



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOLOGÍA, 2019-2020

**BIOINDICADORES ACUÁTICOS: ANÁLISIS DE
MICROORGANISMOS DE AGUA DULCE EN EL ENTORNO
DE UNA MINA EN ACTIVO.**

**AQUATIC BIOINDICATORS: ANALYSIS OF SWEETWATER
MICROORGANISM IN THE ENVIRONMENT OF AN ACTIVE MINING**



Elena Caldero Escudero

Grado en Biología, 2016-2020

20TFG304



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**800 AÑOS
VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

ÍNDICE

✚ Resumen.....	pág 3
✚ Introducción.....	pág 4
✚ Objetivos.....	pág 6
✚ Materiales y métodos.....	pág 7
○ Selección de los puntos de muestreo.....	pág 7
○ Descripción de los puntos de muestreo.....	pág 8
○ Condiciones de la recogida de los datos.....	pág 9
○ Recogida de muestras y medición de los parámetros físico-químicos.....	pág 10
○ Análisis de metales de la Charca 4.....	pág 10
○ Observación de las muestras a microscopía óptica y toma de fotografías.....	pág 11
○ Identificación y caracterización del fitoplancton.....	pág 11
✚ Resultados y discusión.....	pág 12
○ Resultados de las características físico-químicas.....	pág 12
○ Análisis y comparación de los datos físico-químicas.....	pág 13
○ Resultados del análisis de metales de los puntos 4 y 5.....	pág 14
○ Identificación de microorganismos y análisis de poblaciones	pág 15
✚ Conclusión.....	pág 19
✚ Anexo: fotografías de las especies identificadas	pág 19
✚ Bibliografía.....	pág 22

RESUMEN

Las actividades de reapertura de la explotación minera en el municipio de Barruecopardo (Salamanca) comenzaron en 2018, tras llevar 35 años cerrada, como consecuencia de la subida del precio del wolframio, que vuelve a ser rentable.

Previo a su puesta en funcionamiento, fue requerido un estudio de impacto ambiental con medidas correctoras y minimizadoras que permitiesen hacerla compatible con la conservación del medio natural del entorno. Las medidas más relevantes estaban direccionadas a la mitigación de las potenciales contaminaciones atmosféricas -por la emisión de moléculas volátiles perjudiciales- y acuática, -por lixiviación de sustancias tóxicas a las masas de agua cercanas-.

En este contexto de actividad minera ya en activo, se ubica en el presente trabajo, un examen comparativo del estado ambiental actual de las charcas y arroyos cercanos a la excavación, con respecto a los valores tomados de las mismas el primer año de apertura, en el cual se llevó a cabo únicamente la preparación del terreno y las instalaciones mineras. Esto se hace mediante la medición de las características físico-químicas de las muestras y el análisis cualitativo de las comunidades de microorganismos que las pueblan, por ser buenos bioindicadores de contaminación.

ABSTRACT

Reopening activities of a mine located in Barruecopardo (Salamanca), started in 2018 after being closed for 35 years, due to the rise in the price of tungsten, which made it profitable again. Before its set up, an ambiental impact study with corrective and minimizer measures was required, in order to make it compatible with the conservation of the natural environment. The most relevant measure were focus in the mitigation of potential atmospheric pollution caused by the emission of harmful volatile molecules and aquatic contamination caused by the leaching of toxic substances in the surrounding water bodies. It is in this context of already active mining activities where the present work focuses. A comparative study of the current environmental status of the ponds and creeks nearby the excavation regarding the samples taken from them in the first year of reopening during which only ground preparation works were carried out. This is done by measuring the physicochemical characteristics and carrying out a qualitative analysis of sweetwater microorganisms that belong to this habitats, as they are significant bioindicators of the presence of pollution.

INTRODUCCIÓN

El Wolframio o ‘Tungsteno’ es un elemento químico que se sitúa en el grupo 6 de la tabla periódica, catalogado como ‘metal de transición’, con número atómico 74 y símbolo W. No se encuentra en la naturaleza en su forma pura, pero sí combinado con otras sustancias químicas formando rocas y minerales. Posee el punto de fusión más elevado de todos los metales (3410°C, 6170°F) y es el elemento con mayor punto de ebullición (5900°C, 10,701°F). Es muy denso (19,3 g/cm³) y resistente a la tracción.

Por todas estas características, recogidas en bases de datos como PubChem (Kim et al, 2019), tiene multitud de aplicaciones, desde su uso en tubos de rayos X a electrodos y catalizadores. Incluso tiene un papel en el medio ambiente como micronutriente. Sin embargo, es escaso en la corteza terrestre y por ello actualmente es muy codiciado.

La mina de Barruecopardo, municipio ubicado al noroeste de la provincia de Salamanca, es la más importante de las explotaciones de wolframio de España. Comenzó a explotarse en 1912 y durante la Segunda Guerra Mundial alcanzó su máximo esplendor por la importancia de este metal en la maquinaria militar (Otones, 2014). Además de la extracción de minerales como scheelita (CaWO₄) y volframita (Fe, Mn) WO₄, se obtenía arsenopirita (FeAsS), que le daba mayor valor a la empresa, llegando a constituir el total de la producción de arsénico en España durante la última década de actividad minera, pues cerró en 1983 por la baja rentabilidad del metal. Ha permanecido abandonada hasta el año 2006, cuando la compañía minera Saloro SLU., la adquirió debido al aumento de la demanda del wolframio para su uso en nuevas tecnologías.

Se trata de un tipo de mina ‘a cielo abierto’ en el que se emplea la excavación con explosivos. Esta metodología fue la convencional en el pasado, pero debido a su gran impacto ambiental, el rechazo de las poblaciones cercanas a las explotaciones y a las estrictas medidas de seguridad requeridas, que acarrear grandes costes, está siendo abandonada (Somarriba, 2019). No es el caso de la mina de Barruecopardo, pues su reciente reapertura se ha mantenido en estas condiciones.

En el presente estudio, se llevará a cabo el análisis de los microorganismos que pueblan masas de agua de pequeño tamaño cercanas a la explotación (fundamentalmente fitoplancton), con el fin de evaluar el impacto ambiental que dicha actividad extractiva podría estar generando sobre el terreno, gracias a que las comunidades microscópicas habitan estos ambientes, son el reflejo del estado de salud del medio (Cordero et al., 2005). La presencia cualitativa de determinadas especies, es

indicadora de contaminaciones específicas sobre el terreno, ya que este tipo de organismos reaccionan rápidamente a los cambios de las condiciones de su entorno. En este apartado, las cianobacterias son excelentes bioindicadores ambientales, ya que integran los efectos de los diferentes factores estresantes y proporcionan una medida amplia de los impactos sobre sus comunidades (Mateo et al., 2015). Además, relacionan algunas de sus características morfológicas y fisiológicas con el entorno en el que se producen, siendo fiables y relativamente económicos. El uso de las cianobacterias, o fitoplancton en general, como bioindicadores tiene otras ventajas añadidas, como que al ser productores primarios y encontrarse en la base de la pirámide, no pueden verse condicionados por niveles anteriores.

Tradicionalmente, se han utilizado las propiedades físico-químicas de las masas de agua para evaluar su calidad, pero puede no ser una medida eficiente en la detección de fluctuaciones. En los últimos años ha crecido el estudio del efecto de metales en los ecosistemas acuáticos (Mayer-Pinto et al., 2010). La contaminación de los sedimentos y la biota acuática por la acumulación de los metales pesados puede tener un origen natural o antropogénico, siendo la agricultura y la industria las fuentes más importantes de este último. Hay que tener en cuenta la biodisponibilidad de los metales en el medio, pues la forma en la que se encuentran junto con los factores bióticos y abióticos serán los responsables de la toxicidad de los mismos en sistemas biológicos (Maldonado et al., 2011). En algunos casos, la presencia o la ausencia de determinados microorganismos puede ser la herramienta más útil para revelar determinadas concentraciones elevadas de metales pesados (Zhou et al., 2008).

Con todo ello, se pretende determinar mediante la comparación de las comunidades identificadas en muestreos previos (Hernández, 2019), cuando la mina se encontraba en un periodo de preparación para la reapertura (en la que la actividad extractiva *per se* no había comenzado), si la vuelta de actividad minera en Barruecopardo supone algún tipo de riesgo de contaminación por metales pesados, o si por el contrario la explotación está cumpliendo estrictamente con las medidas de contención y no se detectan repercusiones de esta índole, lo que supondría un ejemplo de responsabilidad ambiental, poco habitual en el campo de la industria extractiva.

OBJETIVOS

Los objetivos que persigue el presente trabajo son los siguientes:

- Conocer y aplicar una metodología de monitorización de impacto ambiental a consecuencia de una explotación minera a cielo abierto.
- Obtener y comparar las características físico-químicas de los puntos estudiados.
- Hallar las diferencias en las poblaciones de microorganismos de agua dulce que pueblan las charcas y vaguadas distribuidas en los alrededores de la mina, con respecto a muestreos anteriores.
- Determinar si existe contaminación por metales pesados en los alrededores de la mina de wolframio de Barruecopardo, a causa de su reciente reapertura. Si fuese así, precisar de qué elemento/s se trata.
- Concluir si existe menor, igual o mayor contaminación de dichas aguas con respecto al año anterior, en el que todavía no había comenzado la actividad extractiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los puntos de muestreo:

La toma de muestras se hizo en seis puntos ya escogidos y analizados en un estudio previo durante el año hidrológico 2018/2019 (Hernández, 2019), con el fin de poder compararlos y establecer conclusiones de la evolución del impacto de la explotación minera sobre las aguas de las charcas y vaguadas cercanas.

Dichos puntos, se eligieron siguiendo diferentes criterios como la orientación y distancia a la mina, para que de esta forma, se pudiesen abarcar las máximas variables posibles en cuanto a los parámetros -dirección, fuerza del viento, pendiente y dirección de corrientes de agua-, que arrastrarían las sustancias volátiles y lixiviables procedentes de la explotación.

En el presente trabajo, la recogida de muestras se realizó en otoño de 2019 e incluyó un punto más a los analizados anteriormente en el trabajo ya mencionado. Se trata de una alcantarilla que vierte agua directamente de la explotación al medio.

Así, se evaluaron siete puntos de muestreo, situados tal y como se refleja en la Figura 1.

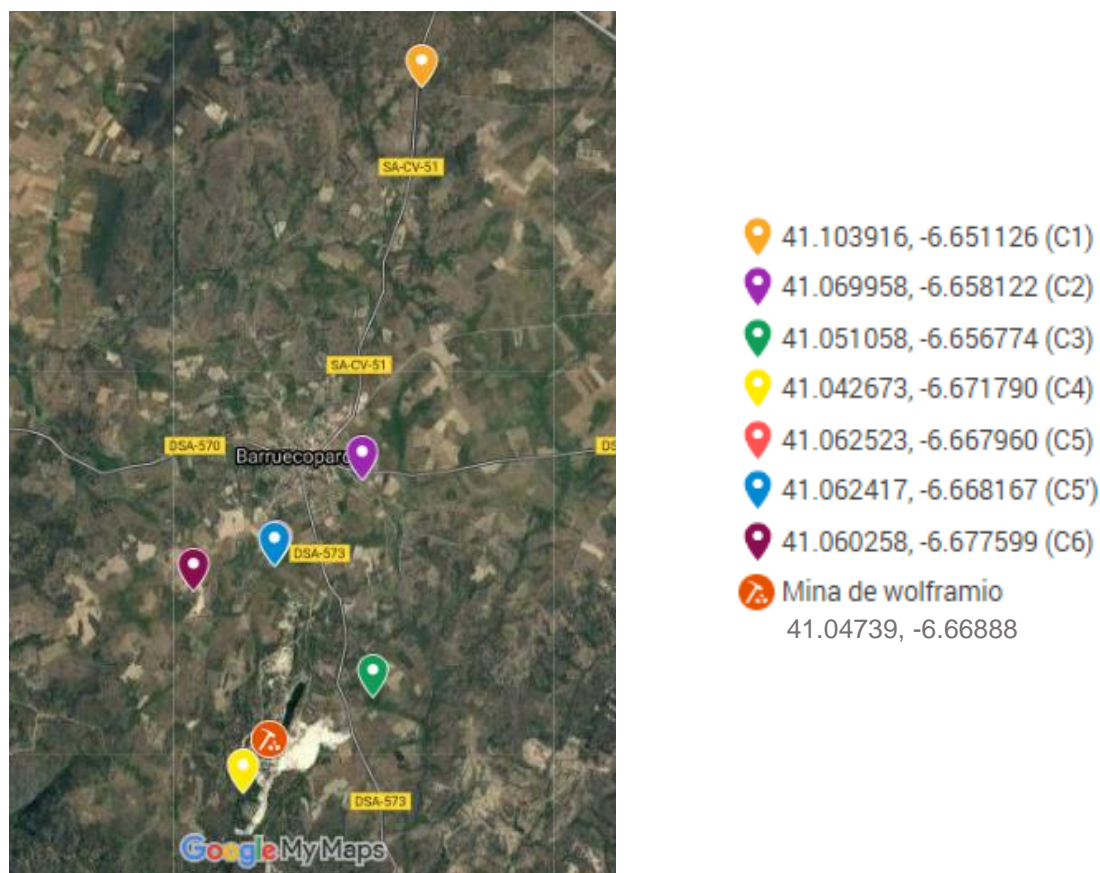


Figura 1: Ubicación y coordenadas de los 7 puntos de muestreo (C), con respecto a la mina de Barruecopardo. Fuente: “Mymaps” Google.

Descripción de los puntos de muestreo:

Charca 1: (749 metros de altitud y 5.000 metros de distancia con respecto a la mina). Tiene forma de ‘V’, vegetación flotante y es considerada la charca control por ser la más alejada y mejor conservada desde el punto de vista de las comunidades asociadas.



Charca 2: (717 metros de altitud y 1.500 metros de distancia con respecto a la mina).

Es la más próxima a la localidad de Barruecopardo. El agua es transparente y también parece encontrarse en buen estado de conservación.



Charca 3: (692 metros de altitud y 300 metros de distancia con respecto a la mina).

El agua es de color marrón-rojizo, seguramente por el impacto del ganado bovino en la zona. Se observa estiércol abundante en los alrededores e incluso en el agua.



Charca 4 (Arroyo): (646 metros de altitud y 300 metros de distancia con respecto a la mina). Son aguas que surgen bajo depósitos arenosos ubicados al sur de la mina.



Charca 5 (Vaguada): (714 metros de altitud y 10 metros de distancia con respecto a la mina). Se trata de la masa de agua más pequeña y cercana a la mina.



Charca 5' (Nuevo punto de muestreo): (710 metros de altitud y 9 metros de distancia con respecto a la mina). Se trata de una alcantarilla que vierte agua procedente de la mina.



Charca 6: (718 metros de altitud y 500 metros de distancia con respecto a la mina). Se encuentra en el medio de un pastizal con ganado bovino en activo. El fango de las orillas era de color claro y el agua se veía excesivamente eutrofizada, con una capa densa de microorganismos fotosintéticos en la superficie y turbidez notable.



Condiciones de la recogida de los datos:

El proyecto inicial recogía la toma de muestras en dos periodos temporales diferentes, correspondientes a las dos estaciones más lluviosas de nuestro clima (otoño y primavera), para así, evaluar el momento potencial de máxima lixiviación de las aguas procedentes de la mina y comprobar de esta forma la existencia, o no, de contaminación por esa vía. Sin embargo, debido a las

circunstancias excepcionales causadas por la pandemia de la *COVID-19*, no fue posible la segunda recogida de datos, ni su posterior análisis en el laboratorio.

La única toma de datos se realizó, por tanto, el 5 de noviembre de 2019, entre las 12:30-14:30 horas. Las condiciones meteorológicas de la jornada fueron las esperadas en un día otoñal, temperaturas mínimas de 5,6°C y máximas de 14,6°C, cielo parcialmente nublado con viento del oeste, y algunos chubascos (0,8mm) [Datos obtenidos de la Estación Meteorológica de Vitigudino, la estación termopluviométrica más cercana, a 20 kilómetros del área de estudio].

Recogida de muestras y medida de los parámetros fisicoquímicos:

Se tomaron 400-450 cm³ de agua de cada punto de muestreo, procurando hacer un raspado de rocas cuando fuera posible. Seguidamente, se les añadió 0,5-1 ml de una solución fijadora, para preservar los microorganismos presentes en buenas condiciones hasta su posterior análisis. Dicha solución, fue la preparación ácida de Lugol (Willén, 1962). En ella se disolvieron 10g de yoduro potásico (KI) en 100 ml de agua desmineralizada, 5g de cristales de yodo y por último 10g de ácido glacial acético. Finalmente, los botes herméticos se almacenaron en neveras en condiciones de oscuridad y temperaturas inferiores a 10°C.

Por otra parte, se midieron las siguientes características fisicoquímicas en cada uno de los puntos seleccionados con ayuda de un pH-metro y un conductivímetro portátiles de la marca Crison:

- pH
- Potencial redox (ORP), en mV.
- Temperatura del agua, en °C
- Factor TDS (Sólidos totales disueltos), en mg/L. Se utiliza para medir la concentración de nutrientes en el agua.
- Conductividad eléctrica (EC), en µS/cm. Se usa para medir la cantidad de sales.
- Salinidad, en mg/L.

Posteriormente se compararon con los tomados el año anterior para contrastar los posibles cambios.

Análisis de metales de la Charca 4:

En el estudio previo ya mencionado, se midió en cada charca la concentración de materia susceptible de ser oxidada por los microorganismos presentes en el agua, conocida como DBO (Demanda Biológica/Bioquímica de Oxígeno). Los resultados que obtuvieron para la charca 4 fueron de 0 mg/L y se atribuyeron a la ausencia de materia disponible para su oxidación.

Además, los valores de pH (tanto de febrero como de mayo de 2019), fueron muy ácidos y se achacaron al arrastre de contaminantes presentes en los depósitos generados por la actividad minera previa, (Hernández, 2019).

Por ello, en este trabajo, se decidió llevar a cabo un análisis de metales del punto 4 y comprobar así la hipótesis planteada en el estudio previo. Para ello, se tomó una muestra de 150mL de agua y se envió al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA) de la Universidad de Salamanca.

Se hizo lo mismo con una muestra de agua de la Charca 5 (Vaguada) por su proximidad con respecto a la mina.

El método analítico utilizado en este procedimiento es la Espectroscopía de Emisión de Plasma, por el cual se determina cuantitativamente elementos químicos a niveles traza y ultratrazo, a partir de una solución acuosa.

Observación de las muestras a microscopía óptica y toma de fotos:

Se utilizó un microscopio óptico (Nikon Optiphot I) acoplado a una cámara digital (Leica DFC290), con conexión Firewire, para capturar imágenes a color en alta resolución en tiempo real. Esta, a su vez, se encuentra conectada a un ordenador, siendo posible la manipulación de la muestra a la vez que se observa en la pantalla, mediante el software Leica Application Suite v.3.3.1.

Con una pipeta Pasteur, se deposita una gota de la muestra, ya fijada, en un portaobjetos y se coloca un cubreobjetos encima intentando evitar la formación de burbujas. Después, se observa al microscopio óptico y con ayuda de la cámara y el software mencionados, se toman fotografías de los microorganismos encontrados para facilitar su posterior identificación.

Identificación y caracterización del fitoplancton:

La identificación de los microorganismos acuáticos se realizó por comparación de las fotografías obtenidas con la cámara Leica, con diferentes atlas y guías taxonómicas mostradas en la bibliografía. Los principales recursos utilizados fueron el ‘Atlas de los microorganismos de agua dulce’ (Streble y Krauter, 1987) y el ‘Catálogo y claves de identificación de organismos fitoplanctónicos utilizados como elementos de calidad en las redes de control del estado ecológico’ (Barrios y Puig, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de las características físico-químicas:

Los resultados de la medición de las variables físicoquímicas de cada masa de agua muestreada se ilustran en la siguiente Tabla 1, donde también se incluyen los datos obtenidos en muestreos previos para su posterior comparación. Cabe señalar, que no se incluyen los datos tomados en la charca 5' porque no pueden ser comparados con muestreos anteriores.

	CHARCA 1	CHARCA 2	CHARCA 3	CHARCA 4 (Arroyo)	CHARCA 5 (Vaguada)	CHARCA 6
pH						
Febrero-19	6,78	6,65	5,81	3,38	5,65	6,2
Mayo-19	8,32	6,98	7,2	3,34	5,98	6,6
Noviembre-19	8,84	8,67	8,15	3,15	5,36	7,81
ORP						
Febrero-19	19,2	-61,6	-49,5	194,5	80,8	59,2
Mayo-19	-91	8,2	-12,1	198,4	53,7	30,7
Noviembre-19	-93,3	-94,6	-66,7	2,08	86,7	-51,5
T^a						
Febrero-19	8	8,5	11,5	7,3	8,3	13
Mayo-19	16,5	17,3	19,1	14,8	18	19
Noviembre-19	12,8	15,2	15,3	12,7	15	13,9
TDS						
Febrero-19	132,4	41,7	70,2	449	40	46,1
Mayo-19	96,2	151,7	151,4	1200	139,4	108,9
Noviembre-19	178,4	228	445	1447	142,1	457
EC						
Febrero-19	180	87	134	956	82,2	89,7
Mayo-19	148,9	233	236	1878	218	170
Noviembre-19	337	368	697	227	222	717
Salinidad						
Febrero-19	114,9	33,3	57,1	368	31,7	36,5
Mayo-19	78,2	124	123,9	1039	113,8	88,4
Noviembre-19	101,2	187,2	375	1265	116,4	384

Tabla 1: Parámetros físico-químicos de las muestras recogidas en febrero y mayo de 2019 (Hernández,2019) y noviembre de 2019. Se clasifican por colores según los valores promedio aplicados a los ríos de perillanuras silíceas de la Meseta Norte, indicados en el Boletín Oficial del Estado (Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre). En él se muestran los valores esperados del Estado Ecológico del Agua y todos ellos se incluyen en la Directiva Marco del Agua (DMA, Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000). (Verde: Límite muy bueno, Amarillo: Límite bueno-moderado y Rojo: Límite deficiente-malo). Para la salinidad se emplea el valor establecido para el agua dulce (<500 µg/L).

Análisis y comparación de los datos físico-químicos obtenidos:

- ✚ **pH:** Se observa una tendencia clara de todas las masas de agua analizadas a extremar sus valores de pH en el último año. Las ligeramente ácidas, se han acidificado más y las ligeramente básicas se han alcalinizado, lo cual ha conducido al descenso de la calidad de las charcas y las sitúa en valores moderados, rozando el límite con la categoría ‘deficiente’.
El punto 4 y 5 han empeorado sus valores de pH y con ello se refuerza la hipótesis de que sea debido al arrastre de contaminantes. Antes se le adjudicaba a la actividad minera previa, pero en vista a los resultados actuales, que muestran un continuo aumento de la acidez, se baraja la posibilidad de que la reciente reapertura de la mina pueda estar contribuyendo a ello, como se observó en otras minas de wolframio (Hirwa et al., 2019).
- ✚ **ORP (potencial redox):** los valores utilizados para su clasificación son destinados a aguas para el consumo humano, por ello todas las charcas tienen valores deficientes. Los datos negativos (puntos 1, 2, 3 y 6) corresponden a ambientes reductores, mientras que los positivos (puntos 4 y 5) se asocian a medios oxidantes. Se aprecia una caída en el potencial redox a valores más bajos e incluso negativos en su mayoría, lo cual es generalmente indicativo de pérdida de iones de oxígeno disueltos en los sedimentos, enriquecimiento en materia orgánica e incluso de la acumulación de metabolitos tóxicos en los sistemas acuícolas (CENMA, 2008).
- ✚ **Factor TDS (sólidos totales disueltos):** se utiliza para medir la concentración de nutrientes en el agua. Todas las charcas tienen valores buenos, excepto la 4, que ha aumentado sus niveles progresivamente y cada vez se acerca más a valores que no son los adecuados. El aumento de estos valores pudo estar relacionado con un aumento de residuos arenosos procedentes de la explotación de la mina (Ashraf et al., 2012).
- ✚ **Conductividad (EC):** se observa un aumento de este parámetro en todos los puntos de muestreo, pero solo la charca 3 y 6 disminuyen la calidad de sus aguas, pasando de valores muy buenos al límite bueno-moderado.
La Charca 4, sin embargo, bajó drásticamente sus niveles de conductividad hasta valores muy buenos. Efectos similares se observaron en estudios desarrollados en minas de wolframio explotadas y zonas próximas (Hajalilou et al., 2011), vinculados a otras fuentes o factores que pueden llevar a un incremento o descenso en sus valores.
- ✚ **Salinidad:** todas las muestras tienen un valor adecuado, excepto el punto 4, cuya medida es más del doble establecido para el agua dulce. Dicho aumento ya se registró en la toma de muestras de mayo del 2019, con respecto a los del primer muestreo, cuando tuvo valores aceptables. Este incremento pudo estar vinculado a la actividad de la mina (Asthon et al., 2001), al igual que ocurría con TDS.

Resultados del análisis de metales del punto 4 y 5:

Los datos obtenidos de dicho examen se recogen en la Tabla 2. Pueden aparecer celdas vacías en la columna del Nivel dependiendo de lo establecido en la normativa utilizada (Real Decreto 817/2015, del 11 de septiembre).

	Valores obtenidos (µg/L)		Nivel bueno/moderado (µg/L)
	<u>Vaguada 4</u>	<u>Vaguada 5</u>	
Arsénico	4,53	89,83	50
Cadmio	0,49	0,07	0,08-0,25
Cinc	514,17	34,36	30-500
Cobre	23,80	14,31	5-120
Cromo total	0,30	0,25	50
Hierro	5.387,49	182,42	
Mercurio	No detectado	No detectado	0,07
Níquel	34,46	1,77	20
Plomo	1,20	0,37	7,2
Potasio	7.110	5.300	
Selenio	1,82	0,18	1
Sodio	23.550	3.370	

Tabla 2: Resultados del análisis de metales pesados (CIDTA). Se indican en color rojo los elementos que sobrepasan el umbral indicado en el BOE.

Según dichos criterios, la charca 4 muestra niveles anormales en cadmio y selenio (prácticamente el doble) y ligeramente superiores a los indicados en cinc y níquel. Por otro lado, la charca 5 presenta concentraciones elevadas de arsénico.

El cadmio está clasificado como una sustancia peligrosa prioritaria. Este elemento puede causar un grave impacto en la salud e incorporarse fácilmente a la cadena alimenticia por diversas vías. Por ejemplo, la población puede estar expuesta al cadmio por la ingesta de vegetales regados con agua contaminada con este metal o incluso por inhalación de sus partículas cuando la concentración es superior a 50 µg/L. En este último caso, los afectados podrían ser los trabajadores expuestos de la actividad extractiva, pues este elemento se acumula en el hígado y el riñón, produciendo daños irreversibles, aún en bajas dosis. No obstante, es un metal con alta tendencia a almacenarse en las plantas, por lo que es favorable a la fitorremediación (Reyes et al., 2016).

En cuanto al selenio, se recomienda un máximo de 20 µg/L para aguas destinadas al riego y 50 µg/L como agua potable para el ganado, por tanto, los niveles medidos no se consideran un problema (Aguilar et al., 1999).

En lo referido al arsénico, la legislación establece que niveles de arsénico superiores a 50 µg/L no cumplen la normativa y suponen un riesgo significativo para el medio acuático. Concentraciones elevadas de arsénico en diferentes ambientes acuáticos ya habían sido detectadas en diferentes zonas del noroeste de la provincia de Salamanca y relacionados con actividades mineras (García-Sánchez y Álvarez-Ayuso, 2003), siendo bajos en otras áreas de la provincia sin este tipo de explotaciones (Blanco et al., 1998). Estos niveles elevados pueden mantenerse hasta cien años, si bien también existen procesos de remediación biológica a través de especies vegetales (Wilson y Pyatt, 2006).

Identificación de microorganismos y análisis de poblaciones:

Los microorganismos reconocidos en las muestras de agua de cada charca se clasificaron taxonómicamente en base a Sayers et al., (2009). Toda la información se recoge en la Tabla 3, ordenada alfabéticamente y en un código por colores, indicado en el pie de la tabla.

En el anexo se encuentran las fotografías de todas las especies reconocidas.

PHYLUM	ORDEN	ESPECIE	C1	C2	C3	C4	C5	C5'	C6
Cyanobacteria	Chroococcales	<i>Chroococcus</i> sp.				-		-	
		<i>Gomphosphaeria lacustris</i>		-	-	-	-	-	-
	Nostocales	<i>Anabaena</i> sp.			-	-	-	-	
		<i>Raphidiopsis</i> sp.		-	-	-	-	-	-
	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria</i> sp.		-					-
	Synechococcales	<i>Snowella</i> sp.	-		-	-	-	-	-
Chlorophyta	Chaetophorales	<i>Microspora</i> sp.		-	-	-	-	-	-
		<i>Pleurococcus</i> sp.	-	-		-	-	-	-
	Chlamydomonadales	<i>Characium</i> sp.	-	-		-	-	-	
		<i>Chlorococcum</i> sp.		-	-	-	-	-	
		<i>Gonium</i> sp.	-		-	-	-	-	-
		<i>Tetraspora</i> sp.		-	-	-	-	-	-
		<i>Treubaria triappendiculata</i>	-		-	-	-	-	-
		<i>Actinastrum hantzschii</i>		-	-	-	-	-	-
	Chlorellales	<i>Dictyosphaerium</i> sp.	-		-	-	-	-	-
		<i>Eremosphaera</i> sp.				-	-	-	
		<i>Oocystis parva</i>		-	-	-	-	-	
		<i>Desmatractum</i> sp.		-	-	-	-	-	-

	Sphaeropleales	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>			-	-	-	-	-
		<i>Ankistrodesmus spiralis</i>	-		-	-	-	-	-
		<i>Kirchneriella lunaris</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Pediastrum</i> sp.		-	-	-	-	-	-
		<i>Pediastrum tetras</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Scenedesmus acutus</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Scenedesmus gracile</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Scenedesmus</i> sp.				-	-	-	-
		<i>Selenastrum bibraianum</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Stauridium tetras</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Tetraedron minimum</i>		-	-	-	-	-	-
Cryptophyta	Cryptomonadales	<i>Cryptomonas erosa</i>	-			-	-	-	
	Pyrenomonadales	<i>Chroomonas</i> sp.	-	-	-	-		-	-
Dinophyta	Peridinales	<i>Peridinium</i> sp.				-	-	-	
		<i>Peridiniopsis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	
	Phytodinales	<i>Cystodinium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	
Euglenophyta	Euglenales	<i>Euglena acus</i>	-	-	-	-	-	-	
		<i>Euglena</i> sp.	-		-	-	-		
		<i>Euglena tripteris</i>	-	-	-	-	-	-	
		<i>Trachelomonas</i> sp.				-		-	
Glaucochyta	Glaucozystales	<i>Glaucozystis nostochinearum</i>		-	-	-	-	-	
Heterokontophyta (Ochrophyta)	Bacillariales	<i>Nitzschia</i> sp.							
		<i>Psammodictyon constrictum</i>	-		-	-	-	-	-
	Chromulinales	<i>Chrysococcus</i> sp.	-		-	-			-
		<i>Dinobryon</i> sp.		-	-	-	-	-	
	Cocconeidales	<i>Cocconeis placentula</i>	-		-	-	-	-	
	Cymbellales	<i>Anomooneis</i> sp.	-	-		-	-	-	
	Eunotiales	<i>Eunotia arcus</i>	-	-	-		-	-	-
		<i>Eunotia lunaris</i>		-	-	-	-	-	-
	Eustigmatales	<i>Characiopsis</i> sp.	-		-	-		-	-
		<i>Chlorobotrys</i> sp.				-			
	Fragilariales	<i>Diatoma moniliformis</i>	-	-	-		-	-	-
		<i>Fragilaria construens</i>	-	-	-	-		-	-
		<i>Fragilaria tenera</i>		-	-	-	-	-	
	Goniochloridales	<i>Goniochloris sculpta</i>		-	-	-	-	-	-
	Mischococcales	<i>Mischococcus confervicola</i>				-	-	-	
		<i>Ophiocytium parvulum</i>		-	-	-	-	-	-
		<i>Ophiocytium</i> sp.	-		-	-	-	-	-
	Naviculales	<i>Craticula accomoda</i>		-		-	-		-

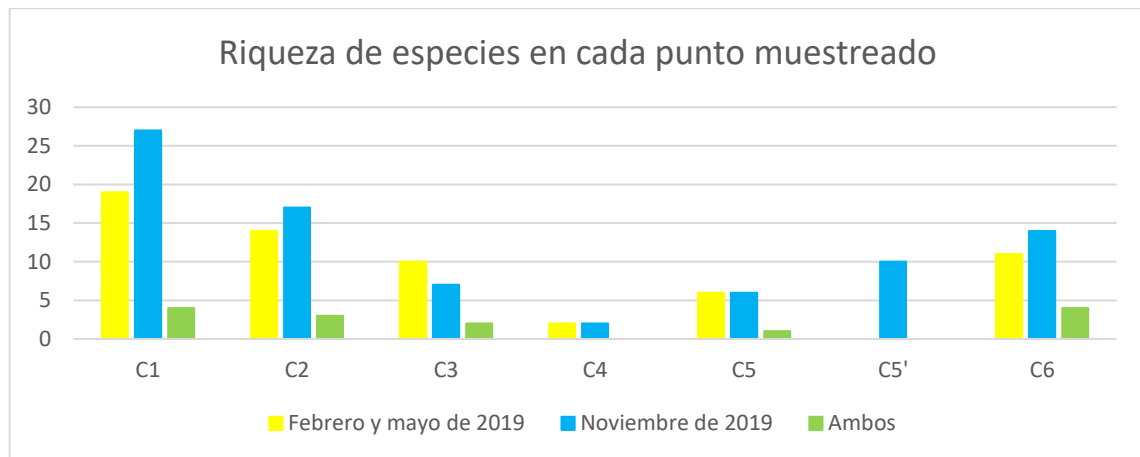
		<i>Navicula</i> sp.	■	-	-	-	■	-	■
		<i>Pinnularia viridis</i>	■	■	■	-	■	■	■
	Synulales	<i>Mallomonas</i> sp.	-	■	-	-	-	-	-
	Tribonematales	<i>Tribonema</i> sp.	■	-	-	-	-	-	-
Streptophyta	Desmidiiales	<i>Closterium kuetzingii</i>	■	■	■	-	-	■	-
		<i>Closterium leibleinii</i>	-	-	-	-	-	■	-
		<i>Cosmarium impressulum</i>	■	-	-	-	-	-	-
		<i>Cosmarium</i> sp.	-	■	-	-	-	■	-
		<i>Cosmarium venustum</i>	-	-	-	-	-	■	-
		<i>Pleurotaenium</i> sp.	-	■	-	-	-	-	-
		<i>Staurodesmus</i> sp.	■	-	-	-	-	-	-
	<i>Teilingia granulata</i>	■	-	-	-	-	-	-	
	Zygnematales	<i>Mougeotia isolates</i>	-	■	-	-	-	-	-
		<i>Spirogyra</i> sp.	-	-	-	-	-	-	■
<i>Zygnema</i> sp.		■	■	■	-	-	-	■	

Tabla 3: Especies identificadas en cada punto de estudio. (C:Charca). Si una especie no se encuentra en una charca, se marca con un guión. Código por colores; los cuadros amarillos corresponden a las especies identificadas en muestreos previos (Hernández, 2019), los cuadros azules son las halladas en este estudio y el color verde atañe a las observadas en ambos trabajos.

Los grupos fitoplanctónicos de mayor riqueza de especies son del super-filo Chlorophyta y Heterokontophyta (Ochrophyta). Las de este primer grupo taxonómico, se hallan por primera vez en los puntos 3 y 6, pues en el estudio anterior (Hernández, 2019) solo se encontraron en el 1 y 2. En cuanto al segundo grupo mencionado, las especies se reparten homogéneamente entre los distintos órdenes y cabe destacar la presencia de *Chlorobotrys* sp. que aparece en todas las masas muestreadas excepto en el punto 4. Valente y Gomes (2007) propusieron *Euglena mutabilis* y *Klebsormidium* sp. (Charophyta) como bioindicadores de aguas con pH ácidos procedentes de minas abandonadas en el norte de Portugal, no habiéndose identificado en los puntos 4 y 5 de nuestro estudio, probablemente por las diferencias intrínsecas entre las minas, ya que éstas además de wolframio tenían otros elementos minerales como cinc, estaño u oro, como por el propio estado de actividad de las mismas. Algunas especies de *Euglena* son bioindicadoras de eutrofización por su gran tolerancia a los ambientes con bajo contenido en oxígeno y alto en nutrientes (Atizi y Udoh, 2016), lo cual se refleja en la composición fitoplanctónica de la charca 6, que presenta notablemente estas características debido a la presión ganadera. Varios taxones de diatomeas pueden ser comunes en medios ácidos (Denicola, 2000), como el caso de *Eunotia arcus*, identificada en el punto 4.

En la Gráfica 1 se representa y compara la riqueza de especies en cada punto estudiado y se comprueba como la mayor diversidad se asocia con los lugares 1 y 2, que son los más alejados con

respecto a la mina y de mayor altitud, sobre todo la charca 1 que es la más equilibrada. Además, en ambas zonas ubicadas al noreste, no se detectan cambios significativos en las poblaciones de microorganismos que evidencien la deposición de contaminantes volátiles por las actividades mineras.



Gráfica 1: Riqueza de especies en cada punto de estudio. (C:Charca). Comparativa de las especies identificadas por Hernández, 2019 en febrero y marzo y las recogidas en el presente estudio.

Las especies identificadas aumentan o se mantienen en todas, excepto en la charca 3, donde se observa un notable descenso que puede estar relacionado con la brusca disminución del pH y los valores de conductividad, que disminuyen la calidad de sus aguas. Aún así, las masas de agua 4 y 5 son las que menor número de especies contienen. En el punto 4 solo se encontraron los frústulos de diatomeas como *Diatoma* y *Eunotia*, quizás por las nefastas condiciones fisicoquímicas, entre las que destaca su extrema acidez, y la mencionada contaminación por metales pesados, condicionantes menos propicios para el desarrollo de la vida.

El nuevo punto de muestreo, C5', adyacente a la salida de agua de una alcantarilla del interior del recinto minero, presenta comunidades heterogéneas y abundantes en *Closterium* y *Oscillatoria*, siendo este último es un indicador de contaminación orgánica (Shashi et al.,2008).

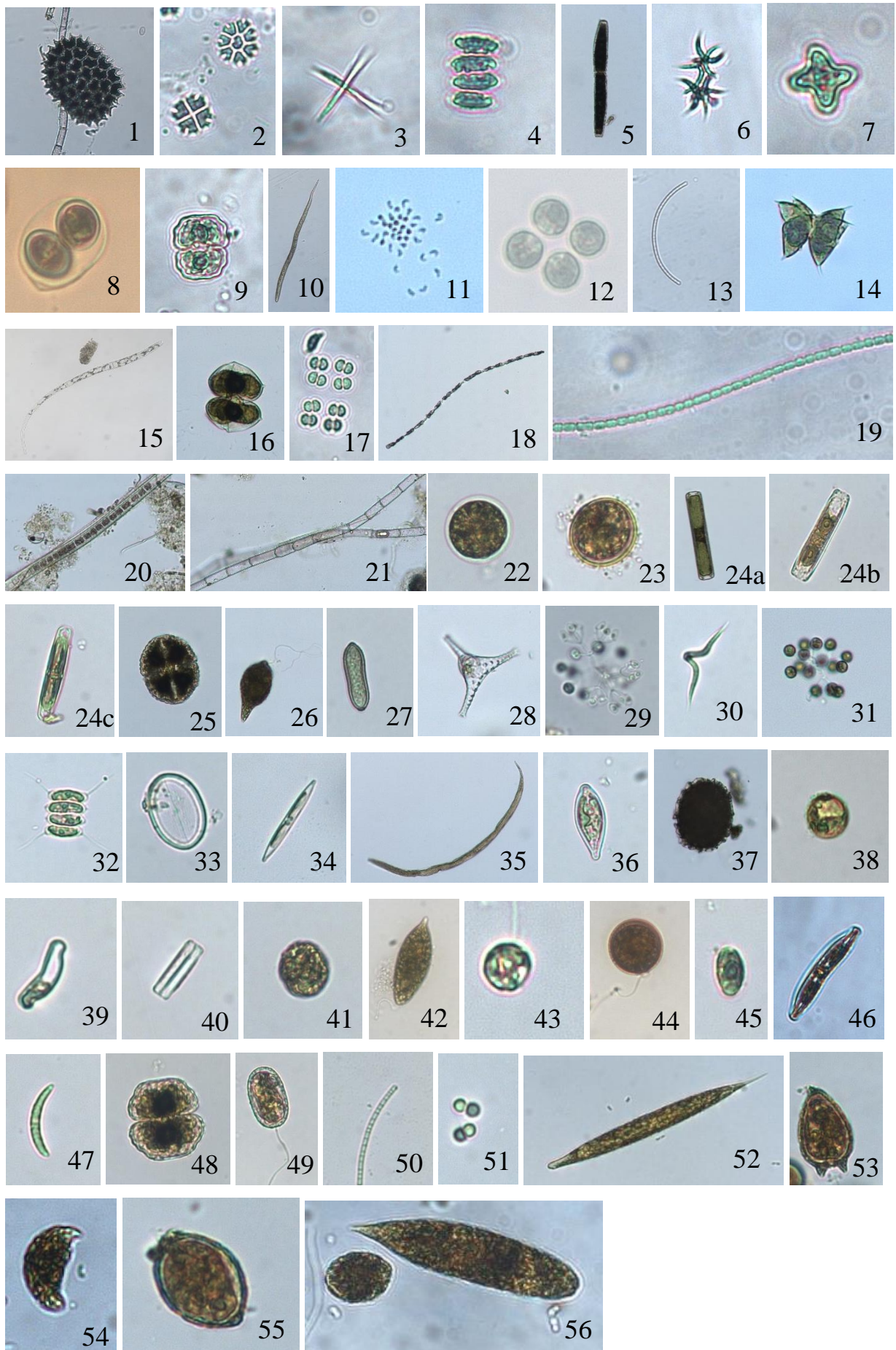
CONCLUSIONES

Tras la toma *in situ* de los parámetros físico-químicos y el posterior análisis las muestras recogidas, se llega a la conclusión de la existencia de contaminación en las masas de agua cercanas a la mina de Barruecopardo. La comparación con los valores tomados en el estudio inicial, en el cual se basa el presente trabajo, no deja lugar dudas de los efectos negativos sobre las poblaciones fitoplanctónicas que ha supuesto la reapertura de la explotación, los cuales se agravan a medida que disminuye la distancia con respecto a la mina.

Además, se detecta la existencia de metales pesados (cadmio, selenio y arsénico) en las dos charcas más próximas a dicha empresa, siendo las más alejadas las que presentan mayor riqueza de especies. Cabe mencionar la presencia de actividad ganadera bovina sobre los puntos 3 y 6, contribuye a la eutrofización y degeneración de las comunidades de microorganismos que las pueblan.

ANEXO: FOTOGRAFÍAS DE LAS ESPECIES IDENTIFICADAS

- | | | |
|---|---|----------------------------------|
| 1) <i>Pediastrum</i> sp. | 20) <i>Microspora</i> sp. | 38) <i>Chlorobotrys</i> sp. |
| 2) <i>Pediastrum tetras</i> | 21) <i>Tribonema</i> sp. | 39) <i>Eunotia arcus</i> |
| 3) <i>Actinastrum hantzschii</i> | 22) <i>Chlorobotrys</i> sp. | 40) <i>Diatomea moniliformis</i> |
| 4) <i>Scenedesmus acutus</i> | 23) <i>Chlorococcum</i> sp. | 41) <i>Eremosphaera</i> sp. |
| 5) <i>Pleurotaenium</i> sp. | 24) <i>Pinnularia viridis</i> (24 a-c) | 42) <i>Characiopsis</i> sp. |
| 6) <i>Selenastrum gracile</i> | 25) <i>Cosmarium</i> sp. | 43) <i>Chrysococcus</i> sp. |
| 7) <i>Tetraedron minimum</i> | 26) <i>Euglena</i> sp. | 44) <i>Trachelomonas</i> sp. |
| 8) <i>Glaucozystis</i>
<i>nostochinearum</i> | 27) <i>Psammodictyon</i>
<i>constrictum</i> | 45) <i>Chroomonas</i> sp. |
| 9) <i>Cosmarium impressulum</i> | 28) <i>Treubaria</i>
<i>triappendiculata</i> | 46) <i>Craticula accomoda</i> |
| 10) <i>Raphidiopsis</i> sp. | 29) <i>Dictyosphaerium</i> sp. | 47) <i>Closterium leibleinii</i> |
| 11) <i>Kirchneriella lunaris</i> | 30) <i>Ankistrodesmus spiralis</i> | 48) <i>Cosmarium venustum</i> |
| 12) <i>Tetraspora algae</i> | 31) <i>Snowella</i> sp. | 49) <i>Anisonema</i> sp. |
| 13) <i>Eunotia lunaris</i> | 32) <i>Scenedesmus</i> sp. | 50) <i>Oscillatoria</i> sp. |
| 14) <i>Selenastrum bibraianum</i> | 33) <i>Cocconeis placentula</i> | 51) <i>Pleurococcus</i> sp. |
| 15) <i>Ophiocytium parvulum</i> | 34) <i>Nitzschia</i> sp. | 52) <i>Euglena acus</i> |
| 16) <i>Desmatractum</i> sp. | 35) <i>Ophiocytium</i> sp. | 53) <i>Peridiniopsis</i> sp. |
| 17) <i>Chroococcus</i> sp. | 36) <i>Anomoeoneis</i> sp. | 54) <i>Cystodinium</i> sp. |
| 18) <i>Mougeotia isolates</i> | 37) <i>Trachelomona</i> sp. | 55) <i>Oocystis parva</i> |
| 19) <i>Anabaena</i> sp. | | 56) <i>Characium</i> sp. |



BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R. J., Dorronsoro, F. C., Gómez, A. J. L. y Galán H. E. (1999). *Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación*. 3. Revisión de normativas y umbrales de contaminación. pp. 102-164. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Ashton, P. J., Love, D., Mahachim H. y Dirks, P. H. (2001). *An Overview of the Impact of Mining and Mineral Processing Operations on Water Resources and Water Quality in the Zambezi, Limpopo, and Oilfants Catchments in South Africa. Contract Report to Mining, Minerals, and Sustainable Development Project/Southern Africa*. Pretoria, South Africa and Harare, Zimbabwe: CSIR-Environmentek and University of Zimbabwe, Geology Department
- Atizi, T. y Udoh, A. (2016). Indicator Algae of Adrasan Stream (Antalya) Turkey. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2), 140-154. Recuperado de: https://scholar.google.es/scholar?cluster=5930876524302365185&hl=es&as_sdt=0,5
- Barrios, E. y Puig, A. (2012). ID-TAX: Catálogo y claves de identificación de organismos fitoplanctónicos utilizados como elementos de calidad en las redes de control del estado ecológico. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Centro de Publicaciones.
- Blanco, H. A. L., Alonso, G. D., Jiménez D. O., Santiago, G. M. y de Miguel, M. B. (1998). Estudio de los niveles de plomo, cadmio, zinc y arsénico en aguas de la provincia de Salamanca. *Revista Española de Salud Pública*, 72(1), 53-65.
- CENMA – Centro Nacional de Medio Ambiente (2008). *Antecedentes técnicos para la elaboración de un índice de condición de fondo (ICF – ICFtox.), como herramientas de control y seguimiento ambiental para el sector salmonicultor de la X Región*. Documento Técnico nº2. Proyecto Inova Chile 05CN11IPM-25. http://www.cenma.cl/Pagina%20web-LQA/5-Estudios%20Ambientales/2008-Sernapesca-Antecedentes_t%C3%A9cnicos_ICF_Final_Dcto_Tec_N%C2%BA2.pdf. Consultado 07/05/2020.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E. y Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chunii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325-330. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442005000200002&lng=en&tlng=es
- De Nicola, D. M. (2000). A review of diatoms found in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, 433(1), 111-122. doi: 10.1023/A:1004066620172.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, núm. 327, pp. 1-71. Recuperado de: https://www.miteco.gob.es/es/costas/temas/proteccion-costa/Directiva%202000_60_CE_tcm30-160882.pdf

- García, S. A. y Álvarez, A. E. (2003). Arsenic in soils and waters and its relation to geology and mining activities (Salamanca Province, Spain). *Journal of Geochemical Exploration*, 80(1), 69-79. doi: 0.1016/S0375-6742(03)00183-3
- Hajalilou, B., Mosafieri, M., Khaleghi, F., Jadidi, S., Vosugh, B., y Fatehifar, E. (2011). Effects of abandoned arsenic mine on water resources pollution in north west of iran. *Health promotion perspectives*, 1(1), 62-70. doi.org/10.5681/hpp.2011.006
- Hernández, G. A. (2019). *Bioindicadores acuáticos: Análisis de microorganismos de agua dulce en el entorno de una explotación minera en activo*. (Trabajo de fin de grado). Universidad de Salamanca, Castilla y León.
- Hirwa, H., Nshimiyimana, F. X., Tuyishime, H. y Shingiro, C. (2019). Impact of mining activities on water quality status at Wolfram Mining and Processing (WMP), Burera, Rwanda. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 10(12), 1214-1220. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/337059885_Impact_of_mining_activities_on_water_quality_status_at_Wolfram_Mining_and_Processing_WMP
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., y Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 1102-1109. doi.org/10.1093/nar/gky1033
- Maldonado, J., Solé, A., Puyen, Z. M., y Esteve, I. (2011). Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 104(1-2), 135-144. doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.009
- Mateo, P., Leganés, F., Perona, E., Loza, V. y Fernández-Piñas, F. (2015). Cyanobacteria as bioindicators and bioreporters of environmental analysis in aquatic ecosystems. *Biodivers Conserv*, 24(4), 909-948. doi: 10.1007/s10531-015-0903-y
- Mayer-Pinto, M., Underwood, A. J., Tolhurst, T. y Coleman, R. A. (2010). Effects of metals on aquatic assemblages: What do we really know?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 391(1-2), 1-9. doi: 10.1016/j.jembe.2010.06.013
- National Center for Biotechnology Information (15 de febrero de 2020). PubChem Database. Tungsten, CID=23964. Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tungsten>
- Orden ARM/2656/2008, de 10 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción de planificación hidrológica. Boletín Oficial del Estado, núm. 229, de 22 de septiembre de 2008, pp 38472-38582. Recuperado de: <https://www.boe.es/boe/dias/2008/09/22/pdfs/A38472-38582.pdf>
- Otones Migueláñez, V. (2014). *Diagnóstico ambiental de suelos contaminados por actividades mineras y evaluación de técnicas de estabilización para su recuperación*. (Tesis doctoral). Recuperado de: <https://digital.csic.es/handle/10261/107622>

- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. Boletín oficial de estado, núm 219, de 12 de septiembre de 2015, pp. 80582 a 80677. Recuperado de: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2015-9806>
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, L. M., y González, E.E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16 (2), 66-77. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6096110>
- Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Mizrachi, I., ... Ye, J. (2009). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 37(1), 5-15. doi.org/10.1093/nar/gkn741
- Shashi, T. R., Kiran, B. R., Puttaiah, E. T., Shivaraj, Y. y Mahadevan, K. M. (2008). Phytoplankton as index of water quality with reference to industrial pollution. *Journal of Environmental Biology*, 29(2) 233-236. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18831381/>
- Somarriba F. A. (2019). Estudio comparativo del método de tuneladora vs explosivos para rampa minera en Barruecopardo. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Cantabria, Cantabria. Recuperado de: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/15829>
- Streble, H. y Krauter, D. (1987). *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce. La vida en una gota de agua*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Valente, T. M. y Gomez, C. L. (2007). The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology* 33(2), 283-294. Recuperado de: <https://revistas.ucm.es/index.php/JIGE/article/view/JIGE0707210283A>
- Willén, E (1992). Planktonic green algae in a acidification gradient of nutrient-poor lakes. *Archiv für Protistenkunde*, 141(1), 47-65. doi: 10.1016/S0003-9365(11)80048-5.
- Wilson, B. y Pyatt, F. B. (2006). Bio-availability of tungsten in the vicinity of an abandoned mine in the English Lake District and some potential health implications. *The Science of the Total Environment*, 370(2-3), 401-408. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.07.026
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. y Jiang, G. (2010). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135-150. doi: oi.org/10.1016/j.aca.2007.11.018