecológico de las masas de agua continentales.

REFERENCIAS

- Alonso, A., y Valladares, F., 2007. International efforts on global change re- search. En: Chuvieco, E. (eds.), *Earth Observation of Global Change*. Springer, pp. 1–22. Dordrecht, Holanda.
- Alpert, P., Krichak, S. O., Shafir, H., Haim, D., y Osetinsky, I. (2008). Climatic trends to extremes employing regional modeling and statistical interpretation over the E. Mediterranean. *Global and Planetary Change*, 63(2–3), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2008.03.003>
- Antón, A., y Lizaso, J. (2001). Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid, España.
- Barceló, D., Carrera, J., 2008. Introducción: Consideraciones generales sobre recursos hídricos, calidad y tratamiento del agua en España. En Cyan, *Proyectos y Producciones Editoriales, S.A. (Ed.). Aguas continentales. Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua* (pag 13-18).
- Benoiston, A. S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S., y Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160397.
- Beyene, A., Addis, T., Kifle, D., Legesse, W., Kloos, H., y Triest, L. (2009). Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: Case study of the Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia. *ecological indicators*, 9(2), 381-392.
- Blanco, S., Álvarez, C., Cejudo-Figueira, I. y Bécares, S. (2011). *Guía de diatomeas de la Cuenca del Duero*. Confederación Hidrográfica del Duero, Valladolid.
- Blanco, S., Bécares, E., Hernández, N., y Ector, L. (2007). Evaluación de la calidad del agua en los ríos de la cuenca del Duero mediante índices diatomológicos. *Ingeriería Civil*, 146, 139-143.
- Blanco, S., Cejudo-Figueiras, C., Álvarez-Blanco, I., Bécares, E., Hoffmann, L. y Ector, L. 2010. *Atlas de las Diatomeas de la cuenca del Duero / Diatom Atlas of the Duero Basin*. Área de Publicaciones. Universidad de León. León, 386 pp.
- Bellinger, E. G. y Sigee, D. C. (2010). *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*

- Córdoba, F., Luis, A.T., Leiva, M., Sarmiento, A.M., Santisteban, M., Fortes, J.C., Dávila, J.M., Alvarez-Bajo, O., Grande, J.A. (2022) Biogeochemical indicators (waters/diatoms) of Acid Mine Drainage Pollution in the Odiel River (Iberian Pyritic Belt, SW Spain). *Environmental Science and Pollution Research (ESPR)*. doi: 10.1007/s11356-021-18475-2
- Coste, M., y Rosebery, J. (2007). Action 14: Développement et optimisation des méthodes de bioindication pour les cours d'eau. Guide iconographique pour la mise en œuvre de l'Indice Biologique Diatomée 2007
- de la Lanza-Espino, G., y Pulido, S. H. (2000). Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). Plaza y Valdés.
- Duran, C. y Pardos, P. 2015. Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco del agua en la confederación hidrográfica del Ebro. Ministerio de Medio Ambiente.
- Fernández Rodríguez, C., Díaz Azpiroz, M. "Geología de la Zona de Ossa-Morena (Sierra de Huelva)". En: Olías Álvarez, M., et al.: "Geología de Huelva: lugares de interés geológico". 2ª ed. Huelva: Universidad de Huelva, 2008. págs. 8-13
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., y Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *science*, 281(5374), 237-240.
- Gómez-Gómez, M., Danglot-Banck, C., y Vega-Franco, L. (2003). Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuándo usarlas. *Revista mexicana de pediatría*, 70(2).
- Grande, J.A., Beltrán, R., Sáinz, A. et al. Acid mine drainage and acid rock drainage processes in the environment of Herrerías Mine (Iberian Pyrite Belt, Huelva-Spain) and impact on the Andevalo Dam. *Env Geol* 47, 185–196 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00254-004-1142-9>
- Heip, C. H., Herman, P. M., y Soetaert, K. (1998). Indices of diversity and evenness. *Oceanis*, 24(4), 61-88.
- Hirst, H., Jüttner, I., y Ormerod, S. J. (2002). Comparing the responses of diatoms and macro - invertebrates to metals in upland streams of Wales and Cornwall. *Freshwater Biology*, 47(9), 1752-1765.

- Jenny, J. P., Anneville, O., Arnaud, F., Baulaz, Y., Bouffard, D., Domaizon, I., ... y Weyhenmeyer, G. A. (2020). Scientists' warning to humanity: rapid degradation of the world's large lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 46(4), 686-702.
- Leiva, M., Bryka, K., Romero, S., Santisteban, M., Dávila, J. M., Sarmiento, A. M., ... y Córdoba, F. (2020). Diatoms of the Odiel river basin: Distribution according to the degree of pollution by Acid Mine Drainage. *Comunicações Geológicas*, 107, 161-166.
- Lemarchand, K., Masson, L., y Brousseau, R. (2004). Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Critical reviews in microbiology*, 30(3), 145-172.
- Licursi, M., y Gómez, N. (2003). Aplicación de índices bióticos en la evaluación de la calidad del agua en sistemas lóticos de la Llanura Pampeana Argentina a partir del empleo de diatomeas. *Biología acuática*, (21), 31-49.
- Linares, J.E., Olofsson, L. y Sánchez, P. 2007 Comunidades de diatomeas epipélicas en las lagunas de alta montaña de Sierra Nevada (Granada, España). *Limnetica*. 26(1), 99 - 113.
- López-González, E., y Sánchez, R. H. (2010). Escalamiento Multidimensional No Métrico. Un ejemplo con R empleando el algoritmo SMACOF. *Estudios sobre educación*, 18, 9-35.
- Luis, A.T., Córdoba F., Antunes, C., Loayza-Muro, R., Grande, J.A., Silva, B., Diaz-Curiel, J., Ferreira da Silva, E. (2022) Extremely acidic eukaryotic (micro)organisms: life in Acid Mine Drainage polluted environments – a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 19(1):376 DOI: 10.3390/ijerph19010376
- Mann, D. G., y Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *Journal of eukaryotic microbiology*, 60(4), 414-420.
- Margalef, R. (1983). *Limnología*. Ed. Omega. 1010 pp.
- Margalef, R. (2005). *Ecología / Ramón Margaleff*. Omega (Ed)
- Markert, B., Wünschmann, S., Marcovecchio, J., y De Marco, S. (2013). Bioindicadores y biomonitores: definiciones, estrategias y aplicaciones. *Procesos Químicos en Estuarios*, 1.
- Masouras, A., Karaouzas, I., Dimitriou, E., Tsirtsis, G., y Smeti, E. (2021). Benthic diatoms in river biomonitoring—present and future perspectives within the water framework directive. *Water*, 13(4), 478.

- Olías, M., Nieto, J. M., Galvan, L., Sarmiento, A. M., y Canovas, C. R. (2007). Sobre la calidad del agua del futuro embalse de Alcolea (Cuenca del río Odiel, Huelva). *Geogaceta*, 42, 59-62.
- Olivares, B. (2014). Aplicación del análisis de componentes principales (ACP) en el diagnóstico socioambiental. Caso: Sector Campo Alegre, municipio Simón Rodríguez de Anzoátegui. *Multiciencias*, 14(4), 364-374.
- Oscoz J., Gomà J., Ector L., Cambra J., Pardos M. y Duran C. 2007. Estudio comparativo del estado ecológico de los ríos de la cuenca del Ebro mediante macroinvertebrados y diatomeas. *Limnetica*. 26(1), 143- 158.
- Pool, J.R., Kruse, N.A., Vis, M.L., (2013) Assessment of mine drainage remediated streams using diatom assemblages and biofilm enzyme activities. *Hydrobiologia* 709:101–116 DOI 10.1007/s10750-012-1440-2
- Razali, N. M., y Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2(1), 21-33.
- Rimet, F., y Bouchez, A. (2012). Life-forms, cell-sizes and ecological guilds of diatoms in European rivers. *Knowledge and management of Aquatic Ecosystems*, (406), 01.
- Rivera, M., Luís, A., Grande, J., Sarmiento, A., Dávila, J., Fortes, J., Córdoba, F., Diaz-Curiel, J., Santisteban, M. (2017). Physico-Chemical Influence of Surface Water Contaminated by Acid Mine Drainage on the Populations of Diatoms in Dams (Iberian Pyrite Belt, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22), 1-15, 2019 Mar *Pollut Bull.* 124(1):336-348
- Rodríguez, J. R. M. (2016). *Ecología / Jaime Rodríguez Martínez ; colaboradores José María Blanco Martín, Valeriano Rodríguez Martínez (4a ed.)*. Pirámide.
- Round, F. E., Crawford, R. M., y Mann, D. G. (1990). *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge university press.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L. R., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M., y Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459), 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>

- Soler, E. (2015). Tesis doctoral. Estudio de las diatomeas (Heterokontophyta, Bacillariophyceae) del bosque húmedo subtropical del Barranco de Azuaje, Gran Canaria, Islas Canarias. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
- Suresh, K., Tang, T., van Vliet, M., Bierkens, M. F., Strokal, M., Sorger-Domenigg, F., y Wada, Y. (2023). Recent advancement in water quality indicators for eutrophication in global freshwater lakes. *Environmental Research Letters*.
- Taylor, J. C., Harding, W. R., y Archibald, C. G. M. (2007). An illustrated guide to some common diatom species from South Africa (pp. 1-225). Pretoria: Water Research Commission.
- Urrea-Clos G. y Sabater S. 2009. Comparative study of algal communities in acid and alkaline waters from Tinto, Odiel and Piedras river basins. *Limnetica*. 28 (2), 261-272.
- Vitousek, P.M. (1994). Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75:1861–1876.
- Wolkersdorfer, C. (2008). Water management at abandoned flooded underground mines: fundamentals, tracer tests, modelling, water treatment. Springer Science & Business Media.
- Zhang, Y., Jeppesen, E., Liu, X., Qin, B., Shi, K., Zhou, Y., ... y Deng, J. (2017). Global loss of aquatic vegetation in lakes. *Earth-Science Reviews*, 173, 259-265.

ANEXOS

Anexo 1. Concentración (mg/L) de los principales elementos químicos por medio de ICP-OES

	AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5	AG-6	AG-7	AG-8	AG-9
Al	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
As	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Ba	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.3	0.2	<0.1	0.2
Ca	74.9	45.5	30.9	288.7	59.2	52.8	74.5	27.7	85.1
Cd	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Co	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Cr	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Cu	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Fe	0.4	<0.1	<0.1	0.2	0.4	<0.1	<0.1	0.6	<0.1
K	1.8	0.6	2.8	5.6	10.9	1.2	2.7	1.7	2.3
Mg	35.5	18.2	12.9	156.7	26.2	23.8	25.6	9.7	14.1
Mn	0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.3	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
Mo	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Na	33.5	12.9	12.1	19.1	32.9	9.1	20.1	13.3	20.5
Ni	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
P	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1.1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Pb	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
S	19.4	6.3	8.7	384.2	8.2	4.0	6.8	2.2	6.4
Si	13.3	6.6	<0.1	4.2	5.0	12.6	10.4	3.1	8.0
Sr	0.2	<0.1	<0.1	0.6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Ti	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
V	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Zn	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

Anexo 2. Resumen de especies

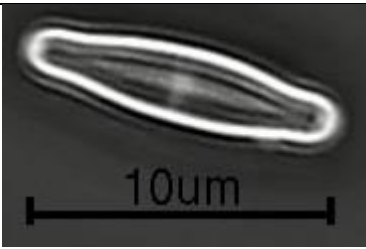


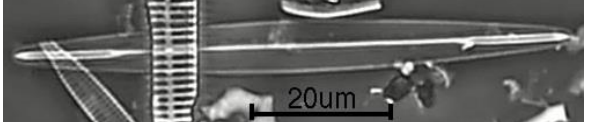
Especie	AG-1	AG-2	AG-3	AG-4	AG-5	AG-6	AG-7	AG-8	AG-9	SUMA
<i>Achnanthydium affine</i>	0	0	19	0	0	0	0	0	0	19
<i>Achnanthydium atomus</i>	0	0	0	0	0	11	0	0	0	11
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	2	14	0	0	0	0	0	0	3	19
<i>Achnanthydium sp.</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	24	30
<i>Amphipleura pellucida</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Amphora copulata</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Amphora inariensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Amphora veneta</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
<i>Aulacoseira ambigua</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cocconeis euglypta</i>	6	0	0	0	0	49	0	4	0	59
<i>Cocconeis euglyptoides</i>	0	0	1	0	0	66	125	0	30	222
<i>Cocconeis lineata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Cocconeis pediculus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	3

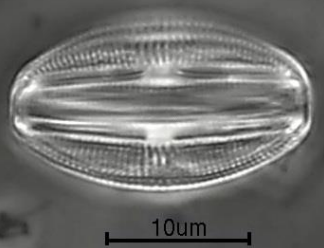
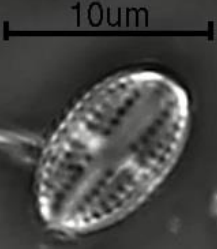
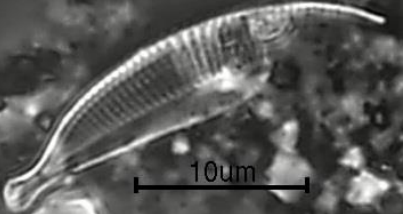
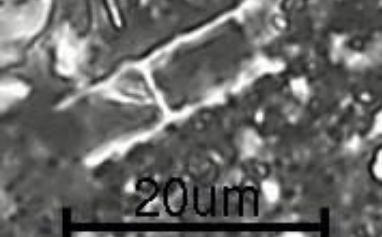
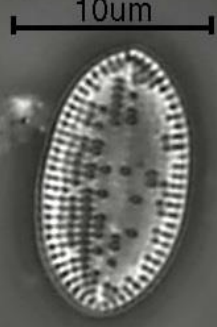
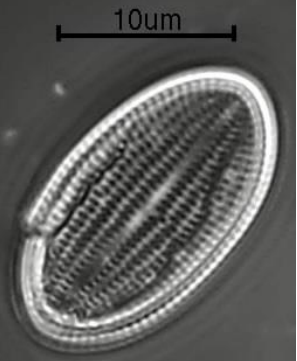
<i>Cocconeis placentula</i>	1	0	3	2	0	101	119	0	32	258
<i>Cocconeis placentula</i> <i>var. euglypta</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
<i>Craticula accomoda</i>	0	0	5	11	0	0	0	0	5	21
<i>Craticula ambigua</i>	0	6	0	0	46	1	0	0	2	55
<i>Craticula buderi</i>	0	0	1	0	8	0	0	0	0	9
<i>Cyclotella atomus var</i> <i>gracilis</i>	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	0	0	0	2	5	0	0	1	0	8
<i>Cyclotella ocelata</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	2	5
<i>Cyclotella striata</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Denticula sp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Denticula subtilis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Denticula tenuis</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>Diploneis smithii</i>	0	0	0	7	0	0	0	0	0	7
<i>Encyonema lange-</i> <i>bertalotii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Encyonema minutum</i>	0	11	0	0	1	2	0	0	0	14
<i>Encyonema neogracile</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Encyonema reichardtii</i>	2	0	2	0	0	1	6	0	0	11
<i>Encyonema silesiacum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Encyonema sp.</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	6	7
<i>Envekadeae sp.</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Eolimna minima</i>	0	0	36	0	236	47	15	0	0	334
<i>Eunotia exigua</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Eunotia minor</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Fistulifera saprophila</i>	2	2	0	0	0	2	1	265	9	281
<i>Fragilaria capuccina</i> <i>var. vauchariae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Fragilaria capucina</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>Fragilaria capucina</i> <i>var. rumpens</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Fragilaria cratonensis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Fragilaria vaucheriae</i>	0	19	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>Frustulia saxonica</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Gomphonema clavatum</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	4	6
<i>Gomphonema minutum</i>	0	160	17	0	15	2	0	0	10	204
<i>Gomphonema olivaceum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Gomphonema parvulum</i>	4	10	12	0	51	1	22	4	11	115
<i>Gomphonema pseudoaugur</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Gomphonema pumilum</i>	1	84	11	0	0	0	0	0	0	96
<i>Gomphonema sp.</i>	1	0	0	0	0	0	4	0	0	5
<i>Grunowia solgensis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Grunowia tabellaria</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Hantzschia amphioxys</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Karayevia clevei</i>	0	0	21	0	0	0	0	0	0	21
<i>Mayamaea atomus</i>	0	0	0	0	0	0	0	61	6	67

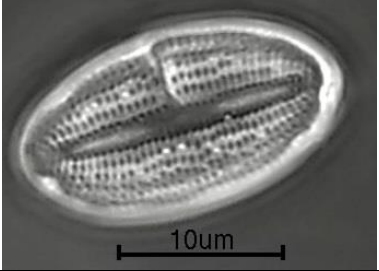
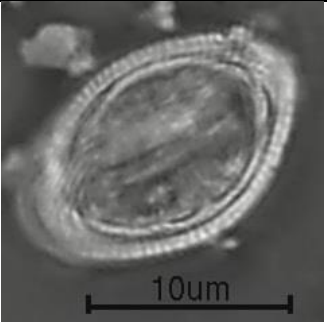

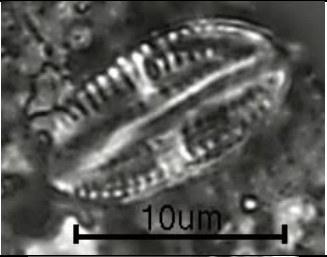
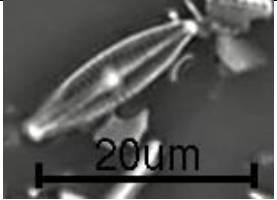
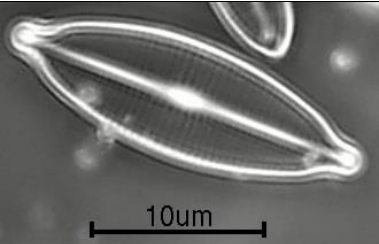
<i>Mayamaea pemitis</i>	4	0	1	0	4	0	8	57	0	74
<i>Meridium constrictum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Navicula antonii</i>	0	0	16	0	0	1	3	1	0	21
<i>Navicula cari</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Navicula erifuga</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Navicula lanceolata</i>	0	0	0	2	1	0	1	0	1	5
<i>Navicula recens</i>	0	20	18	27	1	0	0	2	0	68
<i>Navicula reichardtiana</i>	0	0	7	0	6	0	0	0	0	13
<i>Navicula sp.</i>	2	0	6	0	0	0	2	0	0	10
<i>Navicula symmetrica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Navicula tripunctata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>Navicula veneta</i>	2	0	1	0	0	0	1	0	0	4
<i>Navicula viridula</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Nitzschia acicularis</i>	0	0	3	0	1	0	0	0	0	4
<i>Nitzschia acidoclinata</i>	4	0	0	0	0	2	0	0	0	6
<i>Nitzschia amphibia</i>	17	0	0	0	1	0	3	0	0	21
<i>Nitzschia capitellata</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>Nitzschia clausii</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Nitzschia dissipata</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
<i>Nitzschia filiformis</i>	2	1	0	25	0	0	0	0	3	31
<i>Nitzschia fonticola</i>	4	0	0	16	7	0	0	4	0	31
<i>Nitzschia fossilis</i>	10	1	0	7	1	0	0	3	0	22
<i>Nitzschia frustulum</i>	48	8	0	0	16	7	0	1	3	83
<i>Nitzschia incognita</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
<i>Nitzschia inconspicua</i>	27	3	0	14	1	2	0	0	0	47
<i>Nitzschia linearis</i>	2	1	0	3	0	2	1	0	1	10
<i>Nitzschia media</i>	0	0	8	4	0	0	0	0	0	12
<i>Nitzschia palea</i>	2	25	5	24	30	2	0	6	0	94
<i>Nitzschia pusilla</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Nitzschia recta</i>	1	0	3	0	4	0	0	0	0	8
<i>Nitzschia sp.</i>	4	6	3	20	2	1	4	15	0	55
<i>Nitzschia supralitorea</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Nitzschia umbonata</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Pinnularia divergens</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>Pinnularia microstauron</i>	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10
<i>Pinnularia subcapitata</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Pinnularia subcapitata</i>	0	0	0	165	0	0	0	0	0	165
<i>Planothidium frequentissimim</i>	4	9	2	32	28	13	33	0	27	148
<i>Planothidium hauckianum</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	5	9
<i>Planothidium lamceolatum</i>	18	10	2	0	6	0	7	0	2	45
<i>Planothidium pseudotanense</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Planothidium robustius</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Planothidium sp.</i>	0	1	2	0	2	5	15	2	0	27

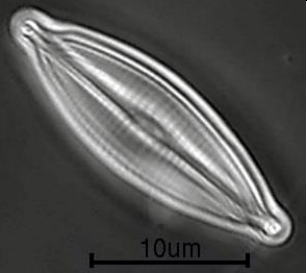
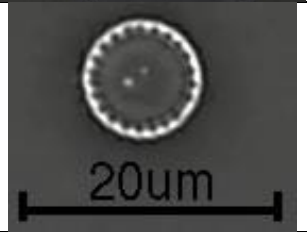
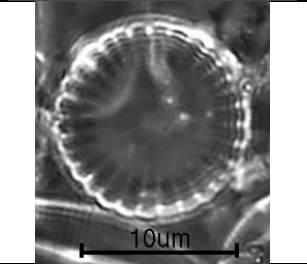
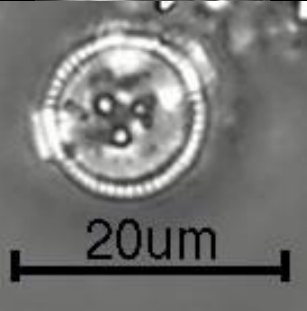
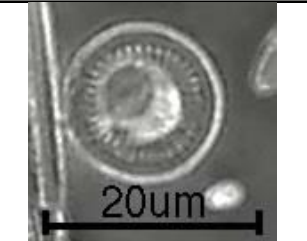
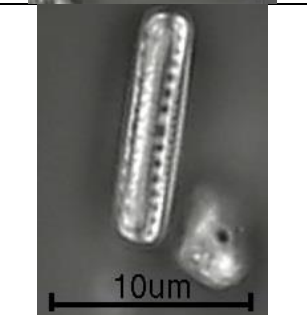
<i>Psammothidium subatomoides</i>	170	1	0	20	6	0	25	0	0	222
<i>Rhopalodia gibba</i>	0	1	0	16	0	1	0	0	0	18
<i>Rhopalodia operculata</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Rhopalodia sp.</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Sellaphora pupula</i>	3	0	1	0	1	0	0	0	0	5
<i>Sellaphora seminulum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Sellaphora stroemii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Surirella angusta</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>Surirella ovalis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Thalassiosira sp.</i>	4	4	5	0	0	1	1	4	7	26
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>Ulnaria acus</i>	0	0	11	1	0	0	0	0	3	15
<i>Ulnaria ulna</i>	11	11	3	40	4	0	3	0	2	74
SUMA	392	426	248	457	515	322	404	437	204	3405


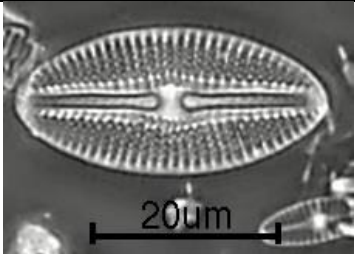
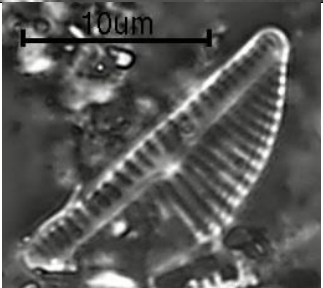
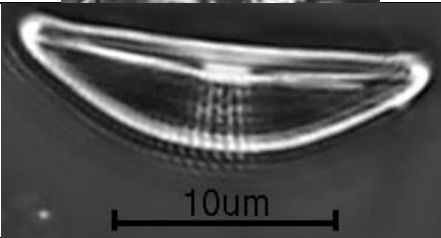
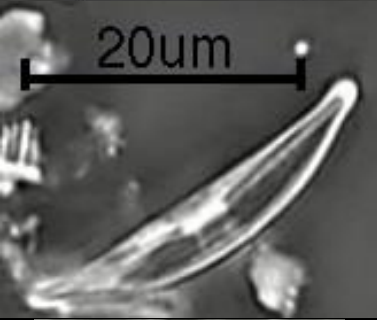
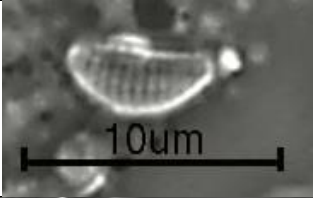

Anexo 3. Biblioteca de especies

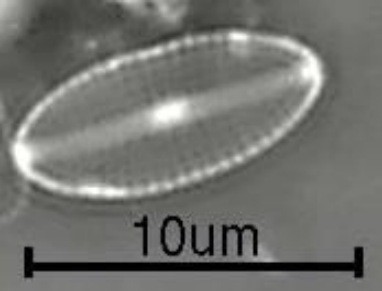
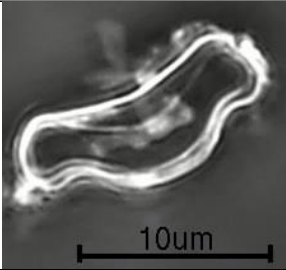

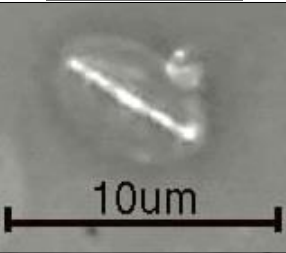
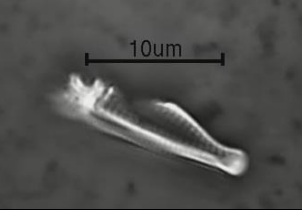
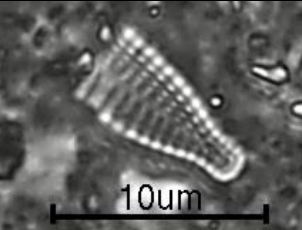
<i>Achnanthydium affine</i>	
<i>Achnanthydium atomus</i>	
<i>Achnanthydium minutissimum</i>	
<i>Amphipleura pellucida</i>	

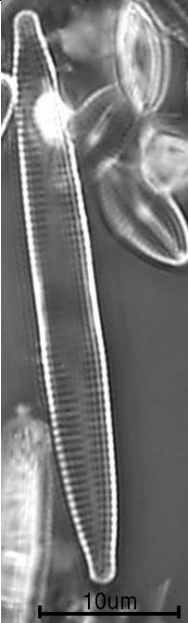


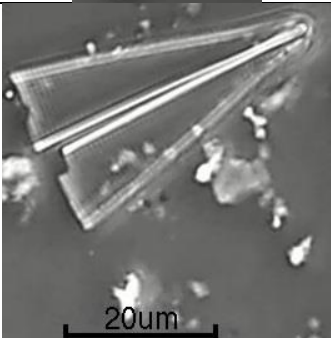
<i>Amphora copulata</i>			
<i>Amphora inariensis</i>			
<i>Amphora veneta</i>			
<i>Aulacoseira ambigua</i>			
<i>Cocconeis euglypta</i>			
<i>Cocconeis euglyptoides</i>			

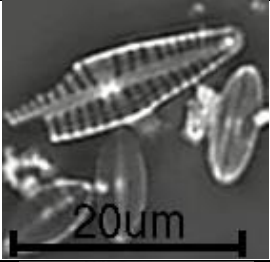
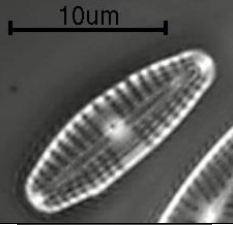

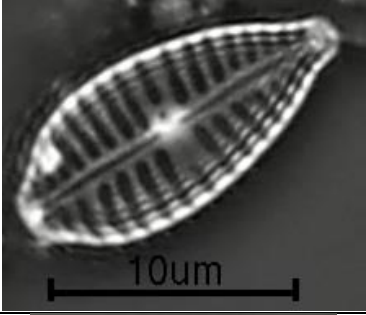
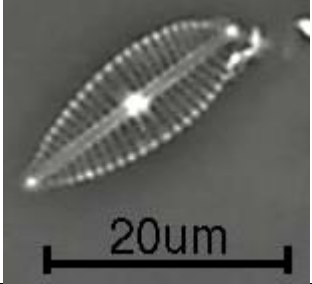
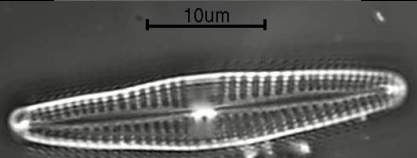
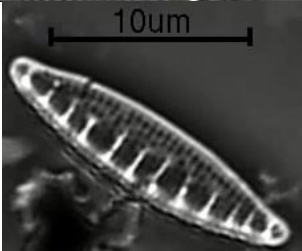
<i>Cocconeis lineata</i>	
<i>Cocconeis pediculus</i>	
<i>Cocconeis placentula</i>	
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i>	
<i>Craticula accomoda</i>	
<i>Craticula ambigua</i>	

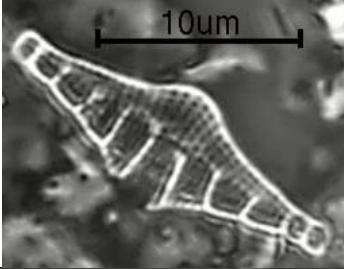
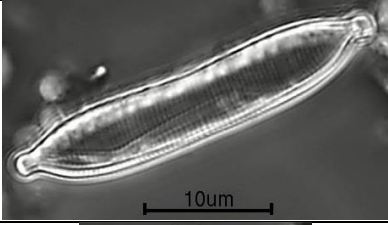

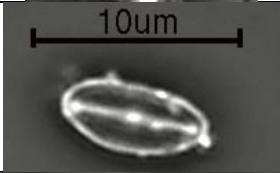
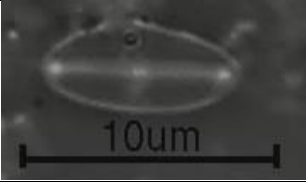
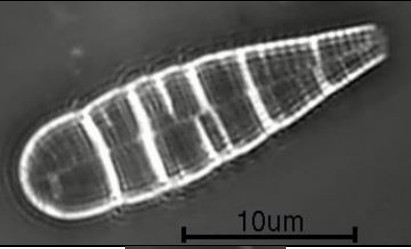
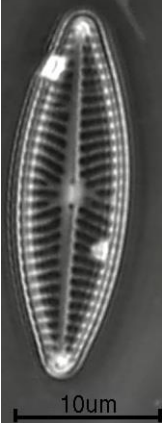
<p><i>Craticula buderi</i></p>	
<p><i>Cyclotella atomus var gracilis</i></p>	
<p><i>Cyclotella meneghiniana</i></p>	
<p><i>Cyclotella ocelata</i></p>	
<p><i>Cyclotella striata</i></p>	
<p><i>Denticula subtilis</i></p>	

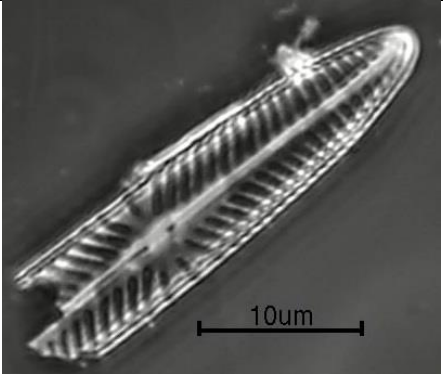
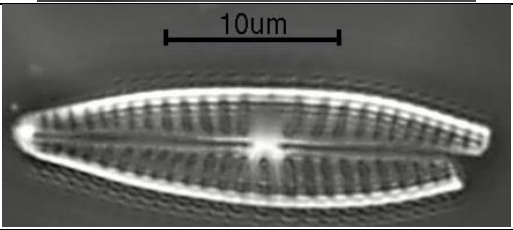
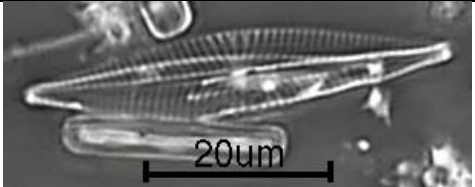
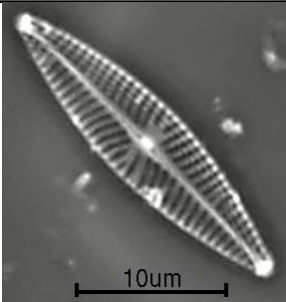
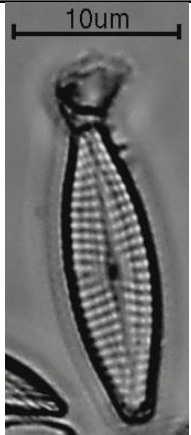
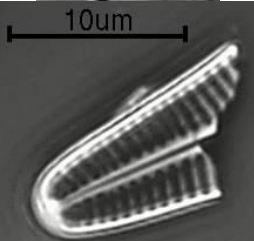
<p><i>Denticula tenuis</i></p>	
<p><i>Diploneis smithii</i></p>	
<p><i>Encyonema lange-bertalotii</i></p>	
<p><i>Encyonema minutum</i></p>	
<p><i>Encyonema neogracile</i></p>	
<p><i>Encyonema reichardtii</i></p>	
<p><i>Encyonema silesiacum</i></p>	

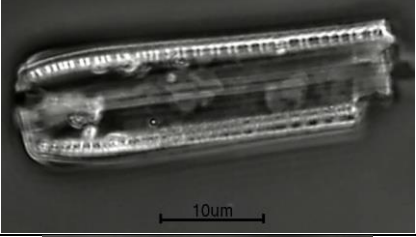
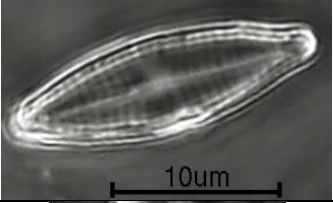

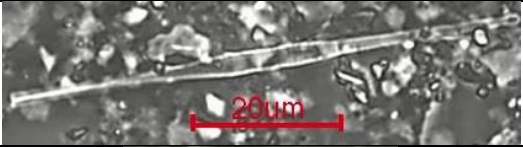
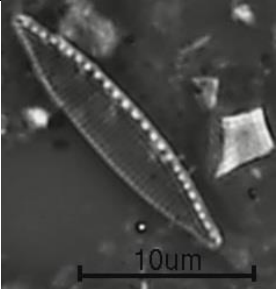
<i>Eolimna minima</i>	
<i>Eunotia exigua</i>	
<i>Eunotia minor</i>	
<i>Fistulifera saprophila</i>	
<i>Fragilaria capuccina</i> var. <i>vauchariae</i>	
<i>Fragilaria capucina</i>	

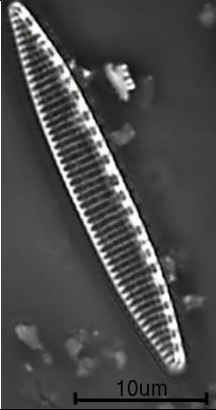
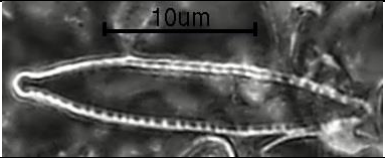
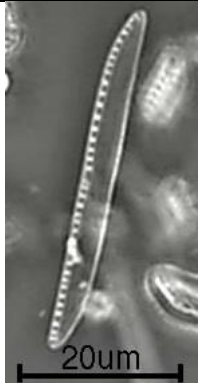
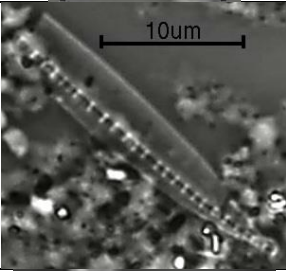
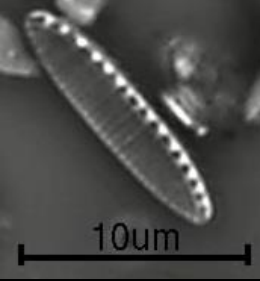
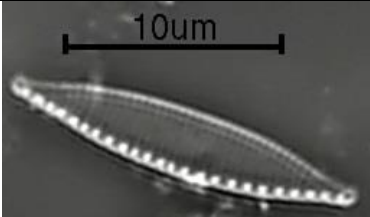
<p><i>Fragilaria capucina</i> var. <i>rumpens</i></p>	
<p><i>Fragilaria cratonensis</i></p>	
<p><i>Fragilaria vaucheriae</i></p>	
<p><i>Frustulia saxonica</i></p>	

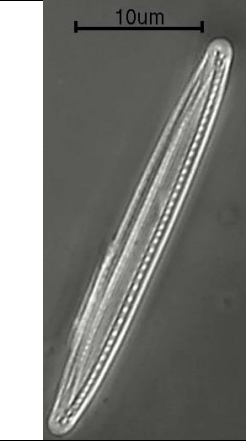
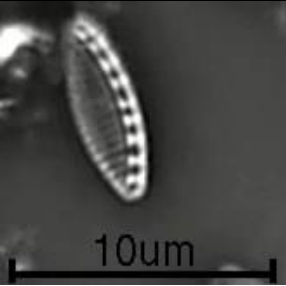
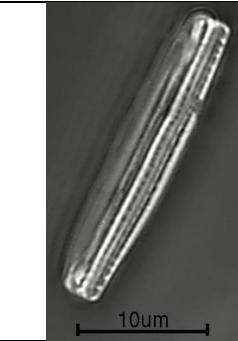
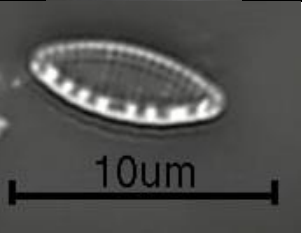
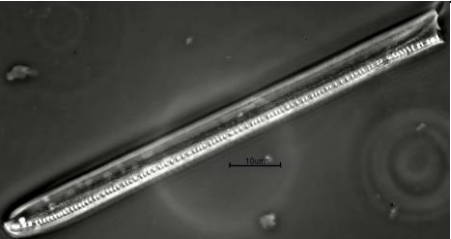
<i>Gomphonema clavatum</i>	
<i>Gomphonema minutum</i>	
<i>Gomphonema olivaceum</i>	
<i>Gomphonema parvulum</i>	
<i>Gomphonema pseudoaugur</i>	
<i>Gomphonema pumilum</i>	
<i>Grunowia solgensis</i>	


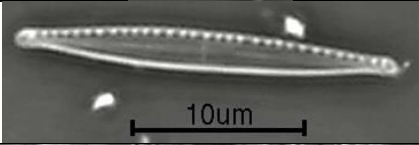
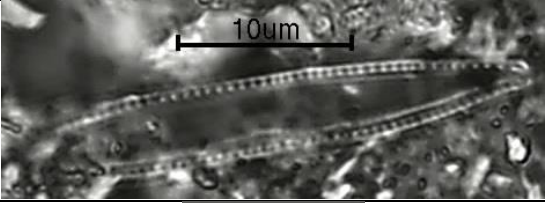
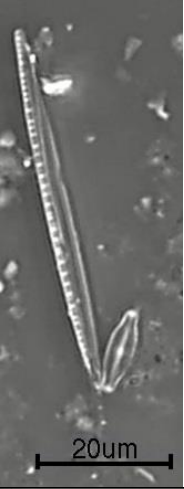

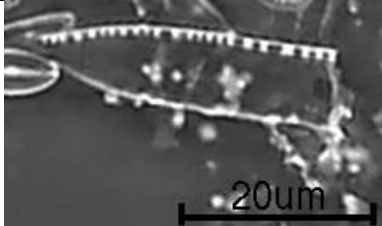
<i>Grunowia tabellaria</i>	
<i>Hantzschia amphioxys</i>	
<i>Karayevia clevei</i>	
<i>Mayamaea atomus</i>	
<i>Mayamaea pemitis</i>	
<i>Meridium constrictum</i>	
<i>Navicula antonii</i>	

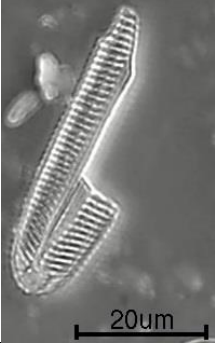
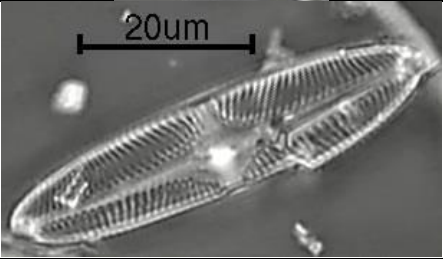
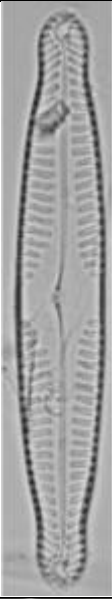
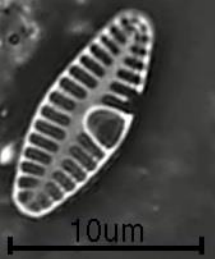
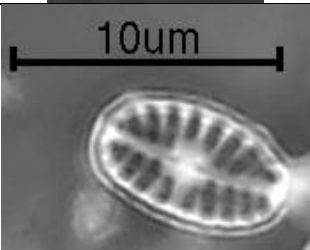
<p><i>Navicula cari</i></p>	
<p><i>Navicula erifuga</i></p>	
<p><i>Navicula lanceolata</i></p>	
<p><i>Navicula recens</i></p>	
<p><i>Navicula reichardtiana</i></p>	
<p><i>Navicula symmetrica</i></p>	

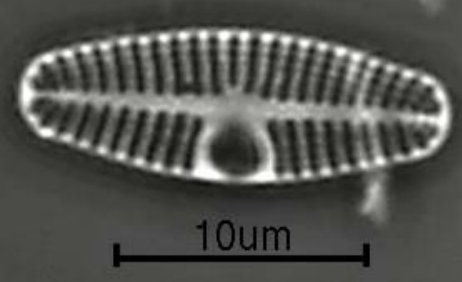
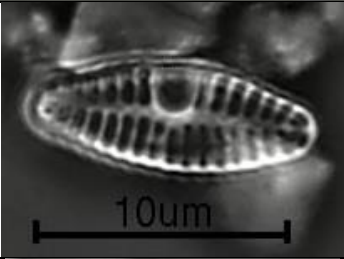
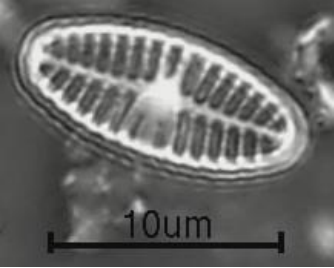
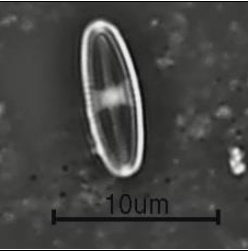
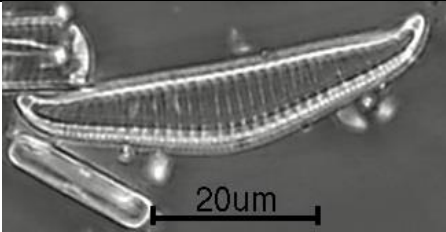
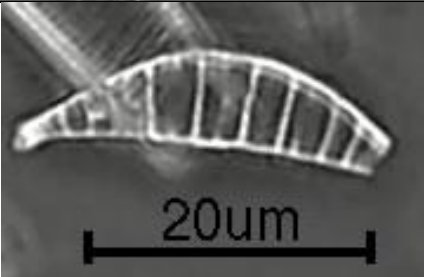
<p><i>Navicula tripunctata</i></p>	
<p><i>Navicula veneta</i></p>	
<p><i>Navicula viridula</i></p>	
<p><i>Nitzschia acicularis</i></p>	
<p><i>Nitzschia acidoclinata</i></p>	

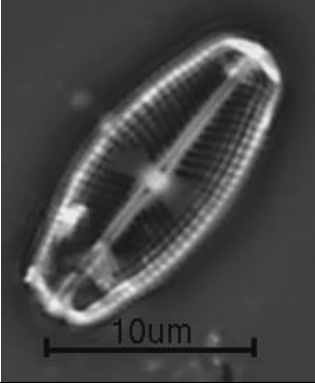
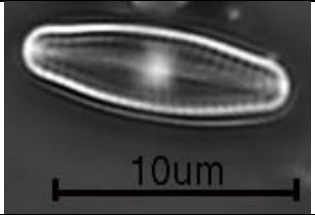

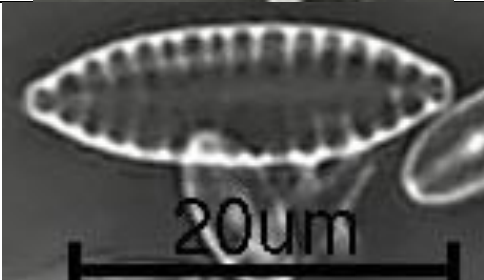
<p><i>Nitzschia amphibia</i></p>	
<p><i>Nitzschia capitellata</i></p>	
<p><i>Nitzschia clausii</i></p>	
<p><i>Nitzschia dissipata</i></p>	
<p><i>Nitzschia filiformis</i></p>	
<p><i>Nitzschia fonticola</i></p>	


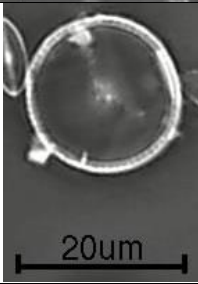
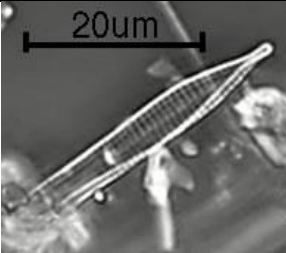
<p><i>Nitzschia fossilis</i></p>	
<p><i>Nitzschia frustulum</i></p>	
<p><i>Nitzschia incognita</i></p>	
<p><i>Nitzschia inconspicua</i></p>	
<p><i>Nitzschia linearis</i></p>	

<p><i>Nitzschia media</i></p>	
<p><i>Nitzschia palea</i></p>	
<p><i>Nitzschia pusilla</i></p>	
<p><i>Nitzschia recta</i></p>	
<p><i>Nitzschia supralitorea</i></p>	
<p><i>Nitzschia umbonata</i></p>	

<p><i>Pinnularia divergens</i></p>	
<p><i>Pinnularia microstauron</i></p>	
<p><i>Pinnularia subcapitata</i></p>	
<p><i>Planothidium frequentissimum</i></p>	
<p><i>Planothidium hauckianum</i></p>	

<p><i>Planothidium lamceolatum</i></p>	
<p><i>Planothidium pseudotanense</i></p>	
<p><i>Planothidium robustius</i></p>	
<p><i>Psammothidium subatomoides</i></p>	
<p><i>Rhopalodia gibba</i></p>	
<p><i>Rhopalodia operculata</i></p>	

<p><i>Sellaphora pupula</i></p>	
<p><i>Sellaphora seminulum</i></p>	
<p><i>Sellaphora stroemii</i></p>	
<p><i>Surirella angusta</i></p>	

<p><i>Surirella ovalis</i></p>	
<p><i>Thalassiosira weissflogii</i></p>	
<p><i>Ulnaria acus</i></p>	
<p><i>Ulnaria ulna</i></p>	