



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS
Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental



**ESTUDIO DE LA CALIDAD AMBIENTAL
DE LOS SEDIMENTOS DE LAS BAHÍA DE CÁDIZ
Y ALGECIRAS MEDIANTE UN MÉTODO INTEGRADO**

PROYECTO FIN DE GRADO

José Antonio Usero Fernández

Sevilla, 2015



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS
Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental

**ESTUDIO DE LA CALIDAD AMBIENTAL
DE LOS SEDIMENTOS DE LAS BAHÍAS DE CÁDIZ Y
ALGECIRAS MEDIANTE UN MÉTODO INTEGRADO**

PROYECTO FIN DE GRADO

José Antonio Usero Fernández

Tutor: *Prof. José Morillo Aguado*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud más sincera al Profesor Doctor José Morillo Aguado, bajo cuya dirección ha sido realizado este trabajo.

Igualmente deseo expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros del laboratorio del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, especialmente a Juan José Martín Timoteo y a Jesús Ferrera Lozano, por su ayuda y colaboración.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II. ANTECEDENTES	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. SEDIMENTOS ACUÁTICOS	6
2.1. Granulometría	7
2.2. Composición química	7
2.3. Contaminantes	9
2.4. Interacción sedimento-agua-seres vivos	10
2.5. Contaminantes en organismos vivos	11
3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE LOS SEDIMENTOS	15
3.1. Análisis químicos	16
3.2. Análisis de biodisponibilidad	19
3.3. Bioensayos de toxicidad	26
3.4. Estructura de la comunidad bentónica	31
3.5. Métodos integrados	32
III. CARACTERÍSTICAS DE LAS ZONAS OBJETO DE ESTUDIO	34
1. INTRODUCCIÓN	35
2. BAHÍA DE ALGECIRAS	35
2.1. Hidrología	36
2.2. Actividad industrial	39
2.3. Actividad portuaria y tráfico marítimo	40
3. BAHÍA DE CÁDIZ	41
3.1. Hidrología	42
3.2. Actividad industrial	44
3.3. Actividad portuaria y tráfico marítimo	46
IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES	48
1. INTRODUCCIÓN	48
2. TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	48
2.1. Localización de los puntos de toma de muestras	48
2.2. Muestras de sedimentos	51
2.3. Muestras de organismos vivos (macro bentos)	53
3. ANÁLISIS DE SEDIMENTOS	53
3.1. Granulometría	53
3.2. Contenido total de metales	55
3.3. Biodisponibilidad	57
3.4. Carbono orgánico total	58
3.5. Bioensayo de toxicidad con <i>Photobacterium phosphoreum</i>	59
4. ANÁLISIS DE ORGANISMOS VIVOS (MACROBENTOS)	62
5. MÉTODO INTEGRADO	64
5.1. Generación de los índices de contaminación	64

5.2. Representación gráfica y cálculo del índice de degradación ambiental	65
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
1. INTRODUCCIÓN	68
2. ANÁLISIS DE SEDIMENTOS	68
2.1. Granulometría	68
2.2. Contenido total de metales	69
2.3. Biodisponibilidad	73
2.4. Carbono orgánico total.....	74
2.5. Bioensayo de toxicidad con photobacterium phosphoreum.....	75
3. ANÁLISIS DE ORGANISMOS VIVOS (MACROBENTOS).....	76
4. MÉTODO INTEGRADO	79
VI. CONCLUSIONES	87
VII. BIBLIOGRAFÍA	92
VIII. ÍNDICES DE TABLAS Y FIGURAS	112
IX. ANEXOS	115

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los mares y océanos han recibido a lo largo de los tiempos grandes cantidades de residuos procedentes de las actividades humanas, bien sea por vertidos directos o porque los productos contaminantes son llevados hasta éstos por los ríos. En un principio, eran capaces de soportar la carga contaminante gracias a su capacidad autodepuradora y de dilución de contaminantes. Sin embargo, los vertidos han aumentado notablemente en las últimas décadas, debido principalmente al incremento de la población mundial y a la industrialización, lo que ha dado lugar al deterioro de los mares y océanos y a que, en determinadas zonas, se estén alcanzando unos niveles preocupantes de contaminación [1].

Las zonas próximas a la costa, los litorales, son las que están sujetas en mayor medida a los procesos de polución debido a su cercanía a los puntos de vertidos. Además, en los litorales existe un elevado aprovechamiento de sus recursos naturales (el 87% de las aportaciones totales de la pesca y el 100% del marisco) así como actividades recreativas, lo que ha dado lugar a una especial sensibilización por parte de la opinión pública en relación con su calidad ambiental y con la preservación de su medio ambiente.

Es bien conocido que los sedimentos constituyen un importante componente de los ecosistemas acuáticos, ya que en ellos viven, se alimentan y se reproducen un buen número de seres vivos y, además, son el lugar donde preferentemente se acumulan los contaminantes. Sin embargo, cuando cambian las condiciones del medio (fuertes corrientes, procesos de dragados, cambios en el pH y/o potencial redox, etc.) una parte de los contaminantes retenidos en los sedimentos puede removilizarse, o solubilizarse de nuevo y volver al agua [2 y 3], actuando entonces los sedimentos como una fuente de contaminación que puede afectar a la vida acuática y, a través de la cadena alimentaria, a los seres humanos.

De todo lo anterior se deduce que el estudio de los niveles de contaminación en los sedimentos es de gran interés para determinar el estado de degradación ambiental en los ecosistemas acuáticos [4 a 7]. No obstante, se ha comprobado que este tipo de estudio no es suficiente para obtener una valoración objetiva de la calidad ambiental de estos ecosistemas, ya que existen otros aspectos que deben ser considerados, tales como la biodisponibilidad de los tóxicos una vez incorporados al sedimento o la posibilidad de efectos sinérgicos o antagónicos entre los distintos contaminantes.

Se han propuesto otras alternativas tales como: medida de la bioacumulación en organismos seleccionados como indicadores de contaminación, estudios de los efectos en organismos vivos tras la exposición a sedimentos contaminados, alteraciones en la estructura de las comunidades bentónica que produce la contaminación, etc. Cada una de

estas alternativas, considerada individualmente, sólo aporta una información parcial sobre la calidad ambiental del ecosistema objeto de estudio.

En este contexto surgen los llamados "métodos integrados" [8 a 15] en los que se emplean conjuntamente varios de los métodos anteriormente mencionados, que son elegidos buscando que cada uno de ellos suministre la mayor información posible y que ésta sea complementaria con la que aportan el resto de los métodos. De manera que con estos métodos se obtiene una información más completa y de mayor calidad que la suma de la información de cada uno de sus componentes individuales [14]. Téngase en cuenta que en los estudios integrados se aborda el problema de la contaminación ambiental desde diferentes puntos de vista y que, además, permiten contrastar los resultados obtenidos por cada uno de los métodos con los de los restantes. La mayor complejidad de los métodos integrados no debe dificultar su aplicación a una zona extensa ni la comparación de resultados obtenidos en distintas áreas, por lo que han de tener las siguientes características: ser aplicable a toda clase de sedimentos, de ejecución sencilla y de bajo coste y que proporcionen resultados simples, fácilmente entendibles y comparables.

El estudio de la problemática asociada a los sedimentos marinos es especialmente interesante en las bahías de Cádiz y Algeciras, que son dos amplias bahías, situadas en la provincia de Cádiz en las que se concentran grandes núcleos urbanos (Cádiz, El Puerto de Santa María, Algeciras, etc.) y grandes industrias (petroquímicas, metalúrgica, producción de energía, naval, etc.) y en las que existe una gran actividad portuaria y un elevado tráfico marítimo. Además estas bahías reciben las aguas de importantes ríos (el Guadalete en la bahía de Cádiz y el Palmones y el Guadarranque en la de Algeciras). Todo lo anterior genera, en las dos bahías, una serie de presiones, especialmente en forma de vertidos contaminantes, que afectan a la calidad del medio acuático y, en particular a los sedimentos.

El notable interés del tema ha motivado la realización de este Trabajo Fin de Grado, que tiene como principal objetivo desarrollar un método integrado que permita caracterizar la calidad ambiental de los sedimentos en las bahías de Cádiz y Algeciras.

Para conseguir este objetivo general, es necesario lograr los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un nuevo método integrado que permita evaluar la calidad ambiental de sedimentos acuáticos.
2. Caracterizar desde el punto de vista químico a los sedimentos de las bahías de Cádiz y Algeciras, con objeto de conocer el grado de contaminación de los constituyentes analizados.

3. Determinar la movilidad de los distintos contaminantes en los sedimentos, es decir, su capacidad para pasar a la columna de agua.
4. Establecer, por medio de bioensayos realizados en el laboratorio, la posible toxicidad de los sedimentos sobre los organismos vivos del entorno.
5. Estudiar la distribución espacial de la fauna bentónica y sus posibles alteraciones, tanto en lo que se refiere a su densidad (número de individuos/m²) como a su diversidad.
6. Integrar los resultados obtenidos en los objetivos 1 a 5 de manera que se obtenga una amplia información sobre la calidad ambiental de los sedimentos de las bahías de Cádiz y Algeciras, así como obtener un índice global que permita resumir en un solo número las principales características de la calidad ambiental en los diferentes puntos de toma de muestra.

La memoria de este Trabajo fin de Grado se ha estructurado en siete capítulos. Tras esta introducción, en el Capítulo II se realiza un estudio sobre la contaminación en los ecosistemas acuáticos y los métodos de evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos.

El Capítulo III se centra en las características de la zona de estudio, donde se exponen los aspectos más relevantes de las bahías de Cádiz y Algeciras, como la hidrología y las actividades industriales.

En el Capítulo IV se describen los métodos experimentales aplicados a los sedimentos, desde la toma de muestras hasta el método integrado propuesto, pasando por los análisis de sedimentos y organismos vivos llevados a cabo en el laboratorio.

En el Capítulo V se presentan y discuten los resultados obtenidos en los distintos análisis realizados y en la aplicación del método integrado propuesto (índices de contaminación y de degradación ambiental).

En el Capítulo VI se recogen las principales conclusiones obtenidas en este Trabajo fin de Grado, deducidas a partir de los resultados del capítulo anterior. En el Capítulo VII se recoge la bibliografía utilizada y, por último, en el Capítulo VIII se presentan los anexos.

II. ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

Muchos de los contaminantes que se originan como consecuencia de las actividades humanas son transportados, tanto en disolución como adsorbidos sobre las partículas en suspensión, desde las zonas continentales hacia los océanos. Durante este transporte se pueden incorporar a los sedimentos un buen número de estos contaminantes, a través de diferentes procesos como la adsorción o las reacciones químicas [12]. Si además de esta entrada de contaminantes en los sedimentos se tiene en cuenta que:

- En los sedimentos viven, se alimenta y se reproducen un buen número de los seres vivo de nuestro planeta,
- Son un importante sumidero de un gran número de contaminantes [16 y 17], bien sea por deposición directa de partículas en suspensión o por fenómenos de precipitación, adsorción, etc.
- Parte de los contaminantes acumulados en los sedimentos son susceptibles de ser liberados a la columna de agua (en forma disuelta o como partículas) [18 a 21].
- La contaminación de los sedimentos puede tener efectos perjudiciales en los organismos vivos del ecosistema [22 a 26].

Se deduce que los sedimentos tienen una gran importancia en los ecosistemas acuáticos, por lo que la presencia de contaminantes en los sedimentos se ha convertido en un importante problema medioambiental [4 a 7] y ha hecho que en la actualidad se dedique un gran esfuerzo a la investigación y desarrollo de métodos para evaluar la calidad ambiental de los mismos.

En este capítulo se realiza un estudio sobre las principales características de los sedimentos acuáticos y de los métodos de evaluación de la calidad ambiental de los mismos.

2. SEDIMENTOS ACUÁTICOS

Los sedimentos son una parte fundamental de los ecosistemas acuáticos. La Red Europea de Sedimentos (SedNet) los define como “sólidos suspendidos o depositados, formados por minerales o materia orgánica que actúan como el componente principal de una matriz que ha sido o es susceptible de ser transportada por el agua” [26].

Las principales fuentes de sedimentos son los ríos (debido a la movilización de partículas desde el suelo hasta arroyos y ríos, donde son arrastrados en dirección al mar) aunque también existe un aporte marino (provocado por la erosión de la costa y del fondo marino).

2.1. GRANULOMETRÍA

Los sedimentos están formados por partículas sólidas de distintos tamaños. La granulometría o distribución del tamaño de las partículas es una de las variables más importantes para caracterizarlos. Se distinguen cuatro tipos principales de partículas según su tamaño: grava ($>2.000\ \mu\text{m}$), arena ($63\text{-}2.000\ \mu\text{m}$), limo ($4\text{-}63\ \mu\text{m}$) y arcilla ($<4\ \mu\text{m}$) [27]. Para simplificar, en ocasiones solamente se separan en dos categorías: partículas finas (arcilla y limo, $<63\ \mu\text{m}$) y partículas gruesas (arena y grava, $>63\ \mu\text{m}$).

En diversas publicaciones [28 y 29] se incluye un quinto tipo de partículas aún más pequeñas que las arcillas, los coloides, cuyo diámetro se encuentra en el rango de $0,001\text{-}1\ \mu\text{m}$. Con frecuencia, las partículas más finas del sedimento (arcilla, limo y coloides) se unen y forman agregados más grandes, conocidos como flóculos. A pesar de que el material coloidal podría representar una proporción relativamente pequeña del sedimento, es importante de cara al transporte de contaminantes debido a su alta relación superficie/volumen y a su bajo peso [29].

Aunque no se considera parte del sedimento, es importante destacar que se entiende por material disuelto a todo aquel que se encuentra en el agua y cuyo tamaño de partícula es inferior a $0,45\ \mu\text{m}$ [28].

2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las partículas de sedimento pueden estar compuestas de minerales o de materia orgánica. De forma general se puede decir que las primeras son más densas y las segundas son más heterogéneas y con diferentes propiedades hidrodinámicas, físicas y químicas.

Las partículas compuestas de minerales tienen una composición muy dependiente de los materiales circundantes, puesto que en su mayoría proceden de la erosión. Los compuestos químicos más comunes son: minerales de la arcilla (como caolinita o illita), aluminosilicatos (como zeolitas, feldespatos y micas), cuarzo, carbonato cálcico y minerales del hierro [30].

Las partículas compuestas de materia orgánica incluyen una gran variedad de sustancias, entre las que destacan las provenientes de los distintos estados de descomposición de las hojas, ácidos húmico y fúlvico, pigmentos como la clorofila, microorganismos, etc. [30]. Sin embargo, estas sustancias están sujetas a degradación biológica o geoquímica que podría dar lugar a otros compuestos.

El tamaño de las partículas de sedimento y su composición están relacionados. En general, las partículas gruesas son redondeadas y están compuestas de cuarzo con mezclas de

feldespatos, mientras que las finas tienen formas y tamaños diferentes y su composición es más diversa, destacando la arcilla mineral, los granos finos de cuarzo, los carbonatos, las partículas de feldespato y la materia orgánica. Estas diferencias se muestran en la Figura 1, en la que se representa la composición mineral media de arenas y arcillas marinas [31].

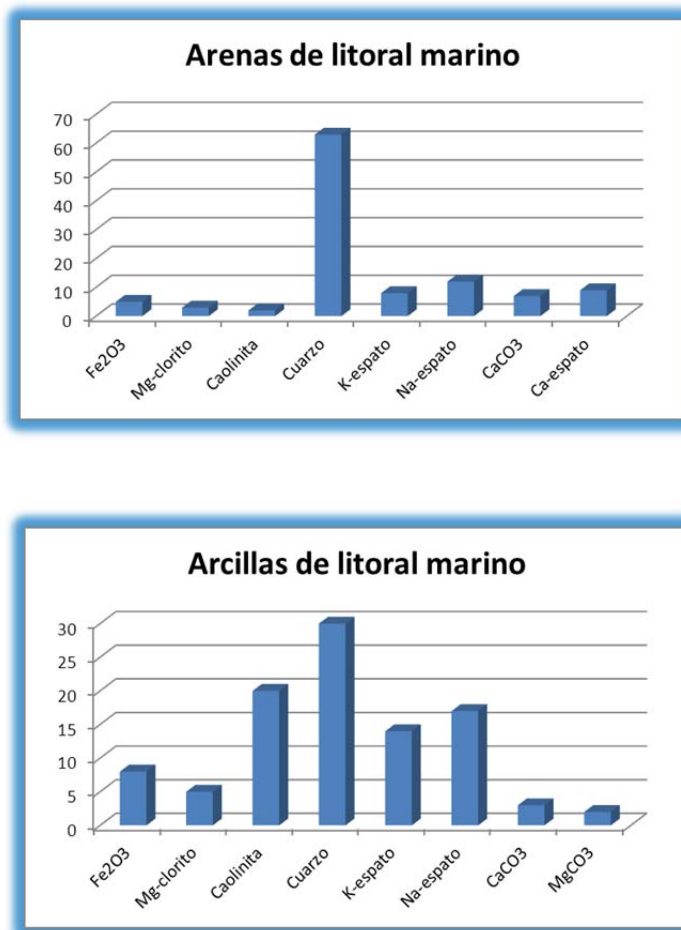


Figura 1. Composición mineralógica media de arenas y arcillas marinas (%).

Como ya se ha mencionado, las partículas finas del sedimento pueden encontrarse en forma de flóculos, los cuales se componen de una matriz o fracción residual, constituida por minerales resistentes procedentes de la meteorización y erosión, y otros componentes más lábiles como minerales, materia orgánica e incluso agua o aire en los poros [32]. La proporción de los cuatro componentes principales: minerales, materia orgánica, agua y aire, determina las propiedades del flóculo, especialmente la densidad, que define si la partícula se deposita o permanece en suspensión [33].

Por último, se distinguen tres tipos de componentes en los sedimentos, en función de su origen: detríticos (formados por fragmentos procedentes de la meteorización de rocas y minerales), biogénicos (procedentes de esqueletos y tejidos orgánicos muertos) y endogénicos (originados por la sedimentación de partículas o tras la precipitación en el agua

de compuestos inorgánicos, tales como carbonatos, sulfuros, oxihidróxidos de hierro y manganeso, etc.) [31].

2.3. CONTAMINANTES

En los ecosistemas acuáticos están presentes multitud de sustancias químicas diferentes. Muchas de las cuales tienen un origen natural y su concentración ha permanecido constante durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, en las últimas décadas las actividades humanas han modificado las concentraciones de algunas sustancias naturales y han introducido sustancias artificiales en concentraciones significativas.

Definir qué compuestos químicos y a partir de qué concentraciones se considera que hay contaminación es una tarea compleja que va mucho más allá de si el origen de las mismas es natural o artificial. Durante muchos años, los científicos marinos han adoptado la definición de contaminación del grupo de expertos en contaminación marina de las Naciones Unidas (en inglés Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, GESAMP) [34]: “la introducción antrópica, ya sea directa o indirecta, de sustancias o energía en el medio ambiente marino, incluyendo a los estuarios, que resulte en un daño perjudicial en los recursos vivos, peligro a la salud humana, impedimento para las actividades marítimas, como la pesca, menoscabos en la calidad del agua para su uso, y reducción de los servicios”. La convención de las Naciones Unidas sobre derecho del mar apoya la definición del GESAMP y la amplía: “la introducción antrópica, ya sea directa o indirecta, de sustancias o energía en el medio ambiente marino, incluyendo a los estuarios, que resulte o fuese probable que resultase en un daño perjudicial en los recursos vivos y la vida marina, peligro a la salud humana, impedimento para las actividades marítimas, como la pesca y otros usos legítimos del mar, menoscabos en la calidad del agua para su uso, y reducción de los servicios”. En esta última definición se añaden no solo los daños consumados, si no aquellos que tuvieran una alta probabilidad de ocurrir. Asimismo, extiende el ámbito de aplicación a la vida marina en general, en lugar de solo a los “recurso vivos”. Además, especifica como actividades marítimas a cualquier uso legítimo del mar, no sólo la pesca.

Dentro de esta definición se suelen incluir a los cinco tipos de sustancias químicas siguientes [35]:

- **Metales**, como manganeso, plomo, cadmio, cinc o mercurio, y semimetales como arsénico o selenio.
- **Nutrientes**, incluyendo compuestos fosforados y nitrogenados, como el amoníaco. Niveles elevados de fósforo puede producir un gran crecimiento de algas lo que, a

su vez, puede provocar una disminución del oxígeno en el agua cuando las algas mueren. Altas concentraciones de amoníaco son, en general, tóxicas para los organismos del bentos.

- **Contaminantes orgánicos persistentes** (en inglés Persistent Organic Pollutants, POP), como el pesticida DDT, el biocida tributilo de estaño (en inglés Tributyltin, TBT) usado en pintura de barcos como antiincrustante, o los bifenilos policlorados (en inglés Polychlorinated Biphenyls, PCBs), utilizados como dieléctricos y refrigerantes.
- **Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos** (en inglés Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH), que es un grupo que contiene compuestos químicos orgánicos del petróleo y subproductos del mismo.
- **Otros Compuestos orgánicos**, como aceites y grasas.

Las fuentes de contaminantes en los ecosistemas acuáticos son innumerables y se clasifican en puntuales y no puntuales [35]. La contaminación de fuentes puntuales proviene de un punto específico e identificable como, por ejemplo, una tubería, mientras que las fuentes no puntuales no se asocian a un lugar concreto.

Las fuentes puntuales incluyen, principalmente, a los efluentes de procesos industriales, como los vertidos de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Las fuentes no puntuales abarcan a un gran número de fuentes diferentes, por ejemplo la deposición atmosférica o las aguas de escorrentía, o las procedentes de vertederos, terrenos de cultivo, granjas, minas u otras operaciones de manufactura.

Es de señalar que los contenidos de metales en los ecosistemas acuáticos tienen una doble procedencia: el aporte “natural” y el “antropogénico” [36]. El aporte natural se debe, mayoritariamente, a la erosión geológica provocada por los cambios de temperatura, la escorrentía y el viento, y al contenido metálico de las formaciones geológicas. El aporte natural es origen de los niveles de fondo de los metales presentes en las aguas y los sedimentos que conforman los ecosistemas acuáticos [37 y 38] y el aporte antropogénico es el principal responsable de los problemas de contaminación de en los sedimentos

2.4. INTERACCIÓN SEDIMENTOS-AGUA-SERES VIVOS

Como se muestra en la Figura 2, los contaminantes está en equilibrio con los tres compartimentos principales de los ecosistemas acuáticos: sedimentos (del fondo y suspendido), agua (de la columna e intersticial) y los seres vivos. Estas relaciones son complejas y no del todo conocidas, si bien confieren un papel central a los sedimentos y a los seres vivos como indicadores de la calidad ambiental de los estuarios.

Entre el sedimento y el agua se producen procesos de sorción/desorción de contaminantes, fundamentales para entender su movilidad en los ecosistemas acuáticos. Los sedimentos en suspensión y los del fondo están conectados mediante procesos de resuspensión-deposición de partículas. El flujo de contaminantes entre el agua de la columna y la intersticial se produce gracias a los flujos bentónicos y, por último, los sedimentos y el agua son fuente de contaminantes para los seres vivos, que además pueden bioacumularse a lo largo de la cadena trófica.

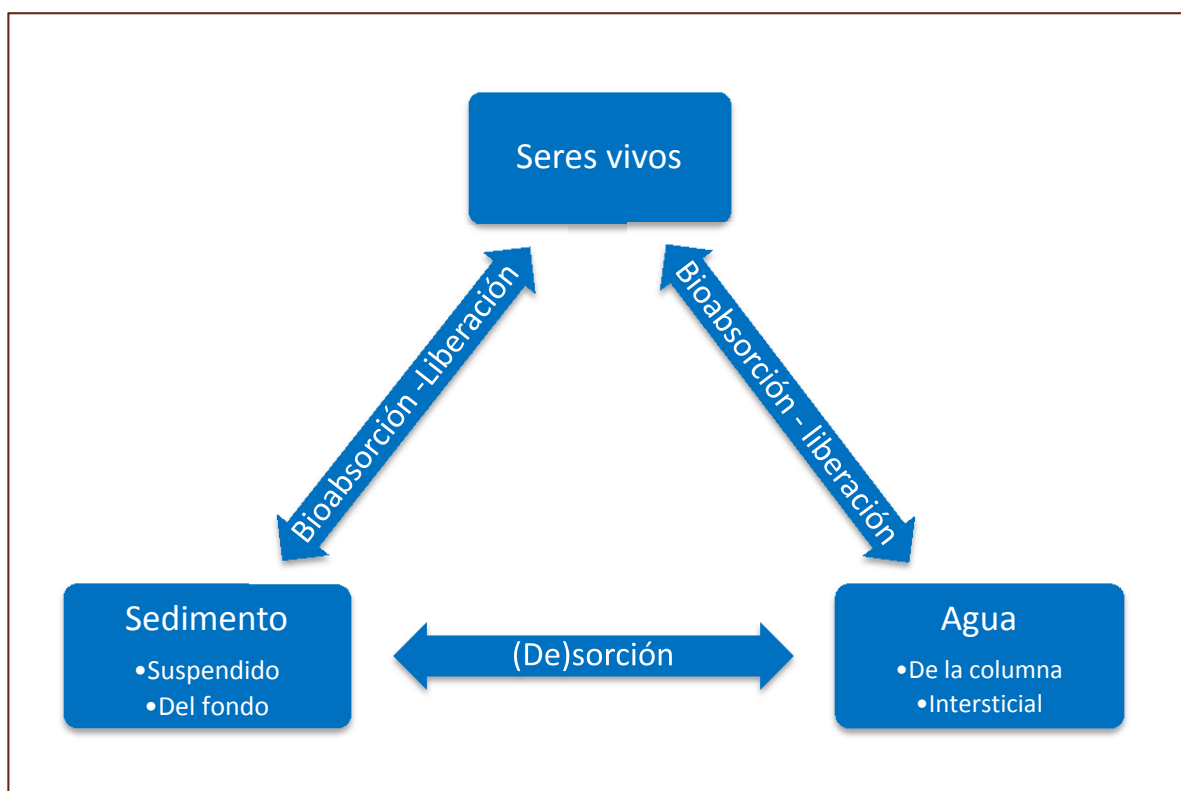


Figura 2. Compartimentos de contaminantes y sus interacciones en los ecosistemas acuáticos.

2.5. CONTAMINANTES EN ORGANISMOS VIVOS

Biodisponibilidad y bioabsorción

Los contaminantes en los ecosistemas acuáticos suponen una amenaza para la supervivencia de los seres vivos debido a que pueden ser absorbidos y, si lo hacen en cantidad suficiente, son capaces de provocar un efecto tóxico. Puesto que los seres vivos son incapaces de absorber la totalidad de contaminantes presentes en los estuarios, se acuñó el término biodisponibilidad, que se define como la fracción de contaminante presente en agua, alimento y sedimento (las tres fuentes principales) que está disponible para la absorción por parte de los seres vivos (bioabsorción) en un periodo de tiempo dado [39 a 41]. De esta definición se deduce que la biodisponibilidad representa la cantidad máxima que podría llegar a ser bioabsorbida, no la que realmente llega a bioabsorberse. Los

factores que determinan la bioabsorción no son bien conocidos, si bien juegan un papel fundamental la concentración del contaminante en el agua y en los sedimentos [42], la presencia de otras sustancias y las condiciones químicas del ecosistema [31].

Bioacumulación: bioconcentración y biomagnificación

Muchos seres vivos acumulan sustancias químicas en sus tejidos en concentraciones más altas que en su ambiente circundante, fenómeno conocido como bioacumulación. Los procesos de bioacumulación se dividen en bioconcentración y biomagnificación. La bioconcentración es el mecanismo mediante el cual un organismo concentra en sus tejidos una sustancia química procedente del agua, debido a la actuación de los procesos de absorción, distribución y eliminación de la misma.

La complejidad de los procesos fisiológicos unida a la variabilidad entre las distintas especies, no permiten relacionar claramente la concentración de un contaminante en el agua o el sedimento y la de los distintos tejidos [42].

Por otra parte, la biomagnificación se refiere a todos aquellos procesos en los que la alimentación es la fuente principal de bioacumulación [43 a 45]. La biomagnificación comienza con la absorción del alimento y la liberación de los contaminantes en el lumen del tracto gastrointestinal, dónde atraviesan la membrana plasmática de las células [44].

Algunos organismos bentónicos, principalmente invertebrados, viven en el sedimento y se alimentan de él, por lo que la biomagnificación podría ser muy significativa. Además, la mayoría de ellos se alimentan de las partículas más pequeñas, que contienen mayor concentración de contaminantes [44]. Debido a la estratificación de los sedimentos, unas especies están más expuestas a la contaminación que otras. Por ejemplo, los moluscos del género *Macoma* se alimentan de los primeros milímetros del sedimento, mientras que otros pueden llegar a profundizar hasta 20 ó 30 cm [42].

Una vez que los seres vivos, como microorganismos, microflora, moluscos, poliquetos, etc., han incorporado contaminantes a sus estructuras celulares, éstos pueden transmitirse a otras especies situadas en un escalón superior de la cadena trófica, siempre que la degradación en los organismos sea baja. Asumiendo que la cantidad de alimentos que toma diariamente un organismo es, aproximadamente, diez veces la cantidad de tejido a regenerar, se deduce que la concentración de contaminante aumenta considerablemente en los niveles superiores de la cadena trófica, por lo que su consumo puede ser peligroso para la salud humana. En la Figura 3 se muestra un esquema del proceso de bioacumulación a través de la cadena trófica.

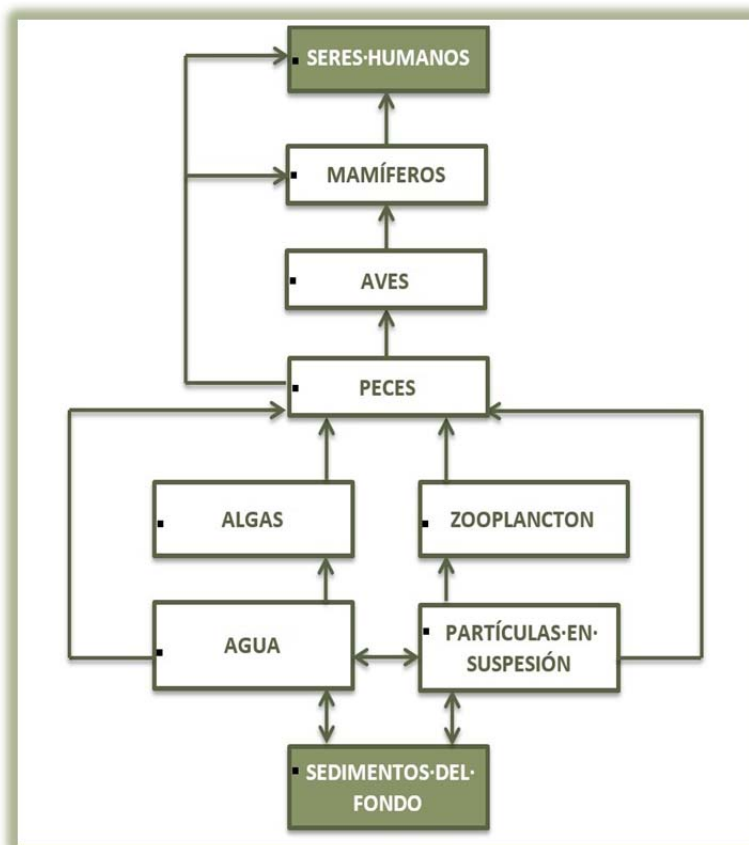


Figura 3. Bioacumulación de los contaminantes en la cadena trófica [31].

Efecto tóxico en seres vivos

Las sustancias químicas bioabsorbidas tienen una respuesta tóxica típica en los seres vivos. Por debajo de una concentración umbral, no se produce el efecto tóxico, sin embargo, superada ésta, el efecto tóxico de la sustancia empieza a ser perceptible en el ser vivo y, si sigue aumentando, acaba siendo letal (Figura 4). A pesar de que el efecto tóxico asociado a un contaminante depende principalmente de su concentración, también pueden ser significativos los efectos de competencia con otras sustancias y los efectos sinérgicos y antagónicos en los procesos fisiológicos [46].

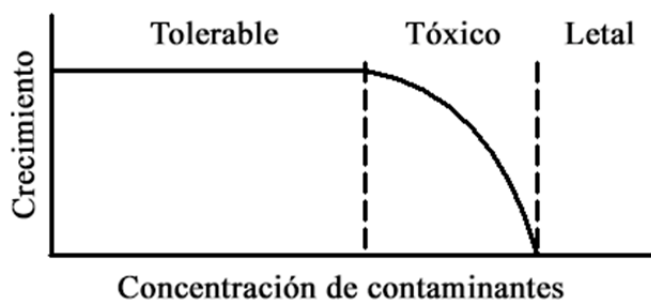


Figura 4. Respuesta típica de los organismos a la concentración de contaminantes.

Existen contaminantes, principalmente algunos metales, que cumplen funciones biológicas importantes y son esenciales en pequeñas cantidades para el desarrollo de los seres vivos, por lo que, tanto una deficiencia como un consumo excesivo de los mismos tienen efectos adversos (Figura 5). La región llana de la figura representa el intervalo de concentraciones óptimas de crecimiento, salud y reproducción. Una región llana amplia corresponde a una baja toxicidad del contaminante, mientras que una región llana estrecha revela un rango pequeño entre los niveles esencial y perjudicial.

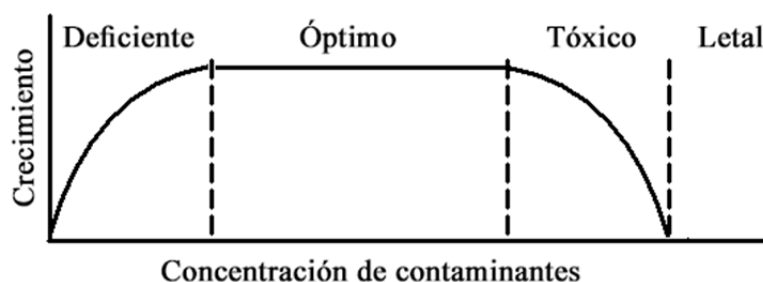


Figura 5. Respuesta de los organismos a la concentración de metales esenciales.

Para que un metal sea esencial ha de ser abundante en la naturaleza (número atómico menor de 40) y estar disponible como especie soluble (elimina a los metales cuyos hidróxidos tienen baja solubilidad, como aluminio, titanio, etc.). Esto es debido a que durante la evolución, multitud de especies de seres vivos han desarrollado adaptaciones para tolerar concentraciones altas de los metales abundantes en la naturaleza. Sin embargo, el contacto limitado con los metales traza, menos abundantes, no requirió de tales adaptaciones.

Los efectos tóxicos producidos por la contaminación de los sedimentos pueden dañar la salud de los seres humanos e, incluso, provocar la muerte del individuo. A pesar de ello, la exposición sobre los seres humanos acostumbra a ser de tipo crónico (en concentraciones bajas y durante largos periodos de tiempo), por lo que los efectos negativos suelen ser más sutiles que en otras especies, debido a que producen enfermedades que aparecen a medio y largo plazo. La ruta de exposición con mayor concentración de contaminantes es a través del consumo de marisco y bivalvos [47].

Una excepción a esta regla, en la que el efecto tóxico sobre los seres humanos si fue patente a corto plazo, fue el caso de la bahía de Minamata, en Japón. Durante los años 50 del siglo pasado, la población de esta región estuvo expuesta a contaminantes a través del consumo de marisco, lo que provocó trastornos mentales a varios miles de personas, de las que un elevado porcentaje murieron [48]. En un primer momento el origen de la enfermedad era desconocido, pero ya en los años 60 del siglo pasado, resultó evidente que se trataba de

envenenamiento por mercurio, concretamente, metilmercurio. Las investigaciones posteriores indicaron que el mercurio había sido liberado desde una instalación industrial de producción de acetaldehído.

La población humana habita cada vez más en las zonas costeras, la presión de sus residuos sobre las cadenas tróficas estuarinas y marinas está aumentando. Además, la acuicultura está incrementando la exposición de la humanidad a los contaminantes. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la concentración de contaminantes es significativamente mayor en las poblaciones de salmón cultivadas que en las salvajes [49].

3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE LOS SEDIMENTOS

Hace sólo unas décadas, la toma de conciencia por parte de la sociedad de los problemas relativos al medio ambiente y, en particular, de la contaminación de las aguas continentales, hizo que naciera la ecotoxicología, la ciencia que estudia los criterios de calidad ambiental y permite clasificar los ecosistemas según su degradación [9 y 50]. En la actualidad, se sigue dedicando un gran esfuerzo al desarrollo de criterios de calidad ambiental que permitan decidir qué medidas son necesarias para recuperar un ecosistema y para prevenir alteraciones futuras [51].

Con el fin de evaluar la calidad ambiental de los estuarios, se han empleado diferentes procedimientos, entre los que caben destacar, por su mayor uso: 1) análisis químicos, como los de contenidos de metales y carbono orgánico, 2) análisis de biodisponibilidad, como los de sulfuro ácido volátil, biomarcadores y extracciones secuenciales, 3) análisis de toxicidad, llevados a cabo con distintos tipos de seres vivos, desde microorganismos a peces y 4) estudios de la estructura de las comunidad bentónica.

Estos métodos tienen como principal inconveniente que solo proporcionan una información parcial del grado de deterioro ambiental del ecosistema. Ninguno de ellos responde completamente a las tres preguntas básicas que se plantean en los estudios de evaluación ambiental [52 y 53]:

- ¿Qué contaminantes están presentes en el ecosistema y en que concentraciones?
- ¿Qué contaminantes están disponibles para la biota y en que concentraciones?
- ¿Qué efectos biológicos tienen estos contaminantes sobre el ecosistema?

Para responder a estas preguntas, han aparecido los denominados “métodos integrados”, en los que se emplean varios de los métodos simples anteriormente mencionados, de forma que cada uno de ellos suministre información complementaria con la del resto. De esta forma, se evalúa la correlación entre los resultados obtenidos por métodos distintos y se

dispone de unos resultados más completos y de mayor calidad que cuando se emplean esos mismos métodos de forma aislada [14].

Para ser incluidos en un método integrado, los métodos simples deben cumplir con una serie de criterios: 1) que se hayan probados y que sus resultados hayan sido exactos (fieles a la realidad), 2) que sean aplicables bajo las distintas condiciones a las que pueden estar sometidos los ecosistemas acuáticos, 3) que tengan un coste reducido, 4) que sean simples y fáciles de llevar a cabo y 5) que proporcionen unos resultados sencillos, fácilmente entendibles y comparables con otros estudios.

En los siguientes apartados de este capítulo se revisan los principales métodos simples que están recogidos en la bibliografía, así como las características fundamentales de los métodos integrados existentes en la actualidad.

3.1. ANÁLISIS QUÍMICOS

Los análisis químicos son uno de los métodos más utilizados en los estudios de evaluación de la calidad en los sedimentos, ya que permiten caracterizarlos, conocer cuáles son los contaminantes existentes y en qué concentración se encuentran. Los contaminantes que se analizan más frecuentemente en los sedimentos son: metales [54 y 55], hidrocarburos clorados [56 y 57], hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) [58 y 59] y bifenilos policlorados (PCBs) [60 y 61]. También es frecuente analizar en los sedimentos el contenido en carbono orgánico.

Para cuantificar la contaminación antropogénica de un sedimento, hay que tener en cuenta que una parte de los contaminantes puede tener un origen natural como, por ejemplo, los metales. Debido a esta circunstancia, es necesario determinar las concentraciones naturales de los contaminantes en sedimentos, es decir, los niveles de fondo.

Otro aspecto a considerar es que cuando los contaminantes se depositan en el fondo de los ecosistemas acuáticos reaccionan químicamente con las partículas y pasan a formar parte de las distintas fracciones del sedimento. Esto da lugar a que una parte de los contaminantes se incorpore a fracciones poco reactivas y pueda quedar inmovilizada, mientras que otra puede quedar enlazada débilmente a los sedimentos y estar disponible para pasar a la columna de agua o ser asimilada por los organismos bentónicos.

La principal limitación de estos análisis radica en que el número de posibles contaminantes es tan elevado que no se pueden analizar todos, por lo que algunos de ellos, podrían pasar

desapercibidos a pesar de tener una notable incidencia en el medio. Además, tampoco suministran información directa sobre el efecto de los contaminantes sobre los seres vivos.

Análisis de metales

Antes de proceder al análisis de metales en una muestra de sedimento, es necesario conseguir que los metales pasen a estar disueltos. El método más utilizado es la digestión ácida, para la que se conocen un gran número de ácidos y mezclas de éstos, entre los que destacan: ácido nítrico [62], agua regia [63], ácido nítrico-ácido perclórico [64], ácido fluorhídrico-ácido nítrico-ácido perclórico.

En los últimos años es cada vez más frecuente realizar las digestiones en recipientes cerrados calentados en hornos microondas [65], ya que presentan las siguientes ventajas:

- Rapidez: las digestiones se realizan en minutos en lugar de horas, dado que al efectuar los ataques a elevada presión, se aumenta notablemente la temperatura.
- Sin pérdidas de volátiles: al trabajar en recipientes cerrados, los elementos volátiles quedan retenidos en el interior del digestor.
- Baja contaminación: puesto que el recipiente permanece cerrado durante la digestión y se reduce el volumen necesario de flujo disgregante.

En el análisis del contenido de metales en los sedimentos se utilizan métodos de una gran sensibilidad, con objeto de evitar preconcentraciones de las muestras, que en ocasiones dan lugar a contaminaciones y pérdidas por volatilización y arrastre. Los metales se pueden determinar utilizando diversas técnicas analíticas tales como absorción atómica, plasma acoplado inductivamente, activación neutrónica, espectroscopía de masas, fluorescencia de rayos X, etc. [66].

La espectroscopía de absorción atómica utiliza la absorción de radiación electromagnética de los átomos libres en estado gaseoso para determinar su cantidad. Esta técnica requiere de un atomizador, que proporcione la energía para romper los enlaces y poner los átomos en estado gaseoso. Existen distintos métodos para atomizar las muestras: en llama, por generación de hidruros, por vapor frío y electrotérmicos. En general, los métodos de llama se aplican para concentraciones moderadas de multitud de elementos. Los equipos de absorción atómica con atomización en llama son fácilmente adaptables a otras técnicas de atomización mediante componentes adicionales. Es el caso del generador de hidruros para el arsénico y el selenio, y de la espectrometría de absorción atómica en vapor frío para el mercurio. Los métodos electrotérmicos utilizan un horno de grafito para la atomización y tienen mayor sensibilidad que los de llama. Sin embargo, cuando la matriz interfiere

excesivamente, requieren de correctores de matriz o sistemas de corrección de fondo, como el de efecto Zeeman.

La técnica de espectroscopía de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente, conocida como ICP óptico, utiliza el plasma para producir átomos excitados e iones que emiten radiación electromagnética a longitudes de onda característica de cada elemento. La espectroscopía de emisión atómica supera a la de absorción, ya que permite alcanzar límites de detección más bajos, medir en unos intervalos de concentración de varios órdenes de magnitud, analizar varios elementos a la vez y determinar elementos no metálicos como cloro, yodo y azufre [66]. Sin embargo, son equipos con elevados costes de inversión y de operación [66]. La combinación de un plasma acoplado inductivamente con un espectrómetro de masas, conocido como ICP-MS, consigue unos límites de detección extraordinariamente bajos [67].

Análisis de contaminantes orgánicos

El criterio principal para la selección de los contaminantes que deben ser analizados en los sedimentos es su preferencia por la adhesión a la fase sólida. En la práctica, se utiliza el coeficiente octanol-agua (K_{OW}). Este coeficiente representa el reparto de un contaminante entre una fase polar (el agua) y otra apolar (el octanol) que es representativo del reparto que ocurriría entre agua y sedimento. Cuanto más hidrófoba sea la sustancia, el reparto estará más a favor del octanol y el K_{OW} será más alto. Como regla general, aquellos contaminantes que tengan un $\log K_{OW} > 5$ deben analizarse en los sedimentos, mientras que los compuestos con un $\log K_{OW} < 3$ deben analizarse en el agua. Para los contaminantes que quedan en medio de estos intervalos, el análisis en el sedimento es opcional y dependerá del grado de contaminación [68].

Petrovic et al. [69] discutieron sobre las ventajas e inconvenientes de los ensayos en sedimento o en otras matrices para los 33 contaminantes prioritarios de la Directiva Marco del Agua [70], más los 8 contaminantes de las Directivas de Sustancias Peligrosas (86/280/EC y 76/464/EEC). En ese artículo, los autores describieron los métodos analíticos normalizados para el estudio de estos contaminantes en diferentes matrices ambientales y demostraron que no todos los contaminantes con afinidad por los sedimentos tienen métodos estandarizados disponibles.

Debido a la diversidad de los compuestos orgánicos presentes en el sedimento, se aplican numerosas técnicas instrumentales. Las más utilizadas son la cromatografía de gases con diferentes detectores, como la espectroscopía de masa o un detector de captura de electrones y la cromatografía líquida con detector de diodo o de fluorescencia. De entre

todas, las cromatografías de gases o líquida combinadas con la espectroscopía de masa son las más comunes, gracias a que alcanzan la selectividad y sensibilidad necesarias para el análisis en matrices complejas.

Análisis de carbono orgánico total

El carbono orgánico total (COT) se define como el contenido en carbono que forma parte de la materia orgánica del sedimento y proporciona una medida de la cantidad total de materia orgánica oxidable. La presencia de materia orgánica provee de sitios de unión para metales y contaminantes orgánicos en el sedimento. De este modo, la materia orgánica modifica los coeficientes de distribución de los contaminantes, mayormente los orgánicos hidrofóbicos. Por ello, algunos autores proponen que todos los contaminantes orgánicos estén normalizados a la concentración de COT en el sedimento, por ejemplo, a un 1% de COT [71].

El análisis del COT se hace generalmente utilizando técnicas de combustión seca a alta temperatura y midiendo la cantidad de CO₂ producida [72]. Los análisis de COT se llevan a cabo en muestras secadas entre 75 y 110 °C, con eliminación previa del carbono inorgánico en forma de CO₂ mediante calentamiento leve de la muestra con ácido diluido. Es necesario eliminar el carbono inorgánico (principalmente carbonatos y bicarbonatos) porque interfiere en la medida y, en algunos sedimentos, supone una fracción significativa del carbono total.

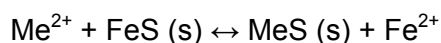
La determinación del COT del sedimento también se puede hacer mediante otras técnicas, aunque son menos frecuentes. Una de éstas es la “perdida por ignición”, que consiste en calentar una muestra de sedimento de masa seca conocida a 400 °C durante 24 horas y, a continuación, determinar la pérdida de peso. Sin embargo, “pérdida por ignición” es más imprecisa que el COT debido a las posibles pérdidas de otros volátiles y, además, es muy dependiente de la temperatura de calentamiento (normalmente en entre 350 y 450 °C). Otras técnicas se fundamentan en la oxidación química, aunque son poco fiables, porque no se contabilizan a algunos compuestos orgánicos.

3.2. ANÁLISIS DE BIODISPONIBILIDAD

Los sedimentos acumulan contaminantes que pueden ser asimilados por los organismos. La fracción biodisponible es aquella que está disponible para la absorción por parte de los seres vivos. La biodisponibilidad es, de ese modo, un concepto complejo, puesto que es específico para cada especie, sedimento y contaminante [73]. No obstante, los mecanismos que solubilizan los contaminantes en el lumen gastrointestinal dan una idea del posible impacto ambiental y ecotoxicológico de los sedimentos contaminados [73].

Sulfuro ácido volátil

El contenido de sulfuro ácido volátil (SAV) en un sedimento es un factor clave para determinar la biodisponibilidad de algunos metales [74 a 76]. Este hecho se debe a que cuando los metales se liberan y se hacen biodisponibles, reaccionan con el FeS, el mayor componente del sulfuro ácido volátil, para formar sulfuros metálicos poco biodisponibles, de acuerdo con la siguiente reacción:



De este modo, los sulfuros ácidos volátiles actúan como un tampón ante la liberación de metales. Normalmente, las concentraciones de metales disueltos, como cadmio, cobre, níquel, plomo y cinc, permanecen bajas mientras queda FeS en el sedimento. Aprovechando esta característica de los sulfuros, se obtiene un indicador sencillo de la biodisponibilidad de metales en el sedimento al comparar la concentración molar de SAV con la suma molar de los metales extraídos simultáneamente (MES). Si el SAV es mayor que el MES, los metales permanecen en forma de sulfuros, con una biodisponibilidad muy baja. Sin embargo, si el SAV es menor que el MES habrá un exceso de metales en relación al sulfuro y podrían quedar biodisponibles.

En algunos estudios se critican a este ensayo debido a que los metales pueden estar biodisponibles en los sedimentos con exceso de SAV sobre MES, mediante la ingestión del propio sedimento [77 a 79]. Además, otros estudios consideran que los metales en sedimentos anóxicos y reductores no solo pueden reaccionar para formar sulfuros, sino que también pueden hacerlo para dar lugar a otras formas no biodisponibles, como los óxidos, por lo que los metales pueden permanecer no biodisponibles, a pesar de que el MES exceda al SAV [80 y 81].

El SAV se define operacionalmente como la fracción de sulfuro extraída de los sedimentos (mmol/kg) mediante una disolución fría de HCl, normalmente durante 1 h en 0,5 M de HCl o 30 min en 1 M de HCl. Los monosulfuros de hierro y manganeso constituyen la mayoría del sulfuro extraído mediante esta técnica. El MES se calcula como el sumatorio de la concentración de metales (cadmio, cobre, níquel, plomo y cinc) en mmol/kg. En la actualidad, la forma más extendida de presentar los resultados es la diferencia MES-SAV, en lugar del tradicional cociente MES/SAV, que resulta inadecuado a bajas concentraciones de SAV. En base a la diferencia, se considera que un sedimento tiene una concentración de metales alta cuando el valor de MES-SAV es igual o mayor de 5 mmol/kg de peso seco de sedimento [82].

Para determinar el contenido en SAV de los sedimentos se han utilizado diversos métodos. La técnica más común es la de “purga y trampa”, en la que se utiliza una disolución de HCl 0,5 ó 1 M para volatilizar el SAV, posteriormente se atrapa el ácido sulfhídrico liberado en una disolución 0,5 M de NaOH y, por último, se analiza el sulfuro mediante colorimetría [74, 76 y 83].

Especiación de metales

La evaluación de la contaminación metálica en sedimentos ha evolucionado desde la simple determinación de la concentración total de cada metal, a la distribución entre las distintas fracciones, lo que ha dado lugar a los denominados “estudios de especiación de metales” [84 a 86]. Este cambio se debe a que, como se ha comentado, la movilidad y la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos está determinada por la especie que está presente en el sedimento (forma de enlace específica y su reactividad) más que por su concentración total [87 y 88].

Las numerosas técnicas de especiación de metales existentes en la actualidad se pueden clasificar en dos grandes grupos: las basadas en métodos instrumentales y las extracciones secuenciales [85]. Entre los métodos instrumentales destacan aquellos en los que se realiza una separación física antes del análisis químico y las técnicas de microanálisis no destructivas, que utilizan haces dirigidos de distintos tipos de partículas (fotones, electrones, protones, iones, etc.) [89].

Las extracciones secuenciales son los métodos más usados para estimar la movilidad de los metales [90 a 92]. En estos métodos, se extraen metales del sedimento mediante ataques con disoluciones cada vez más enérgicas, lo que permite separar, en primer lugar, los contaminantes más débilmente unidos y, en las sucesivas extracciones, los ligados a las fracciones más inmóviles. Estas fracciones son, de menor a mayor fuerza de enlace: la intercambiable, la unida a carbonatos, la reducible, la oxidable y la residual. Después de cada ataque se separan los lixiviados, donde se encuentran solubilizados los metales, y se analizan para conocer la concentración en cada fracción [93 y 94].

A pesar de que se han propuesto numerosos métodos de extracción secuencial, todavía no existe un acuerdo en la literatura científica sobre cuáles son las mejores disoluciones para extraer los metales de cada fracción del sedimento [95]. Entre los métodos propuestos, destaca el BCR-701, del Community Bureau of Reference (BCR) [96], una institución europea que forma parte del Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). Otro método destacado es el diseñado por Tessier et al. [97], a partir del cual se

desarrollaron otros muchos, como el de Krishnamurti et al. [98]. Los métodos del BCR y de Tessier son los más ampliamente utilizados [99 a 101] y existen estudios que defienden su precisión, exactitud y reproducibilidad [97 y 102].

Tanto el método BCR como el de Tessier definen una serie de fracciones de contaminantes, según como estén unidos a las partículas de sedimento. Estas fracciones son similares, con la salvedad de que la fracción que el BCR denomina soluble en ácido, el de Tessier la divide en dos: la intercambiable y la unidad a carbonatos (ver tabla 1).

Tabla 1. Fracciones de contaminantes de los métodos de Tessier y BCR [96 Y 97].

FRACCIÓN	TESSIER	BCR
F1	Intercambiable	Soluble en ácido
F2	Carbonatos	
F3	Óxidos de Fe y Mn	Reducible
F4	Materia orgánica y sulfuros	Oxidable
F5	Litogénica – residual	Litogénica – residual

La fracción F1 (intercambiable) corresponde a los cationes cambiables, es decir, los iones metálicos ligados físicamente por atracción electrostática a posiciones de la superficie de las partículas con carga negativa (adsorbidos), principalmente las superficies orgánicas naturales y las de óxidos de hierro y de manganeso en formas intercambiables.

Los cationes cambiables se liberan fácilmente a la fase disuelta cuando se producen pequeños cambios ambientales. La proporción entre ambas fases está controlada principalmente por el pH (un pequeño descenso en este parámetro puede originar un aumento importante en la concentración de la fase disuelta). Otros factores que también tienen influencia sobre la distribución, son la densidad de sitios de unión de las partículas, la fuerza de enlace metal-partícula y la concentración de otros metales que compitan por los mismos sitios.

Los carbonatos (fracción F2) son un componente importante de los sedimentos a los que se asocian numerosos metales. Tras los cationes cambiables, los carbonatos son los que pasan más fácilmente a la fase disuelta. Al igual que en la fracción intercambiable, el pH es la variable principal que controla la liberación de los metales pertenecientes a esta fracción. Por este motivo, en algunos métodos de extracción secuencial, los carbonatos se extraen conjuntamente con los cationes cambiables, denominándose a esta fase “fracción soluble en ácido”.

La fracción F3 (reducible) está formada por metales unidos a óxidos de hierro (III) y manganeso (IV), los cuales pueden aparecer en los sedimentos como capas en partículas detríticas, cemento entre partículas y partículas en sí mismas, conocidas como nódulos ferromanganesos. El potencial redox es la variable principal que controla la liberación de los metales pertenecientes a la fracción reducible, de forma que un potencial reductor liberará los metales unidos a esta fracción.

La fracción F4 (oxidable) está formada por metales unidos a la materia orgánica y a sulfuros. La materia orgánica tiene una gran afinidad por los metales, lo que provoca que los sedimentos que son ricos en materia orgánica acumulen una elevada cantidad de metales, como es el caso del cobre y el níquel [103]. De entre las distintas moléculas orgánicas, la materia orgánica natural tiene una gran capacidad de formar complejos con metales [104]. Este es el caso de los ácidos fúlvicos y húmicos, cuya capacidad total de enlace se encuentra entre 200 y 600 $\mu\text{mol/g}$ [105].

La fracción F5 (residual) es la que queda después de extraer los metales en las etapas anteriores, el residuo consiste fundamentalmente en silicatos y otros minerales resistentes. Aunque los metales unidos al citado residuo no tienen importancia ambiental, ya que no se liberan al medio ambiente en condiciones naturales, la determinación de esta fracción se considera útil, al menos, para comparar la suma de las extracciones con el análisis del total de metales.

Extracción con enzimas digestivas

Muchos estudios sobre la biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos emplean reactivos simples, como ácidos diluidos, electrolitos, disolventes, etc. [106 a 108] o métodos de extracción secuencial [109 a 111]. Sin embargo, estos ensayos son más representativos de la movilidad de los contaminantes que de su biodisponibilidad [73], debido a que los reactivos químicos no son capaces de imitar las condiciones del tracto digestivo de los seres vivos que se alimentan de sedimentos, donde abundan enzimas hidrolíticas y sustancias químicas derivadas de la predigestión [112]. Estos seres vivos solubilizan metales y otros contaminantes mediante ataques enzimáticos [113]. De este modo, una forma apropiada de estudiar la biodisponibilidad es emplear reactivos biológicos o enzimáticos, que sí son representativos de los encontrados en el sistema digestivo de los organismos vivos [73].

Las condiciones gastrointestinales se pueden simular utilizando enzimas, como la pepsina, la tripsina y la proteasa K, implicadas en los procesos digestivos de muchos organismos vivos [114 a 116].

La pepsina es una proteasa que se secreta en la mucosa gástrica como un zimógeno inactivo, el pepsinógeno, y éste es activado por las condiciones ácidas generadas por las

secreciones gástricas de HCl [73], con un pH entre 2 y 4 [117]. De ese modo, esta enzima puede ser utilizada como un representante del ambiente gástrico. Por otra parte, la tripsina y la proteasa K pueden utilizarse para simular las condiciones intestinales. La tripsina es una proteasa representativa de invertebrados [117], es secretada por el tejido pancreático como un zimógeno inactivo, el tripsinógeno, y éste es activado por la enteroquinasa producida en la pared intestinal o mediante tripsina ya activa [73]. La proteasa K es una enzima proteolítica no específica, que es representativa de las enzimas encontradas en multitud de seres vivos que se alimentan de sedimentos. Ambas enzimas se activan a pH neutro [118].

Recientes investigaciones [118 y 119] demuestran el potencial de los ensayos de biodisponibilidad con enzimas y, de entre todas ellas, destaca la proteasa K, que fue capaz de imitar de forma cuantitativa la interacción entre los metales y los fluidos del aparato digestivo de los seres vivos que se alimentan de sedimentos.

Biomarcadores

Un biomarcador, también conocido como respuesta bioquímica, se define como una variación en los componentes, procesos celulares, estructuras o funciones de un ser vivo que es inducida por un contaminante y que es medible en los fluidos, células y/o tejidos del organismo en cuestión [120], tanto "in situ" como sobre organismos específicamente cultivados en las zonas a estudiar [121].

Los biomarcadores actuales se utilizan como indicadores rápidos de contaminación en los organismos, sin requerir la muerte del ser vivo. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, muchos biomarcadores no son específicos y responden, además de a los contaminantes, a cambios en las condiciones naturales propias del medio (temperatura, parásitos, etc.). Para que un biomarcador pueda usarse en la detección y seguimiento de la contaminación de forma fiable debe conocerse la influencia que estos otros factores tienen sobre él. Otra de sus limitaciones es que no existe ningún biomarcador que responda a todos los posibles contaminantes y es necesario emplear una batería de biomarcadores medidos sobre diferentes organismos, por lo que este método es laborioso, complejo y poco recomendado para estudiar un conjunto amplio de contaminantes.

Los tipos de biomarcadores más utilizados en la actualidad incluyen a los tradicionales de genotoxicidad y a los endocrinos y de inmunotoxicidad, más recientes. Los bioindicadores de genotoxicidad, definidos como los cambios en la expresión genética y, por tanto, la síntesis de proteínas, se han utilizado frecuentemente para analizar la exposición a sustancias químicas de diferentes especies acuáticas y terrestres, tanto in situ como en el laboratorio [124]. La técnica más utilizada para analizar los biomarcadores de genotoxicidad

es la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction, PCR), gracias a que es capaz de determinar la concentración de los transcritos de un tejido dada la secuencia del gen [127]. La abundancia o la actividad de proteínas se cuantifican utilizando diferentes métodos bioquímicos que, en muchos casos, comenzaron siendo empleados con mamíferos y que su uso se ha transferido a otras especies.

Los biomarcadores de inmunotoxicidad son de uso común en el estudio de sedimentos contaminados. Así, por ejemplo, Spurgeon et al. [128] expusieron moluscos a un sedimento contaminado, cuantificaron la respuesta inmunotóxica mediante el índice de fagocitosis de los hemocitos y observaron tanto inmunosupresión como inmunoestimulación, según el tipo y la concentración del contaminante.

Bioacumulación de contaminantes

En los estudios de bioacumulación se determina la concentración de contaminantes en los tejidos o los fluidos del estómago e intestino de organismos bentónicos que viven en sedimentos, tales como oligoquetos, insectos o moluscos [45, 73, 129 a 133]. Las especies animales empleadas para detectar la presencia de contaminantes ambientales se denominan bioindicadores [43 y 44], los cuales han de reunir una serie de características:

- Habitar en una amplia extensión geográfica, para poder comparar los datos de lugares diferentes.
- Ser fáciles de capturar.
- Disponer de información sobre sus características bioquímica y fisiológica.
- Tener escasa movilidad, para que se tenga la garantía de que los resultados son representativos de la zona donde han sido capturados.

Dado que un buen número de los organismos bentónicos están situados en los primeros eslabones de la cadena trófica, los estudios de bioacumulación con estos organismos aportan una información valiosa sobre el riesgo ecológico de los contaminantes en el ecosistema e incluso pueden informar sobre los riesgos para la salud humana [134].

La norma ASTM E1022-94 (de la American Society for Testing and Materials) describe un método para medir la bioconcentración en moluscos de agua de mar [135]. Un test similar se describe en la norma OPPTS 850.1710 de la EPA (Environmental Protection Agency) [136]. También existe una guía de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) para medir la bioacumulación con oligoquetos bentónicos [137]. En este último ensayo, los oligoquetos se exponen a las sustancias contaminantes por medio de sedimentos artificiales y, posteriormente, se llevan a sedimentos limpios para depurarse. Los resultados se expresan como la concentración en los oligoquetos con respecto al sedimento.

Un test similar también está normalizado por ASTM [138]. Esta norma describe varios test de bioacumulación con sedimentos artificiales y otros seres vivos.

También existen estudios de acumulación en peces [137 y 139], en los que se incluye el contaminante a estudiar en su dieta. Estos estudios permiten conocer la tasa de absorción durante la exposición así como la depuración cuando los peces se transfieren a agua limpia. En la práctica estos test son mucho más fáciles de llevar a cabo con sustancias poco solubles en agua, puesto que hay una exposición más constante a través de la dieta que del agua. Este método permite también la exposición de los peces a mezclas de contaminantes, en lugar de tener que hacerlo individualmente.

Este método es, probablemente, el más adecuado para evaluar la fracción biodisponible de un contaminante en un ser vivo en concreto. Sin embargo, la extracción de la cantidad de fluido necesaria y, por tanto, la obtención del número suficiente de organismos, requiere de mucho tiempo y no es recomendable para analizar un número elevado de muestras [73].

3.3. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

La definición de toxicidad de un sedimento, en su sentido más amplio, está referida a los cambios biológicos y ecológicos que causan los contaminantes del sedimento en los organismos vivos. En el ámbito de los bioensayos, el término toxicidad se limita a la respuesta adversa sobre la mortalidad, crecimiento y reproducción de uno o varios organismos expuestos a sedimentos contaminados [140 y 141].

Existen tres tipos de bioensayos de toxicidad atendiendo al tiempo de exposición del ser vivo al contaminante: agudos, subcrónicos y crónicos. Los ensayos de toxicidad aguda son los más utilizados y evalúan los efectos producidos durante un corto período de tiempo, de entre 15 minutos y 48 horas. Los subcrónicos son ensayos algo más largos, de entre 4 y 8 días, mientras que los crónicos duran uno o más ciclos de vida. La forma más común de expresar la toxicidad de la muestra es a través de la concentración letal cincuenta (CL50) o concentración de contaminante capaz de causar la muerte al 50% de la población sometida a ensayo durante un tiempo dado.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los resultados obtenidos por diferentes autores no podían compararse entre sí por la falta de procedimientos estandarizados para el desarrollo de los bioensayos en el laboratorio. Sin embargo, ASTM (American Society for Testing and Materials) ha desarrollado un método para la validación de los ensayos de toxicidad en sedimentos [142], que incluye definir de manera explícita la respuesta que se busca, el tipo de organismo a utilizar, la ruta de exposición y las condiciones experimentales en las que ha de desarrollarse el bioensayo.

Los bioensayos de toxicidad aventajan a otros métodos de evaluación de la contaminación de los sedimentos en que, en general, tienen un coste menor, requieren de menos tiempo para su realización y contemplan la respuesta real de los organismos vivos al conjunto de los contaminantes existentes, incluyendo los posibles efectos sinérgicos y antagónicos de los contaminantes. A pesar de sus ventajas, la extrapolación de los resultados de los bioensayos de toxicidad al ecosistema en su conjunto es problemática, principalmente, como consecuencia de que los bioensayos se llevan a cabo bajo condiciones distintas a las que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, en los bioensayos se utiliza una única especie o un número reducido de ellas, por lo que no se contempla las diferentes sensibilidades frente a los mismos contaminantes de los múltiples organismos presentes en el ecosistema original.

La evaluación de la toxicidad de los contaminantes en sedimentos se puede realizar sobre diluciones de sedimento en agua con una salinidad controlada, sobre lixiviados del sedimento y sobre el agua intersticial [143]. El más usado es el que pone el sedimento en contacto con agua de una salinidad determinada y utiliza la bacteria *Photobacterium phosphoreum*. En general, los test de lixiviados no son recomendables por su falta de relevancia ambiental, ya que las disoluciones utilizadas para lixiviar el sedimento movilizan los contaminantes pertenecientes a las fracciones menos móviles, no disponibles en condiciones naturales, y, además, la disolución en sí añade un efecto tóxico extra no atribuible al sedimento que podría alterar los resultados [144]. Por último, los test con agua intersticial han sido ampliamente utilizados, puesto que los contaminantes en el sedimento están en equilibrio con el agua. Sin embargo, Carr [145] encontró que los test con agua intersticial pueden modificar la toxicidad si, durante la extracción, se oxidación los sulfuros presentes en los sedimentos (sobreestimación) o si los metales coprecipitan con el hierro (subestimación) [146 a 148].

Para minimizar las deficiencias propias de los ensayos de toxicidad, existen una serie de recomendaciones, tales como emplear especies que sean muy sensibles a la contaminación [141], realizar una batería de bioensayos con varias especies [149] y utilizar organismos en distintos estados de desarrollo (larvas, juveniles y adultos) [149 y 150]. También se ha propuesto que se evalúen efectos diferentes a la mortalidad, como el desarrollo larvario anormal, la aparición de malformaciones, etc. [151 y 152]. Aun así, los resultados de este tipo de estudios sólo proporcionan una visión parcial del problema que produce la contaminación en el medio.

Uno de los problemas de los bioensayos es elegir al ser vivo más adecuado. Las propiedades fundamentales que debe cumplir son: facilidad de manipulación, correlación de respuesta con el propio ecosistema, reproducibilidad y posibilidad de cuantificación [153]. De

todos los organismos propuestos, los ensayos bacterianos son los que probablemente mejor se ajustan a las propiedades citadas anteriormente. A continuación se comentan las características de los bioensayos con tres tipos de organismos: bacterias, algas y organismos pluricelulares.

Bacterias

Entre las pruebas que utilizan bacterias, destaca el bioensayo de toxicidad aguda con la *Photobacterium phosphoreum* por su mayor uso [154 a 161], debido a su alta sensibilidad para una gran variedad de compuestos tóxicos y a la elevada correlación observada entre los resultados de este ensayo y otros bioensayos tradicionales. El ensayo se fundamenta en que esta bacteria emite luz gracias a la enzima luciferasa, implicada en su proceso metabólico de respiración. En medios contaminados, las sustancias tóxicas interfieren en su sistema enzimático y la bacteria reduce su emisión de luz en proporción directa con el grado de toxicidad de la muestra.

El test con *Photobacterium phosphoreum* requiere de un volumen pequeño de muestra, tienen una relevancia ecológica demostrada, buena sensibilidad y reproducibilidad, está estandarizados y su ejecución es simple, lo que ha hecho que este test sea ampliamente aceptado [162 a 165]. En este ensayo, se exponen las bacterias a varias concentraciones del sedimento y se mide la emisión de luz a cada concentración para obtener una curva concentración-emisión, a partir de la cual se puede calcular el valor EC_{50} (concentración efectiva del sedimento a la cual se produce una reducción del 50% de la luz emitida). La toxicidad también se puede expresar en unidades de toxicidad por gramo (UT/g), que se calcula con la siguiente ecuación:

$$UT/g = \frac{100}{EC_{50}}$$

Tradicionalmente, los ensayos de toxicidad en sedimentos y otras muestras sólidas, han determinado la toxicidad en un lixiviado de los mismos, pero, de esta manera, los resultados obtenidos dependen en gran medida de las condiciones experimentales en las que se realiza la lixiviación. Uno de los parámetros que más influye en el ensayo es el pH de la disolución, ya que afecta al número y cantidad de contaminante lixiviado y altera a algunos contaminantes inestables ante los cambios de acidez del medio y a las propias bacterias.

En los últimos años, para evitar la influencia del pH, se ha desarrollado un nuevo método en el que las bacterias se ponen en contacto directo con las partículas de sedimento en una suspensión con agua y, posteriormente, se separan antes de medir la luminosidad. Este

método permite determinar el efecto tóxico de todo el sedimento, en lugar de solo la fracción de muestra lixiviada.

Brouwer et al. [166] fueron pioneros en este tipo de ensayo y separaron las partículas de las bacterias mediante centrifugación. Con posterioridad, este método ha experimentado notables mejoras, como el diseño de filtros para la separación de las partículas [162], y las modificaciones realizadas por Svenson et al. [167 a 169], que permiten eliminar la influencia de la dispersión de la luminosidad de las bacterias debida a la turbidez residual de la disolución filtrada.

A pesar de lo extendido que está el análisis con *Photobacterium phosphoreum* y de las mejoras añadidas, este método también recibe algunas críticas, principalmente por dos problemas. El primero es que la filtración puede eliminar bacterias adheridas a la superficie del sedimento y disminuir la emisión de luz y, así, sobreestimar la toxicidad (falso positivo). Este problema es especialmente relevante con sedimentos finos. El segundo problema se debe a la disminución de emisión por el color que toman las muestras al añadir el sedimento, que perdura tras la filtración [170 y 171]. Para solventar estos problemas se utiliza un sedimento de referencia con la misma granulometría, color y turbidez que el sedimento analizado. A pesar de las críticas, otros autores lo defienden asegurando que encontraron una correlación significativa entre la toxicidad detectada en este test y el que utiliza macroinvertebrados bentónicos (anfípodos) [172].

Algas

Las algas del bentos y en particular, las microalgas, juegan un papel importante en la contaminación de los sedimentos, ya que interfieren en las transformaciones químicas y la liberación de metales. A pesar de su importancia, los bioensayos de toxicidad con microalgas han tenido un escaso desarrollo, principalmente porque es un método laborioso y complejo y que requiere contar células en el microscopio, que se pueden confundir con partículas de sedimento [173].

En los últimos años se han desarrollado otros métodos basados en algas del bentos, tales como el estudio de la fotosíntesis y el de la actividad enzimática [174 y 175]. En relación con este último, es habitual el bioensayo de la enzima esterasa del alga *Entomoneis punctulata*, que se basa en la autofluorescencia de la clorofila a. En estos ensayos, la actividad enzimática de la esterasa se utiliza como medida final de la toxicidad, en lugar de la tasa de crecimiento, dado que durante el ensayo se liberan nutrientes del sedimento que tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las algas, enmascarando el efecto de la toxicidad

[176]. La actividad de la esterasa ha sido probada para demostrar la viabilidad de células de algas y de plantas [177 a 179].

El alga *Entomoneis punctulata* se ha mostrado tolerante a un amplio rango de parámetros fisicoquímicos, incluyendo salinidad (15-35 g/L), pH (6,5-8,5) y granulometría (0-100% de partículas <63 µm). El principal problema de este bioensayo es que es relativamente sensible a los PAH y al cobre, pero no a otros metales como cadmio, plomo manganeso o cinc [180].

Organismos bentónicos pluricelulares

Entre los diversos bioensayos con organismos bentónicos pluricelulares destacan, por su mayor uso, los que emplean anfípodos, anélidos, equinodermos y bivalvos. En el caso de los anfípodos, los bioensayos más utilizados en sedimentos marinos y estuarinos son los de toxicidad aguda [181], que utilizan *Corophium volutator* [182 a 185] y *Corophium arenarium* [186]. En sedimentos de agua dulce se emplea el anfípodo *Hyaella azteca* [186].

En lo que respecta a los anélidos, el bioensayo de toxicidad aguda con *Arenicola marina* es el más común, especialmente en el Renio Unido [185]. Este anélido se alimenta de partículas de sedimento y es, por tanto, apto como organismo para el análisis de sedimentos. La *Arenicola marina* se puede utilizar, tanto para sedimentos marinos como de estuario, aunque parece encontrarse más cómodo en aguas más salinas. Otro anélido que se utiliza en Europa es *Nereis* sp. [186]. Sin embargo, estos organismos son principalmente carnívoros, por lo que no se alimentan exclusivamente de sedimento y pueden inducir a error.

El grupo taxonómico de los equinodermos, cuyos representantes más conocidos son las estrellas y erizos de mar, es exclusivo de agua salada. En Europa, se ha estandarizado el ensayo de supervivencia y enterramiento con el erizo de mar *Echinocardium cordatum*, cuyo mínimo de salinidad está en 28 g/L [186, 187 y 188]. En el caso de los bivalvos, los organismos más empleados en Europa son *Ruditapes philippinarum*, *Macoma balthica* [189 y 190] y la *Mercenaria mercenaria* [191].

En cuanto a seres vivos de mayor tamaño, principalmente peces o mamíferos, el principal problema para su uso en ensayos de toxicidad es la larga duración y la complicación experimental del bioensayo, que hacen difícil la determinación de los efectos nocivos de los contaminantes en un tiempo y coste razonables [143]. Así, por ejemplo, para un test de toxicidad con peces, se precisa un mínimo de 50 individuos de la misma especie, edad, tamaño, y criados bajo las mismas condiciones en acuarios distintos. Además, el ensayo requiere una duración mínima de 96 horas [192].

3.4. ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BENTÓNICA

Los organismos vivos que habitan en los ecosistemas acuáticos están adaptados a unas condiciones ambientales determinadas y tienen unos límites de tolerancia a las modificaciones de las mismas. Estos límites varían entre las distintas especies y así, frente a una determinada alteración se encuentran organismos “tolerantes”, que no se ven afectados, y otros “intolerantes” que son más sensibles y no soportan las nuevas condiciones.

Si la perturbación alcanza un determinado nivel, los organismos intolerantes reducen su número, ya sea directamente por muerte de los individuos, o indirectamente mediante disminución de su fecundidad [193 y 194] y su lugar es ocupado por otros organismos más tolerantes. De este modo, la entrada de contaminantes en un ecosistema puede modificar la composición de las comunidades de organismos vivos [195 y 196].

Las comunidades bentónicas, que se definen como los seres vivos que habitan en el sedimento, son un componente crítico de los ecosistemas marinos y estuarinos, ya que transfieren energía a los niveles tróficos más altos y modifican las condiciones físicas y químicas del sedimento y del agua de la interfase agua-sedimento [197 y 198].

De entre los diversos tipos de comunidades bentónicas que habitan en los sedimentos: macrobentos, megabentos, meiobentos y microbentos [199], la más utilizada en los estudios de evaluación de la contaminación es el macrobentos y, en especial, los macroinvertebrados bentónicos. Este término representa a cualquier animal no vertebrado que tenga un tamaño superior a 500 μm y que mantenga una relación directa con el lecho acuático, al menos, durante alguna etapa de su ciclo vital [200]. Los macroinvertebrados bentónicos presentan las siguientes ventajas [201 a 203]:

- Tienen un tamaño relativamente grande (visibles a simple vista).
- Son sedentarios en la mayoría de los casos.
- Su muestreo es fácil y no requiere de equipos costosos.
- Constituyen un amplio espectro de organismos, con tolerancias diferentes a los distintos tipos de contaminantes.
- Su abundancia a nivel de especie responde a variaciones puntuales en el medio, mientras que la composición de la comunidad depende mayormente de las condiciones ambientales a largo plazo.
- Representan un componente importante dentro de la cadena trófica.

La relación entre las características fisicoquímicas del medio y la estructura de las comunidades bentónicas permiten detectar perturbaciones antrópicas a largo plazo de forma

eficiente [134]. Dadas estas circunstancias, la Directiva Marco del Agua [70] recomienda su uso para estimar el estado ecológico de las masas de agua. Además, a estos estudios se les considera un elemento clave para los programas de gestión y control de las áreas fluviales y costeras [204]. Por estos motivos, son ampliamente utilizados en la actualidad, como indicó la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO en su revisión de los indicadores de estrés en el bentos marino del año 2005 [205 y 206], principalmente los indicadores de abundancia, riqueza y diversidad [207 y 208].

Las principales limitaciones de los métodos basados en la estructura de la comunidad bentónica son que resultan laboriosos en el laboratorio y que este conjunto de seres vivos puede verse afectado por perturbaciones naturales que sobreestimen la contaminación [209 y 210]. Para minimizar esta última limitación, se estudia la estructura de la comunidad en una zona próxima no contaminada o, en su defecto, se busca información sobre la estructura bentónica típica de ecosistemas no contaminados con características similares al estudiado.

3.5. MÉTODOS INTEGRADOS

En los últimos años han comenzado a desarrollarse los denominados “métodos integrados” [8 a 13 y 163] en los que se evalúa la calidad ambiental de los ecosistemas utilizando varios de los métodos comentados anteriormente. La información proporcionada por cada uno de ellos ha de ser tratada conjuntamente con la del resto y, así, se pueden confirmar resultados obtenidos por técnicas distintas, obteniéndose unos resultados más fiables que, además, aportan una visión global del estado en el que se encuentra el ecosistema [14].

Dada la complejidad y dinamismo del medio ambiente, la mayor fiabilidad de la información obtenida mediante métodos integrados resulta crucial para definir criterios de calidad con mayor seguridad y para estudiar las llamadas “zonas grises”, aquellas con un grado de contaminación intermedio entre las claramente alteradas y las no estresadas, que representan en torno al 70% de los sedimentos acuáticos [12]. Dentro de estas zonas las diferencias de calidad ambiental son leves y es imprescindible disponer de métodos sensibles y completos para poder llevar a cabo una clasificación realista.

Una vez obtenidos los resultados, los métodos integrados permiten identificar qué áreas se encuentran ambientalmente deterioradas frente a un área de referencia, libre de influencia antropogénica. De este modo, si no existen diferencias significativas entre el área de referencia y las que son objeto de estudio, no es necesario aplicar acciones correctoras.

Si se tiene en cuenta la finalidad de los métodos integrados, es evidente que deben incluir, al menos, dos métodos de evaluación de la calidad. Sin embargo, un estudio que llevase

asociado una integración de todos los métodos de evaluación sería demasiado extenso, tendría un elevado coste económico, resultaría muy complejo desde un punto de vista operacional y mucha de la información obtenida sería redundante [152].

Teniendo en cuenta el despliegue de medios necesario para los estudios integrados, se deduce que los principales inconvenientes de estos métodos son que realizarlos correctamente resulta complejo y costoso y que, además, es necesario tener una formación multidisciplinar para efectuar una interpretación correcta de los resultados.

III. CARACTERÍSTICAS DE LAS ZONAS OBJETO DE ESTUDIO

1. INTRODUCCIÓN

Las zonas objeto de estudio son dos amplias bahías (la de Cádiz y la de Algeciras) situadas en la provincia de Cádiz en las que se concentran importantes núcleos urbanos, grandes industrias y numerosos polígonos industriales (con industrias de menor tamaño) y, además, en las dos bahías existe una gran actividad portuaria y un elevado tráfico marítimo. Todo lo anterior genera, en las dos bahías, una serie de presiones, especialmente en forma de vertidos contaminantes, que afectan a la calidad del medio acuático y, en particular a los sedimentos.

Los núcleos de población producen un volumen considerable de aguas residuales que son vertidas a las aguas de las dos bahías desde numerosos puntos. Además, los ríos que desembocan en las bahías también reciben las aguas residuales de diversos núcleos urbanos y efluentes procedentes de las actividades agrícolas, por lo que también actúan como fuentes de contaminación en la zona costera.

Las grandes industrias situadas en la costa vierten sus efluentes a los ríos y aguas de las bahías. A lo anterior hay que añadir las aguas residuales industriales generadas en los polígonos industriales, que generalmente son vertidas a las redes de saneamiento sin depurar o con un escaso tratamiento.

También hay que tener en cuenta el continuo tráfico marítimo existente en las dos bahías que pueden dar lugar a incidentes y derrames de productos contaminantes.

A continuación, se exponen diversos aspectos relacionados con la hidrología, actividades industriales y tráfico marítimo de ambas bahía. Todos ellos de gran interés para comprender los factores que condicionan los niveles de contaminación de sus sedimentos y el impacto correspondiente.

2. BAHÍA DE ALGECIRAS

La bahía de Algeciras está localizada en el extremo Sur de la Península Ibérica, junto al Estrecho de Gibraltar, punto estratégico de encuentro entre dos importantes masas de aguas (mar Mediterráneo y océano Atlántico) y dos continentes (Europa y África). En la Figura 6 se observa la situación de la bahía en el marco geográfico del Estrecho de Gibraltar.



Figura 6. Mapa del Estrecho de Gibraltar.

La bahía de Algeciras es un cuerpo de agua semicerrado en forma de herradura, con una anchura máxima aproximada de 9 kilómetros en su interior y una longitud de Norte-Sur de unos 10 kilómetros. Los puntos extremos que delimitan la boca de la bahía son Punta Carnero al Oeste y Punta Europa al Este, con una longitud entre ellos de aproximadamente 8 kilómetros, que delimitan una superficie de agua de unos 75 km². Una característica notable de su batimetría es la existencia de un importante cañón submarino que comienza a poca distancia de la costa en la zona norte (frente a las desembocaduras de los ríos Palmones y Guadarranque) y discurre aproximadamente por el centro de la bahía hacia las aguas del Estrecho de Gibraltar, alcanzando profundidades de hasta unos 500 metros en la boca.

Su ribera pertenece de Oeste a Este y en sentido horario a los municipios españoles de Algeciras, Los Barrios, San Roque y La Línea de la Concepción y al territorio británico de ultramar de Gibraltar. La población correspondiente a los cuatro municipios españoles que lindan con las aguas de la bahía es de unos 230.000 habitantes (INE 2014) y la de Gibraltar 29.800 habitantes [211].



Figura 7. Núcleos urbanos de la bahía de Algeciras.

2.1 HIDROLOGÍA.

Fluvial

El cauce de los ríos que desembocan en la bahía de Algeciras está condicionado por el régimen pluviométrico de la zona y por la topología del lugar. En las zonas en las que se localizan elevaciones del terreno muy cercanas a la costa, principalmente en los acantilados, estos ríos tienen un recorrido corto y un acusado estiaje que los mantiene activos únicamente durante las épocas de lluvia. Los ríos que discurren en gran parte de su recorrido por terrenos llanos son, sin embargo, largos con una cuenca fluvial extensa formada por multitud de afluentes que mantienen caudal todo el año. Pertenecen a este último tipo los ríos Palmones, Guadacorte y Guadarranque. En situaciones intermedias, en las que su último tramo discurre por terrenos llanos pero han nacido en montes relativamente cercanos a la costa, aparecen los ríos Pícaro, de la Miel, arroyo del Lobo, arroyo del Saladillo, arroyo de las Cañas y arroyo de los Gallegos, todos ellos encauzados a su paso por núcleos urbanos.

Por las dimensiones de sus cuencas, su gran caudal y su influencia en la topología de la bahía destacan dos ríos, ambos con una extensa red de afluentes. El río Palmones o de las Cañas, con una longitud total de 37 km y una cuenca hidrográfica de 312 km², nace en la sierra del Aljibe y su desembocadura hace de línea divisoria entre los términos municipales de Algeciras y Los Barrios. En el entorno de su desembocadura forma una amplia marisma mareal de aproximadamente 58 hectáreas. El segundo río es el Guadarranque, que nace en la Mogeja del Rayo (término municipal de Jimena de la Frontera) tiene una longitud de 43 km, una cuenca hidrográfica de 264 km² y desemboca en esta bahía, haciendo de divisoria entre los términos municipales de Los Barrios y San Roque.

Marina

Actualmente el régimen de corrientes marinas de la bahía de Algeciras se encuentra profundamente transformado por la construcción de las instalaciones portuarias. Antes de esta transformación existía una red de corrientes secundarias originadas tras desviarse en los diferentes accidentes costeros la corriente principal, proveniente desde el Oeste del Estrecho de Gibraltar. Esta corriente primaria era la responsable de la erosión de la costa del Peñón de Gibraltar y de la distribución de los sedimentos propios y de los depositados por los cursos fluviales.

Las principales zonas receptoras de sedimentos se encontraban en la orilla occidental de la bahía mientras que en la zona norte las corrientes actuaban principalmente transportándolos. Así se producía una fuerte sedimentación en las playas de Palmones y del Rinconcillo. Tras pasar las puntas de Paredones y San García las corrientes continuaban paralelas a la costa, trasladando sedimentos por la ensenada de Getares y la costa del Estrecho hasta la playa de Los Lances, en Tarifa.

Las infraestructuras portuarias sin embargo han modificado este régimen de corrientes. La profunda modificación de la línea de costa durante la segunda mitad del siglo XX ha supuesto un incremento del frente costero correspondiente a los puertos. Los obstáculos que ofrecen las instalaciones portuarias provocan la refracción de las corrientes marinas que dejan de circular paralelas a la costa para adentrarse en zonas profundas de la bahía. Se reducen, por lo tanto, los procesos de transporte y sedimentación aumentando los erosivos, principalmente en las playas.

Las aguas de la bahía de Algeciras son ligeramente más frías que las de las zonas circundantes del mar de Alborán y el Estrecho de Gibraltar, posiblemente por efecto de la

penetración y ascenso brusco de las corrientes profundas provenientes del Mediterráneo. Las mareas tienen poca importancia situándose el máximo mareal en los 0,8 m, de forma casi constante a lo largo de toda la ribera.

2.2. ACTIVIDAD INDUSTRIAL.

En el Campo de Gibraltar, y más concretamente en los terrenos próximos a la bahía de Algeciras, se ha desarrollado un extenso tejido industrial que constituye uno de los principales enclaves industriales de Andalucía. La actividad industrial de la zona se puede dividir en:

- Grandes industrias: localizadas, la mayoría de ellas, en la zona Norte de la bahía y dedicadas fundamentalmente al refino de petróleo (refinería Gibraltar-San Roque y Compañía Logística de Hidrocarburos), petroquímica (CEPSA Química Guadarranque y CEPSA Química Puente Mayorca), metalurgia (Acerinox), producción de energía eléctrica (Endesa Central de Ciclo combinado de San Roque II, EON Central Térmica de los Barrios, EON Central de Ciclo Combinado de bahía de Algeciras, Gas Natural Fenosa y Nueva Generadora del Sur) y biocombustibles y gases industriales (Abengoa Bioenergía, Linde y Air Liquide). La producción de estas empresas supuso en el año 2013 casi 11.700 millones de euros [213], de los que el 73% correspondió a las empresas de refino de petróleo.



Figura 8. Zona industrial en la bahía de Algeciras.

- Polígonos industriales: distribuidos por toda la bahía, pero especialmente en los términos municipales de Algeciras y San Roque. En ellos se desarrollan multitud de

actividades: fabricación de productos metálicos, productos alimenticios y bebidas, industrias de la madera, corcho y muebles, construcción naval, mantenimiento y reparación de buques, productos minerales no metálicos y fabricación de artículos del papel, entre otros.

2.3. ACTIVIDAD PORTUARIA Y TRÁFICO MARÍTIMO.

La estratégica situación de la bahía de Algeciras, junto al Estrecho de Gibraltar, ha contribuido al desarrollo de una importante actividad comercial y de transporte de pasajeros, ocasionando que las aguas de la bahía estén sometidas a un intenso y continuo tráfico de grandes buques (el tráfico marítimo registrado en la zona es uno de los más intensos de todo el Mediterráneo).

En esta bahía existen dos puertos activos: el de Gibraltar y el de bahía de Algeciras. El primero, administrado por la Autoridad Portuaria de Gibraltar desde el año 2005, tiene como principales actividades el trasvase de combustible o “bunkering” (en el año 2.009 se alcanzaron los 4,7 millones de toneladas de combustible trasvasado) y el atraque de cruceros turísticos (tiene dos muelles de atraque de 2.300 y 1.000 metros de longitud y tres puertos deportivos: Queensway Quay, Marina Bay y Ocean Village).

Los puertos de Algeciras, La Línea y las instalaciones de Crinavis, Refinería y Campamento se agrupan bajo la denominación de Puerto de la Bahía de Algeciras, que son administradas por la Autoridad Portuaria de la Bahía de Algeciras. Estas instalaciones conforman el primer puerto de España en tráfico total de mercancías (movieron un total de 91 millones de toneladas en el año 2013). Realizan también actividades de “bunkering” (en el año 2012 se trasvasaron 3,06 millones de toneladas de fuel). También es notable su actividad en el tráfico de pasajeros, con líneas regulares con las ciudades de Ceuta y Tánger y que en el año 2013 transportaron cerca de 5 millones de pasajeros. El tráfico de contenedores se realiza en los muelles de Isla Verde exterior (de 30 hectáreas de superficie) y Juan Carlos I (con 69 hectáreas de superficie) del puerto de Algeciras. Posee instalaciones en las principales industrias de la bahía, el pantalán y la monoboya de la Refinería de CEPSA, el muelle de Acerinox, el pantalán C.H.S. y el puerto de Endesa, que se complementa con el muelle de Campamento que posee astilleros para proyectos singulares. La Autoridad Portuaria también gestiona dos puertos deportivos, el Alcaidesa Marina (en La Línea de la Concepción) y el de la Dársena del Saladillo (en Algeciras).



Figura 9. Instalaciones del Puerto de Algeciras

3. BAHÍA DE CÁDIZ

La bahía de Cádiz es una ensenada de unos 10 Km de ancho y una superficie de unos 110 km², localizada en el Suroeste de la costa atlántica española, entre el municipio de Rota y la ciudad de Cádiz. En esta bahía desemboca el río Guadalete, que ha sido un elemento fundamental en la génesis de la misma.

La bahía de Cádiz comprende dos zonas bien diferenciadas delimitadas por el puente “José León de Carranza”; la primera se corresponde con el saco interior de la bahía (con una superficie de 26 km²) y se caracteriza por ser un área de poco calado, con profundidades que no suelen alcanzar los cinco metros, con fondos limosos y una baja tasa de renovación de las aguas, lo que favorece la acumulación de los contaminantes vertidos al mar. La bahía exterior es más profunda y la renovación de sus aguas es más rápida.

El arco de la bahía está delimitado por grandes núcleos urbanos: Rota, El Puerto de Santa María, Puerto Real, San Fernando, Chiclana de la Frontera y Cádiz (ver figura 10) con una población cercana a los 460.000 habitantes (INE 2014).

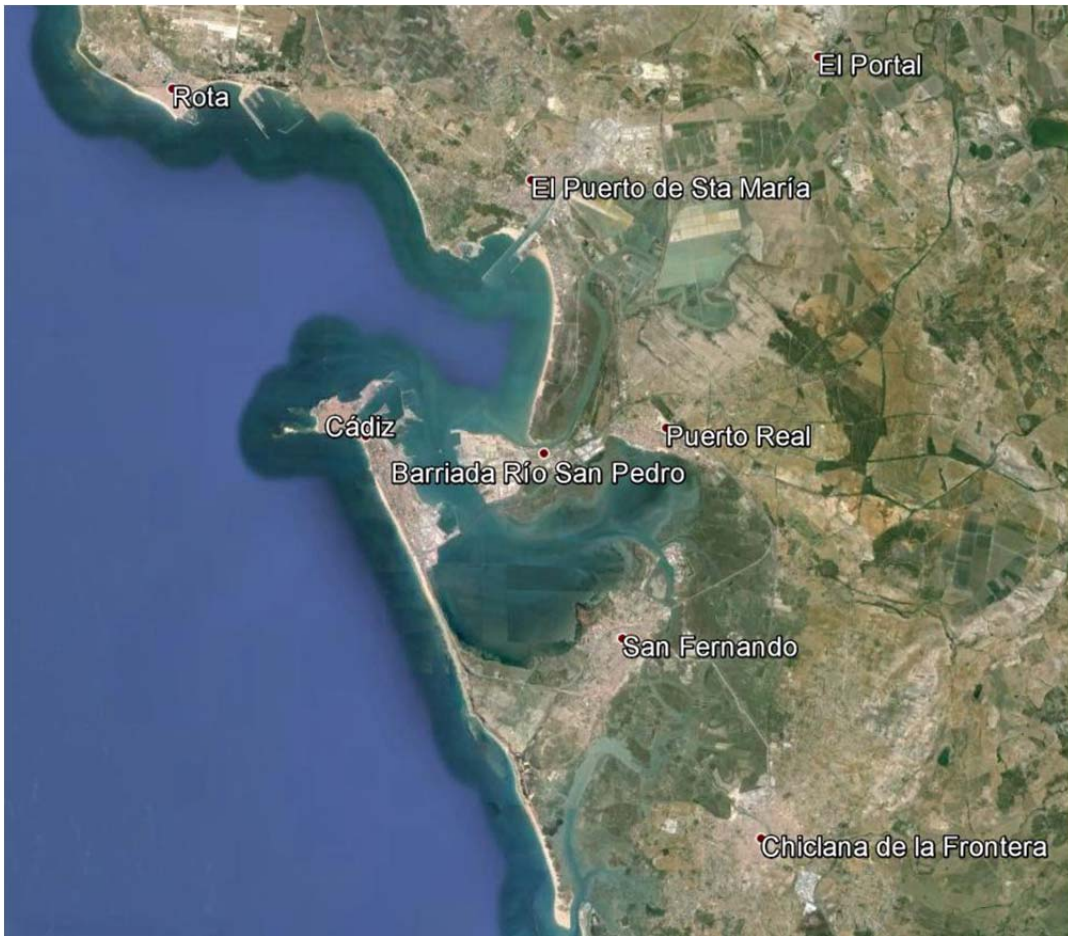


Figura 10. Núcleos urbanos de la bahía de Cádiz.

En esta bahía se desarrolla una notable actividad industrial con empresas del sector de transformación de metales (construcción de buques, fabricación de componentes para automóviles, etc.), así como empresas del sector de la alimentación y derivados. También existe un alto tráfico marítimo que puede contaminar las aguas y los sedimentos, bien sea por vertidos “accidentales” o producidos en la carga y descarga de mercancías. Por último, hay que considerar la contaminación adicional producida por el río Guadalete, que recoge las aguas residuales de grandes poblaciones como Jerez y Arcos, vertidos de las industrias bodegueras y azucareras, efluentes procedentes de las actividades agrícolas, etc.

2.1 HIDROLOGÍA.

Fluvial.

Los ríos que desembocan en esta bahía pertenecen a la cuenca del Guadalete-Barbate, siendo el río Guadalete el de mayor entidad. La configuración de la red hidrográfica está

condicionada por su morfología y topografía. De este modo, las pendientes débiles y las amplias superficies han determinado una amplia red de drenaje en la que las fluctuaciones del caudal se deben fundamentalmente a los ascensos y descensos del agua mareal que penetra en los cauces.

El río Guadalete desemboca en El Puerto de Santa María y atraviesa parte de las marismas de la bahía de Cádiz. El río San Pedro constituye en la actualidad un brazo de mar ya que su cauce se interrumpió varios kilómetros río adentro con motivo de las obras de desecación de esta zona de marisma. En su margen derecha se localiza una red de caños que drenan el agua de las mareas desde las marismas de los Toruños al río San Pedro, siendo los caños más importantes los del Bote y el Caserón.

Otros ríos de menor entidad son el Zurraque y el Iro, que discurren por la zona sur hasta desembocar en el caño de Sancti Petri. Este caño constituye la arteria principal de comunicación entre las aguas libres del océano Atlántico con las aguas interiores de la bahía de Cádiz, a lo largo de un sinuoso recorrido de 18 km. La anchura del caño es relativamente uniforme, llegando a estrecharse en algunos sitios apreciablemente mientras que su profundidad varía en mayor medida. Del caño de Santi-Petri parte una compleja red de caños secundarios tales como Cerromolino, Carbonero, Isleta o del Águila, cada vez más estrechos y que inundan la marisma a través de enrevesadas ramificaciones.

Por último, también cabe destacar al río Arillo, cuyo recorrido sigue el límite entre los términos municipales de Cádiz y San Fernando. Se trata de un caño procedente de la bahía que ha perdido su comunicación con el océano Atlántico.

Marina

La dimensión y la intensidad de las olas generadas por los vientos locales y del oleaje en alta mar, influyen decisivamente sobre la evolución de la línea de costa. Las direcciones más representativas son de WNW (Oeste Noroeste) y de WSW (Oeste Sudoeste). La primera genera una corriente costera de deriva litoral NW-SE (Noroeste-Sudeste) en las playas fuera de la bahía y la segunda, concentra las olas de los temporales, que son el origen de la erosión invernal de las playas e incluso de los cordones dunares.

La flecha litoral de los Toruños ha tenido una evolución significativa en los últimos años, en gran parte debido a la influencia que sobre su dinámica ejerció la desecación de la marisma

del Guadalete y el proceso de relleno del Bajo de la Cabezuela. La evolución a partir de entonces ha sido un retroceso general de la flecha, acompañado de una fuerte progresión en su lado interno, que actúa también como barrera interna en la desembocadura del caño de San Pedro, contribuyendo a cerrarlo aún más.

En el transcurso de más de doscientos años la bahía interna ha mostrado un acusado proceso de colmatación, menor en el canal de navegación debido a los continuos dragados de que es objeto a fin de dar continuidad al tráfico marítimo.

Las mareas de la bahía de Cádiz y de su zona de influencia son de tipo semidiurno (dos pleamares y dos bajamares en 24 horas) de rango inferior, normalmente, a 3,5 metros. Las corrientes de marea se caracterizan por tener un corto y acusado periodo de creciente y un dilatado periodo de vaciante. Los flujos de marea, consecuencia de las ondas de marea, penetran hacia la bahía interior y red de caños a través del caño de Sancti Petri en su desembocadura y el Estrecho Puntales, encontrándose en una zona al Sudoeste de la Isla del Vicario denominada La Corta, en un tramo que habitualmente queda seco en las bajamares a partir de las mareas medias vivas.

3.2. ACTIVIDAD INDUSTRIAL.

Durante gran parte del siglo XX el motor económico de la bahía de Cádiz ha sido sus grandes industrias, que se podían dividir en dos grupos: el primero constituido por el sector naval, las industrias militares y su industria auxiliar y el segundo por el sector aeronáutico.

El sector naval y las industrias militares históricamente han estado concentrados en las grandes factorías de Cádiz, San Fernando y Puerto Real y en los últimos años ha sufrido una importante reestructuración. A partir del año 2005 los antiguos astilleros IZAR se segregaron en las divisiones militar y civil. La primera ha continuado bajo titularidad estatal (SEPI) y tiene como nueva denominación Navantia y la segunda ha pasado a manos privadas.

Navantia subcontrata un amplio abanico de servicios. La industria auxiliar se encarga de hasta el 80% del trabajo total de los astilleros. En la bahía funcionan cerca de 50 empresas auxiliares, la mayor parte son empresas complementarias y de bienes de equipo, y el resto son servicios, talleres y empresas de ingeniería.



Figura 11. Astilleros de Navantia

El sector aeronáutico está integrado en un complejo productivo común con el de Sevilla capital. Destacan dos grandes factorías en Puerto Real (AIRBUS) y El Puerto de Santa María (CASA-EADS), con una gran industria auxiliar, implicadas en sendos proyectos de aviación civil y militar del Consorcio Aeronáutico Europeo.

En las dos últimas décadas el siglo XX surgieron algunas grandes industrias de bienes de equipo que compensaron, en cierta manera, las pérdidas producidas en otras grandes industrias tradicionales. Estos ramos de actividad son: el sector de las construcciones civil y el de la automoción y la electrónica. En el primero de estos sectores destaca una gran factoría (Dragados Offshore) en Puerto Real, especializada en la construcción de plataformas gasistas, y la empresa de construcción VIPREN, situada en Chiclana. Por su parte, en los sectores de automoción y electrónica destacan dos empresas Visteón en El Puerto de Santa María y Delphi en Puerto Real.

Es de señalar que la industria en la bahía de Cádiz está sufriendo en los últimos años un gran declive, que ha dado lugar al cierre de importantes empresas como Delphi en el año 2007 y Visteón en 2011. También ha comenzado a peligrar el futuro de los astilleros, por la falta de pedidos, y de Dragados que está sufriendo con una larga etapa de pocos contratos.

3.3. ACTIVIDAD PORTUARIA Y TRÁFICO MARÍTIMO.

El denominado Puerto de la bahía de Cádiz es un complejo portuario situado en esta bahía, que agrupa a los siguientes puertos: Muelle de Cádiz, Muelle de Cabezuela-Puerto Real,

Muelle de la Zona Franca (Cádiz) y Muelle de El Puerto de Santa María y que están todos gestionados por una misma institución: La Autoridad Portuaria de la Bahía de Cádiz.

El Puerto de la Bahía de Cádiz se encuentran en dura competencia con otros puertos más ágiles y mejor situados, como el de Algeciras, lo que ha ocasionado que haya perdido casi toda su importancia como puerto mercante. No obstante, en los últimos años se está convirtiendo en un importante punto de parada de cruceros y transatlánticos y, además, de él parten permanentemente barcos que unen a la península con Tánger y las Islas Canarias.



Figura 12. Puerto de Cádiz

IV. MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. INTRODUCCIÓN

En este Trabajo Fin de Grado se han tomado muestras de sedimentos en las bahías de Cádiz y de Algeciras y se ha determinado la distribución granulométrica de los mismos y sus contenidos en metales (totales y mediante extracciones secuenciales) y carbono orgánico total, así como la toxicidad (mediante el bioensayo con la bacteria *Photobacterium phosphoreum*) y los organismos vivos presentes en los sedimentos (mediante el estudio de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos).

A continuación, se describen los métodos empleados en la toma, preparación y análisis de las muestras y la metodología utilizada en el estudio integrado de los datos.

2. TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

2.1. LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE TOMA DE MUESTRAS

En la figura 13 se presenta una vista global de las dos zonas objeto de estudio: bahías de Cádiz y Algeciras (ambas situadas en el litoral de Cádiz).



Figura 13. Vista global de las zonas objeto de estudio.

Se han seleccionado un total de 11 puntos de toma de muestra (ver figuras 14 a 16 y anexo 1), de los cuales 5 se situaron en la bahía de Algeciras (A1 a A5), 5 en la bahía de Cádiz (C1 a C5) (A1 a A5) y 1 en el litoral de Cádiz (LC). La inclusión de un punto, LC, no situado en ninguna de las dos bahías se debe a que en este tipo de estudios se requiere que se tome alguna muestra en una zona que pueda servir como referencia. Idealmente esta zona debe ser lo más parecida posible a la que es objeto de estudio y, además, debe encontrarse libre de influencias antrópicas que pudieran alterar sus características naturales. De acuerdo con lo anterior, el punto de muestreo LC, está situado en el litoral de Cádiz (ver figura 16) y lejos de las fuentes de contaminación que pudieran alterar su estado natural.



Figura 14. Puntos de toma de muestra en la bahía de Algeciras.



Figura 15. Puntos de toma de muestra en la Bahía de Cádiz



Figura 16. Punto de toma de muestra en el litoral de Cádiz

2.2. MUESTRAS DE SEDIMENTOS

Las muestras de sedimento se tomaron entre el 9 y el 10 de febrero de 2015 desde una embarcación, mediante una draga de impacto de tipo Van Veen (figura 17), que permite obtener muestras de las capas superficiales. Las dragas de este tipo se caracterizan por tener dos palas que se mueven en sentidos opuestos y por llevar adosadas dos planchas de acero inoxidable en la parte superior que posibilitan su introducción en el sedimento.



Figura 17. Draga de impacto de tipo Van Veen.

En cada punto se tomaron las muestras por duplicado, se introdujeron en recipientes de polietileno refrigerados y se transportaron a 4 °C y en la oscuridad. En el laboratorio se homogeneizaron, se dejaron decantar para eliminar el exceso de agua y se separaron en tres fracciones (señaladas como 1, 2 y 3 en la figura 18). A continuación, se conservaron a 4 °C en el frigorífico, con el objeto de evitar posibles alteraciones químicas hasta su análisis.

La fracción 1 se utilizó para determinar la distribución granulométrica y la 2 para calcular la humedad (para lo que se secó a 105 °C).

La fracción 3 se secó a 60 °C en una estufa, se disgregó con mortero de ágata y se tamizó para obtener la fracción con un tamaño de partículas inferior a 63 μm para minimizar el efecto de la diferencia de granulometría en las muestras, según lo recomendado por numerosos investigadores [5, 213 y 214], y se empleó para el análisis

de metales (totales y extracciones secuenciales), carbono orgánico total y bioensayo de toxicidad.

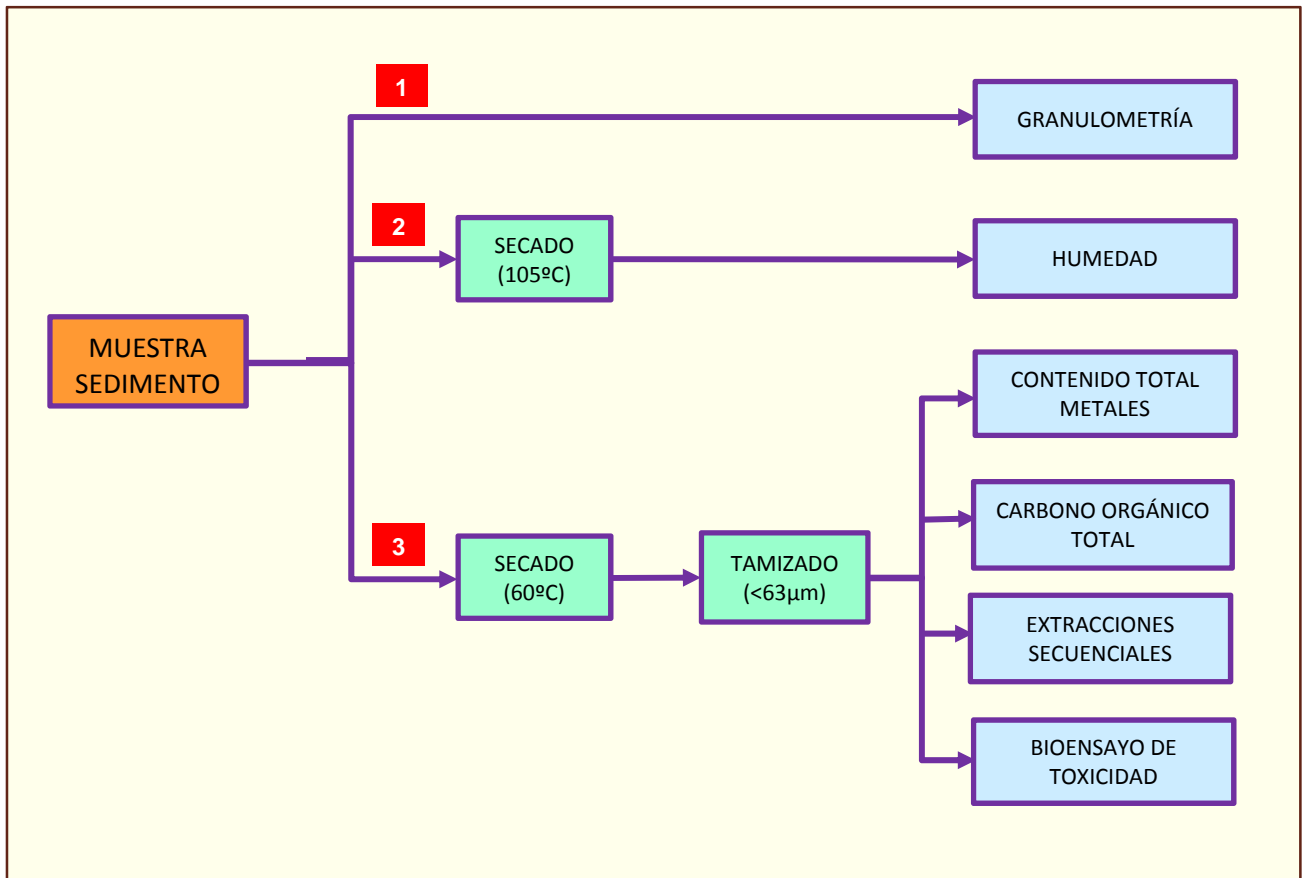


Figura 18. Tratamientos previos de las muestras de sedimentos.

Todos los resultados de los análisis se han expresado en base seca a 105 °C, para lo que se empleó la siguiente ecuación:

$$C_{S105} = C_{St} \times \left(\frac{100 - \% \text{ humedad}_t}{100 - \% \text{ humedad}_{105}} \right)$$

Donde:

- C_{S105} = concentración del elemento en base seca (105 °C).
- C_{St} = concentración del elemento secado a una temperatura t.
- $\% \text{ humedad}_t$ = porcentaje de humedad a la temperatura t.
- $\% \text{ humedad}_{105}$ = porcentaje de humedad a la temperatura de 105 °C.

2.3. MUESTRAS DE ORGANISMOS VIVOS (MACROBENTOS)

En la misma fecha y en los mismos puntos en los que se tomaron los sedimentos, se obtuvieron las muestras de organismos vivos (macroinvertebrados bentónicos). Estas muestras, al igual que las de sedimento, se obtuvieron mediante una draga Van Veen (con una superficie operativa de 0,05 m² y un peso aproximado de 8 kg). Este tipo de draga posibilita la toma de muestras de superficies rectangulares y profundiza en el sedimento un mínimo de 10 cm, fracción en la que se encuentra representada la mayor parte de la fauna objeto de estudio [215].

En cada punto se tomaron cinco réplicas, con una superficie total de 0,25 m². Diversos autores [215 y 216] señalan que 0,1 m² es una superficie suficiente para conocer los taxones que habitan en el sedimento, por lo que la superficie total de muestreo empleada en este estudio se considera representativa de la zona.

Las muestras se introdujeron en recipientes refrigerados y se transportaron a 4 °C y en la oscuridad. En el laboratorio se homogeneizaron y se tamizaron, con objeto de eliminar no solo el sedimento más fino, sino también los organismos que por su tamaño no son objeto de este Trabajo Fin de Grado.

En este sentido, cabe señalar que aunque este estudio se centra en el análisis de las comunidades macrobentónicas (integradas por organismos con tamaños superiores a 1 mm [219]) se ha utilizado un tamiz de 0,5 mm de luz de malla, ya que con éste pueden retenerse organismos juveniles del macrobentos, muy importantes para la valoración global de la calidad ambiental del medio [222 y 223]. De igual forma, asegura la captura de organismos vermiformes (con forma de gusano) que, debido a su especial morfología, podrían atravesar tamices con luces de malla superiores y ocasionar errores en la interpretación de los resultados [216 y 218]. Tras el tamizado, las muestras se conservaron en una solución compuesta de formol al 10% y rosa de Bengala al 1%. Esta solución de conservación posee un efecto colorante selectivo sobre el protoplasma de los organismos, que permite separarlos más fácilmente del sustrato.

3. ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

3.1. GRANULOMETRÍA

La granulometría consiste en separar las partículas en función de su tamaño mediante un conjunto de tamices colocados en serie. Conociendo la masa inicial, pesada previamente, y el peso de cada fracción, es posible conocer la distribución granulométrica.

La granulometría se realizó por vía húmeda, para lo que se pesaron 100 g de sedimento húmedo por muestra. A continuación, se agitó el sedimento en una volteadora para disgregar los posibles grumos y, posteriormente, se cribó en una columna de tamices con la ayuda de un agitador mecánico, mientras se añadía agua pura. Los tamices empleados en la columna tenían luces de malla de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,063 mm y, tras éstos, se colocó un fondo donde se recogió la fracción más fina.



Figura 19. Torre de tamices

El sedimento contenido en cada tamiz se vertió en filtros de 0,45 μm , previamente secados durante 4 h en una estufa a 105 $^{\circ}\text{C}$ y pesados en la balanza analítica. Los filtros con el sedimento se colocaron en un equipo de filtración y se filtró con abundante agua pura. Por último, se introdujeron los filtros en una estufa a 105 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 h y se pesaron en la balanza analítica. La diferencia de peso permitió calcular los porcentajes acumulados en cada uno de los tamices y con éstos se calculó el valor de la mediana, que tipifica al sedimento, de acuerdo con la escala geométrica de Wentworth [27] (tabla 2).

La distribución granulométrica del sedimento es un factor de gran importancia en la composición y estructura de las comunidades del macrobentos. Los sedimentos con altas proporciones de granos finos presentan poblaciones poco numerosas, ya que las partículas finas dejan pocos huecos para que se desarrollen y vivan los macroinvertebrados. Por el contrario, un mayor tamaño de grano favorece un incremento en el número y diversidad de macroinvertebrados [218].

Tabla 2. Escala geométrica de Wentworth.

Q_{50} (mm)	TIPO DE SEDIMENTO
<64 y >4	Gravilla
<4 y >2	Grava granulada
<2 y >1	Arena muy gruesa
<1 y >0,5	Arena gruesa
<0,5 y >0,25	Arena media
<0,25 y >0,125	Arena fina
<0,125 y >0,063	Arena muy fina
<0,063	Limo

3.2. CONTENIDO TOTAL DE METALES

La determinación del contenido total de metales se basa en que los metales presentes en las partículas de sedimento se liberan al ser tratados con un ácido o mezcla de ácidos a temperatura próxima a la ebullición. Posteriormente, se puede cuantificar la concentración de los distintos metales en el extracto.

Para extraer a los de metales de las muestras se utilizó un método basado en el propuesto por el BCR [96]. Se pesaron 3 g de sedimento por muestra y se sometieron a una digestión con 28 ml de agua regia (ácido nítrico y clorhídrico concentrados, 1:3 en volumen) en reactores de tipo erlenmeyer de vidrio durante 16 h, de las cuales 2 h fueron a temperatura de ebullición, en un baño de arena con condensador de reflujo, que aseguraba que el vapor no escapaba y volvía al reactor. Una vez obtenido el extracto, se separó del sólido centrifugando 20 min a 3.000 g.

Es de señalar que en este ensayo todo el material de vidrio y polietileno utilizado se lavó cuidadosamente mediante inmersión en ácido nítrico 0,5 M caliente durante un mínimo de 6 h y, posteriormente, se enjuagó con agua.

El análisis de todos los metales se realizó mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA). Para Zn, Cu, Cd, Mn, Pb, Ni, Fe, y Cr se empleó la atomización con llama de aire-acetileno y corrector de fondo de deuterio (en las muestras con bajas concentraciones de algunos de estos metales la atomización fue mediante horno de grafito y corrector de fondo con efecto Zeeman). El Se y el As se analizaron por EAA con generación de hidruros y el Hg por EAA mediante la técnica de vapor frío.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con llama “Perkin-Elmer AAnalyst 200” con corrector de fondo de deuterio.
- Sistema de generación de hidruros “Perkin-Elmer MHS-10”.
- Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito “Perkin-Elmer 4110 ZL” con corrector de fondo con efecto Zeeman.



Figura 20. Equipo de EAA con llama.



Figura 21. Equipo de EAA con horno de grafito.

La validación del método del contenido total de metales y de las técnicas analíticas empleadas se llevó a cabo utilizando el sedimento de referencia BCR-701, certificado por

el BCR. Las concentraciones obtenidas para cada uno de los elementos analizados fueron muy similares a los valores certificados en el material de referencia, con porcentajes de recuperación superiores al 85%, lo que puede considerarse satisfactorio para este tipo de análisis [96].

3.3. BIODISPONIBILIDAD

En este Trabajo Fin de Grado se determinó la biodisponibilidad de los metales mediante la última versión del método de extracciones secuenciales de BCR [96]. Para ello se analizaron los metales de la primera fracción (soluble en ácido) por ser ésta la más débilmente unida a los sedimentos y, por tanto, la más biodisponibles y la que tiene una mayor relevancia ambiental.

Para extraer la fracción soluble en ácido (figura 22) se pesó 1 g de sedimento por muestra en tubos de centrifuga y se le añadieron 40 ml de ácido acético 0,11 M a cada tubo. A continuación, se extrajeron los metales de la suspensión de sedimento agitando magnéticamente (250 rpm) durante 16 h a temperatura ambiente. Tras la extracción, se separó la disolución del sedimento sólido centrifugando durante 20 min a 3.000 g.



Figura 22. Esquema de la extracción de la fracción soluble en ácido.

En la disolución se analizaron Zn, Cu, Cd, Mn, Pb, Ni, Fe y Cr con los mismos equipos y técnicas de análisis que las utilizadas para determinar el contenido total de metales (apartado 3.2 de este capítulo).

Al igual que en el caso del contenido total de metales, este método de extracción secuencial y las técnicas de análisis de metales se validaron utilizando el sedimento de

referencia BCR-701, certificado por el BCR. Los porcentajes de recuperación superaron el 85% en todos los elementos analizados, lo que puede considerarse satisfactorio para este tipo de análisis [96].

3.4. CARBONO ORGÁNICO TOTAL

La determinación del carbono orgánico total se basa en eliminar el carbono inorgánico del sedimento mediante un ataque ácido para, posteriormente, calentar la muestra a alta temperatura, oxidar la materia orgánica a CO₂ y medir el contenido de este gas.

En primer lugar se eliminó el carbono inorgánico de las muestras, para lo que se pesaron 40 mg de éstas, se les añadieron 0,5 ml de HCl 4 M y se calentaron en una placa calefactora hasta eliminar la disolución de HCl. Este paso se repitió hasta que al añadir HCl no se produjo burbujeo y, entonces, se secó el sedimento en la estufa.

Una vez eliminado el carbono inorgánico, se utilizó un equipo de análisis de carbono orgánico total Shimadzu TOC-V CSH, provisto de un sensor de infrarrojo no dispersivo y equipado con un módulo para muestras sólidas SSM-5000A. Este equipo calentó las muestras a 700 °C en un horno diseñado para muestras sólidas y oxidó la materia orgánica a CO₂. Posteriormente, el equipo midió el CO₂ gracias a un sensor de infrarrojos.



Figura 23. Equipo de análisis de carbono orgánico total

3.5. BIOENSAYO DE TOXICIDAD CON *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

El bioensayo de toxicidad con *Photobacterium phosphoreum* se fundamenta en poner las bacterias en contacto con las partículas del sedimento y, tras su separación mediante filtros, medir la reducción de la luminosidad como indicador de la toxicidad.

En primer lugar se pesaron 3 g de sedimento por muestra, se suspendieron en 30 ml de una disolución de NaCl al 2%, se ajustó el pH a 7,3 con una solución de sosa o de ácido clorhídrico y se agitó magnéticamente durante 10 min.

Seguidamente, se llevó a cabo un preensayo por cada muestra para determinar la concentración de sedimento a utilizar en el ensayo principal. En el preensayo se colocaron 7 tubos de ensayo en un baño de agua a $15 \pm 0,1$ °C. En 6 de ellos se adicionaron 1,5 ml de cloruro sódico al 2%, y en el séptimo 3 ml de suspensión del sedimento. A continuación, 3 de los tubos con cloruro sódico al 2% se dejaron como blancos y en los 3 restantes se hicieron disoluciones sucesivas del séptimo tubo (Figura 24). Para ello, se añadieron 1,5 ml de la suspensión del séptimo tubo al sexto, se agitó y se transfirieron 1,5 ml del sexto tubo al quinto, y de éste al cuarto.

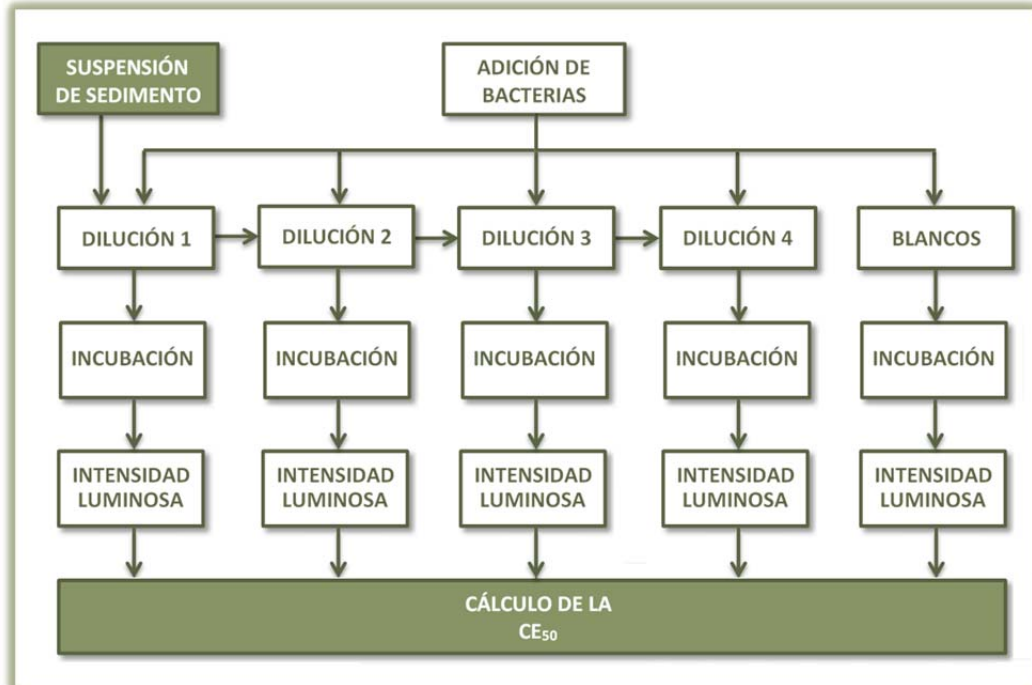


Figura 24. Esquema del preensayo de toxicidad.

Tras estabilizar la temperatura a $15 \pm 0,1$ °C durante 10 min, se añadieron 20 μ l de suspensión de bacterias, tanto a las cuatro diluciones de la muestra como a los tres blancos, en intervalos de 15 s y se mantuvo la incubación durante 30 min. Tras la incubación, se filtró el contenido de los tubos con unos filtros de columna especialmente diseñados para este ensayo. Se mantuvieron durante 5 min más y se midió la intensidad luminosa de los blancos y de las diluciones en el equipo de medida (Microtox M500), en intervalos de 15 s y en la misma secuencia de la adición de las bacterias.

Una vez realizado el preensayo, se calculó gamma mediante la siguiente ecuación:

$$\Gamma_i = \frac{I_0}{I_{ti}} - 1$$

Donde:

- Γ_i = gamma de la dilución i de la muestra de sedimento.
- I_0 = media de la intensidad de los tres blancos.
- I_{ti} = intensidad de la dilución i de la muestra de sedimento.

Seguidamente, se determinó la recta que ajusta los pares de puntos ($\log C$, $\log \Gamma$) mediante regresión lineal:

$$\log \Gamma = a(\log C) + b$$

Y, por último, se calculó la EC_{20} preliminar obteniendo la concentración en el punto en el que el $\log \Gamma=0$.

Conocida la EC_{50} se hizo el ensayo principal, en el que la metodología fue similar a la del preensayo, pero se utilizaron 15 tubos, 3 de ellos blancos, en lugar de solo 7. Además, las diluciones de la muestra se ajustaron al rango de concentraciones en el que se encontró la EC_{50} preliminar.

A continuación, se corrigió la absorción y dispersión de la luminosidad de la muestra por las partículas de sedimento, que disminuyen la llegada de luz al sensor, pero que no están relacionados con la toxicidad de la muestra. Para ello, se añadieron 20 μ l de ácido clorhídrico concentrado a las cubetas del ensayo anterior para eliminar la actividad remanente de las bacterias. Se añadieron 50 μ l de suspensión de bacterias a 1 ml de disolución de cloruro sódico 2% y, tras ajustar la temperatura a 15 °C durante 10 min, se mantuvo durante 15 min y se vertió en la cámara interior de una cubeta de doble compartimento, especialmente diseñada para este ensayo. Se introdujo la disolución de

cloruro sódico al 2% y a 15 °C en la cámara exterior de la citada cubeta. Se midió la luminosidad a intervalos de 1 min, hasta obtener variaciones constantes con el tiempo. Entre dos medidas consecutivas se cambió la disolución de cloruro sódico de la cámara exterior por una de las disoluciones a las que se le ha eliminado la actividad remanente. Se volvió a medir la luminosidad a intervalos de 1 min, hasta obtener variaciones constantes en el tiempo. El procedimiento se repitió para cada una de las diluciones.

Para determinar las intensidades corregidas se necesita conocer el salto de luminosidad producido al introducir la suspensión de sedimento en la cámara exterior. Para ello, en primer lugar se hizo una regresión lineal de los cambios en la luminosidad con respecto al tiempo, antes y después de cambiar la disolución exterior de la cubeta de doble compartimento. En segundo lugar se extrapolaron las rectas hasta el primer instante en el que se había determinado la luminosidad después de cambiar la disolución exterior. En este punto, se calculó el cociente entre las intensidades extrapoladas antes y después de añadir el sedimento.

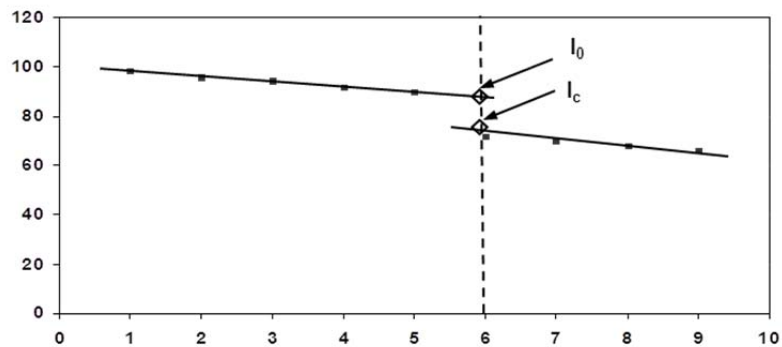


Figura 25. Esquema de los cambios de luminosidad en función del tiempo.

Una vez realizadas las extrapolaciones, se calculó la intensidad de cada dilución de muestra mediante la siguiente ecuación:

$$I_{t \text{ corre.}} = I_t \times \frac{I_0}{I_c}$$

Donde:

- $I_t \text{ corre.}$ = luminosidad corregida.
- I_t = luminosidad medida sin corregir.
- I_0 = intensidad extrapolada antes de adicionar la suspensión de sedimento.
- I_c = intensidad extrapolada después de adicionar la suspensión de sedimento.

Para finalizar el bioensayo de toxicidad, se calcularon la EC_{50} de la muestra (tal y como se hizo para el preensayo, pero sustituyendo las intensidades medidas por las corregidas) y las unidades de toxicidad por gramo, con la siguiente ecuación:

$$\frac{UT}{g} = \frac{1}{EC_{50}} \times 100$$

Donde EC_{50} es la concentración efectiva 50 expresado en % (100% = 100 mg/ml).

En la figura 26 se incluye un esquema general del ensayo de toxicidad realizado.

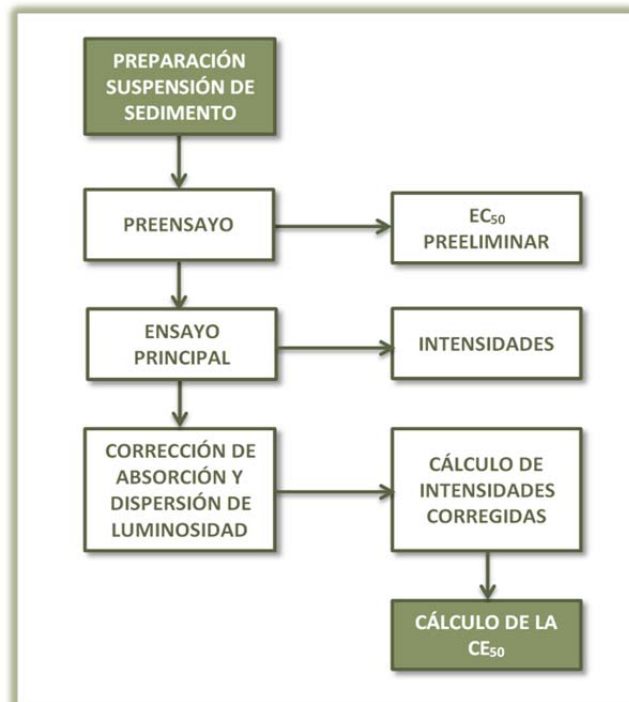


Figura 26. Esquema general del ensayo de toxicidad.

4. ANÁLISIS DE ORGANISMOS VIVOS (MACROBENTOS)

El análisis de organismos vivos se basa en identificar las especies de invertebrados macroscópicos que habitan en el bentos (macrobentos) para así conocer la diversidad de taxones presentes y evaluar la alteración de la comunidad macrobentónica comparando con el resultado de una zona próxima no contaminada.

El procedimiento de este ensayo es sencillo y consiste en separar los organismos del sustrato con la ayuda de una disolución de rosa de bengala y, a continuación, identificarlos y contarlos.

La identificación de los organismos se realizó a nivel de familias. Los niveles taxonómicos de mayor rango que el de especie se han popularizado rápidamente en los últimos años [219, 224 a 226]. Se ha observado que las variables ambientales tienen un efecto más confuso sobre especies aisladas, adaptadas a estrechos rangos de condiciones ambientales, que sobre un conjunto de ellas, como una familia u orden, por lo que las perturbaciones son más visibles.

De cada una de las muestras se anotó el número de familias y de individuos. Cuando el objetivo de un estudio es evaluar el estado ambiental de una zona en función de su incidencia en las comunidades biológicas, la magnitud a medir debe reflejar el grado de supervivencia de estas. La aparición de un determinado taxón es una muestra de ello, pero su abundancia se incrementa en función de su tolerancia al medio y/o capacidad reproductiva.

Para la interpretación de los datos de este Trabajo Fin de Grado se han empleado una serie de parámetros que permiten analizar la estructura de la comunidad y detectar las posibles alteraciones de la misma [227 y 228]. A continuación se describen brevemente estos parámetros.

- Riqueza específica (S): número de familias identificadas.
- Abundancia: número de individuos por metro cuadrado, incluyendo todas las familias.
- Porcentaje de los grupos más comunes: proporción sobre el total de los distintos grupos taxonómicos que se han considerado en este estudio: anélidos, crustáceos, moluscos y “otros”, que comprende a los taxones minoritarios. Se expresa como el porcentaje del número de individuos de cada grupo sobre la abundancia.
- Diversidad: La diversidad es una propiedad de la población que depende del número de familias y de sus abundancias. Para su medida existen varios índices que normalmente utilizan el número de familias y, en algunos casos, también el número de individuos de cada una de ellas. Entre éstos, los más usados son los de Shannon-Wiener para la diversidad y el índice de Pielou para la diversidad relativa, también denominada equitatividad.

El índice de Shannon-Wiener (H') se expresa como:

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

Donde p_i es la frecuencia relativa de la familia i , es decir, el cociente entre la abundancia

de la familia i y el número total de los individuos de una estación.

Este índice expresa la uniformidad de los valores y varía desde 0, cuando todos los individuos son de la misma familia, hasta valores crecientes a medida que los individuos se reparten entre un mayor número de éstas.

El índice de equidad de Pielou, J' , se define como el cociente entre la diversidad de una estación y la máxima diversidad que podría darse con S familias y N individuos totales. Se expresa como:

$$J' = H' / H'_{\text{Max}}$$

donde H'_{Max} se puede expresar como $\log_e S$.

Este índice puede tomar valores entre 0 y 1. Si presenta valores bajos indica que existe dominancia de una o varias especies. Por el contrario, alcanza el valor máximo de 1 cuando todas las familias son iguales de abundantes. Por lo tanto, este índice decrece a medida que aumenta el grado de estrés en el que se encuentra el ecosistema.

5. MÉTODO INTEGRADO

En el método integrado propuesto se emplean los resultados de los ensayos anteriormente discutidos: contenido total de metales, extracciones secuenciales, carbono orgánico total, bioensayo de toxicidad con *Photobacterium phosphoreum* y la estructura de la comunidad macrobentónica. Los tres primeros ensayos permiten conocer cuáles son los principales contaminantes de los sedimentos y en que concentraciones se encuentran, el bioensayo informa acerca de la toxicidad de los sedimentos y los estudios de alteración permiten comprobar "in situ" la respuesta del ecosistema (alteración de la comunidad bentónica) ante posibles contaminaciones de origen antrópico.

La integración de los resultados obtenidos en los métodos experimentales anteriores requiere de la generación de los índices de contaminación, que reúnen la información aportada por cada uno de los métodos, y el de degradación ambiental, calculado a partir de los índices anteriores.

5.1. GENERACIÓN DE LOS ÍNDICES DE CONTAMINACIÓN

Para obtener los índices del método integrado es necesario normalizar previamente los datos empleados, con respecto a la estación de referencia, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$VN_i = \frac{P_{iE}}{P_{iR}}$$

Donde:

- VN_i = Valor normalizado del parámetro i .
- P_{iE} = Parámetro i en la estación de muestreo E .
- P_{iR} = Parámetro i en la estación de referencia R .

De la definición de los valores normalizados se deduce que para la estación de referencia estos valores son siempre iguales a la unidad.

Con los resultados normalizados de los análisis, se calculan 5 índices, cada uno con los resultados de un ensayo: el de contaminación inorgánica (ICI) con el contenido total de metales, el de biodisponibilidad (IB) con las extracciones secuenciales, el de contaminación orgánica (ICO) con el carbono orgánico total, el de toxicidad (IT) con el bioensayo de toxicidad y el de alteración del macrobentos (IAM) con el análisis de organismos vivos.

Los índices citados se calculan en cada uno de los puntos de muestreo, como la media geométrica de los VN obtenidos en el análisis correspondiente, es decir, como la raíz n -ésima del producto del resultado o resultados obtenidos en los VN del análisis correspondiente, según la expresión:

$$X = \sqrt[n]{VN_1 \times VN_2 \times \dots \times VN_n}$$

Donde X se refiere a los índices ICI, IB, ICO, IT e IAM.

En los casos en los que el índice esté compuesto por un único resultado analítico (ICO, IT e IAM), el valor del índice y el de VN coincidirán. Por otra parte, en el punto de referencia los índices son iguales a la unidad.

5.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA Y CÁLCULO DEL ÍNDICE DE DEGRADACIÓN AMBIENTAL

La integración de los índices se realiza representando en un gráfico de cinco ejes (uno para cada índice). En la figura 27 se muestra un ejemplo de este tipo de gráficos en el que se ha representado de color amarillo el polígono (pentágono) de la estación de referencia (LC) y de color oro el polígono de la estación que se trate (en este caso la C3).

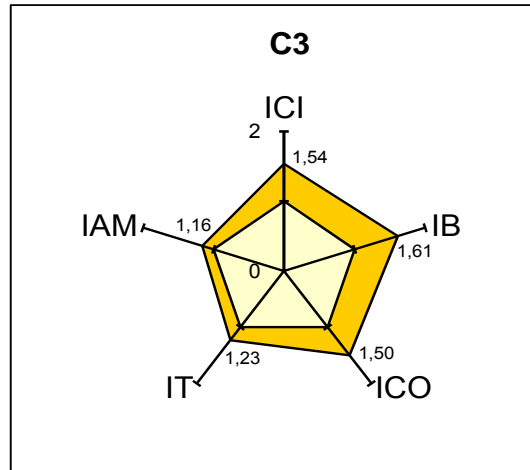


Figura 27. Ejemplo de representación conjunta de los cinco índices.

El índice de degradación ambiental (IDA) de cada punto se calcula como la media geométrica de los índices calculados en el apartado 5.1 de este capítulo.

$$IDA = \sqrt[5]{ICI \times IB \times ICO \times IT \times IAM}$$

El interés de este índice se debe a que generalmente cuando se comparan los datos analíticos de las dos estaciones de muestreo, o de una misma estación pero en dos periodos diferentes, no siempre ocurre que todos los valores de una sean superiores a los de la otra y por eso los resultados de la comparación no son todo lo claro que sería de desear. El índice propuesto permite, con un solo número, resumir las principales características de la calidad ambiental de los sedimentos, por lo que los resultados de la comparación utilizando este índice serán mucho más claros.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en el análisis de sedimentos (granulometría, contenido total de metales, biodisponibilidad, carbono orgánico total y toxicidad) y de organismos vivos en las bahías de Cádiz y Algeciras. Seguidamente, también se incluyen los resultados de aplicar un nuevo método integrado a los sedimentos estudiados.

2. ANÁLISIS DE SEDIMENTOS

2.1. GRANULOMETRÍA

En los resultados obtenidos (tabla 3) se aprecia un predominio de las arenas finas, ya que están presentes en los sedimentos de 5 de los 11 puntos de muestreo. Los siguientes tipos más abundantes son los de arena muy fina que aparece en el punto C2, situado en las proximidades de la desembocadura del río Guadalete y en C4, localizado en el saco interior de la bahía de Cádiz y las arenas medias que se presentan en los puntos C3 y A3. Es de señalar que en el punto C5, situado en la zona más interna de la bahía de Cádiz es donde se ha obtenido los sedimentos más finos (limos) de todas las muestras estudiadas.

En el punto A5 (localizado en la bahía de Algeciras) es donde se han obtenido los sedimentos con mayor tamaño de granos (tipo arena muy gruesa), aunque el componente grueso de estos sedimentos no es de arenas, sino restos biodetríticos, especialmente conchas y algas calcáreas.

Tabla 3. Composición granulométrica de las muestras según la escala Wentworth.

ZONA	MUESTRA	TIPO DE SEDIMENTO
Bahía de Cádiz	C1	Arena fina
	C2	Arena muy fina
	C3	Arena media
	C4	Arena muy fina
	C5	Limo
Litoral de Cádiz	LC	Arena fina
Bahía de Algeciras	A1	Arena fina
	A2	Arena fina
	A3	Arena media
	A4	Arena fina
	A5	Arena muy gruesa

2.2. CONTENIDO TOTAL DE METALES

En la **bahía de Cádiz** las concentraciones más elevadas para la mayoría de los metales estudiados se obtienen en los puntos C4 y C5 (ver figura 28). Estos puntos están situados en el saco interior de la bahía, que es un área de poco calado (con profundidades que no suelen alcanzar los 5 metros) con fondos de arena muy fina o de limo y con una baja renovación de las aguas, lo que favorece la acumulación de contaminantes vertidos a la bahía por las factorías industriales, los núcleos de población cercanos, el tráfico marítimo, etc. En el punto C5, situado en la zona más interna del saco interior de la bahía, es donde se alcanzan las máximas concentraciones de la bahía de Zn, Pb, Ni, Cr, Cu y As y en el otro punto del saco interior de la bahía, el C4, se obtienen la mayores concentraciones de Hg y de Fe, aunque para este último metal las diferencias de concentraciones entre las muestras tomadas en las zonas interior y exterior de la bahía son poco acusadas. También se observan escasas diferencias entre las muestras tomadas en la bahía para Cd y Mn.

La zona exterior de la bahía de Cádiz es más profunda que la interior y tiene una mayor renovación de sus aguas, lo que favorece la dispersión de los vertidos contaminantes y provoca que las muestras tomadas en esta zona (C1 a C3) tengan unas concentraciones de metales semejantes o ligeramente superiores a la muestra LC, tomada como referencia por estar situada fuera de las dos bahías y lejos de vertidos contaminante. En esta zona destaca la muestra C1 (tomada en la zona más exterior de la bahía) por ser la que presenta las menores concentraciones para la mayoría de los metales estudiados. Por el contrario, en la muestra C2 (tomada en las proximidades de la desembocadura del río Guadalete) es donde se alcanzan las mayores concentraciones (de la zona exterior de la bahía) de Zn, Cu, Pb Cd, As y Mn, para este último metal se obtiene la mayor concentración de toda la bahía de Cádiz.

En la **bahía de Algeciras** se alcanzan los mayores niveles de Cu, Zn, Pb, As y Mn en el punto A2, localizado cerca de la ciudad de Algeciras, que es el mayor núcleo de población de la bahía y con un gran puerto (el de mayor tráfico total de mercancías de España). Las máximas concentraciones de Ni, Cr, Fe, Cd y Hg se obtienen en el punto A4, situado en la zona donde se concentra la mayor parte de la actividad industrial de la bahía. Por el contrario, el punto A1, situado en la zona más exterior de la bahía y alejado del área industrial y de los núcleos de población, es el que presenta las menores concentraciones de Zn, Cu, Pb, As, Fe, Cr, Ni y Hg. También se alcanzan bajas concentraciones, para la mayoría de los metales estudiados en el punto A3, situado en el interior de la bahía, pero alejada del área industrial y de los principales núcleos de población.

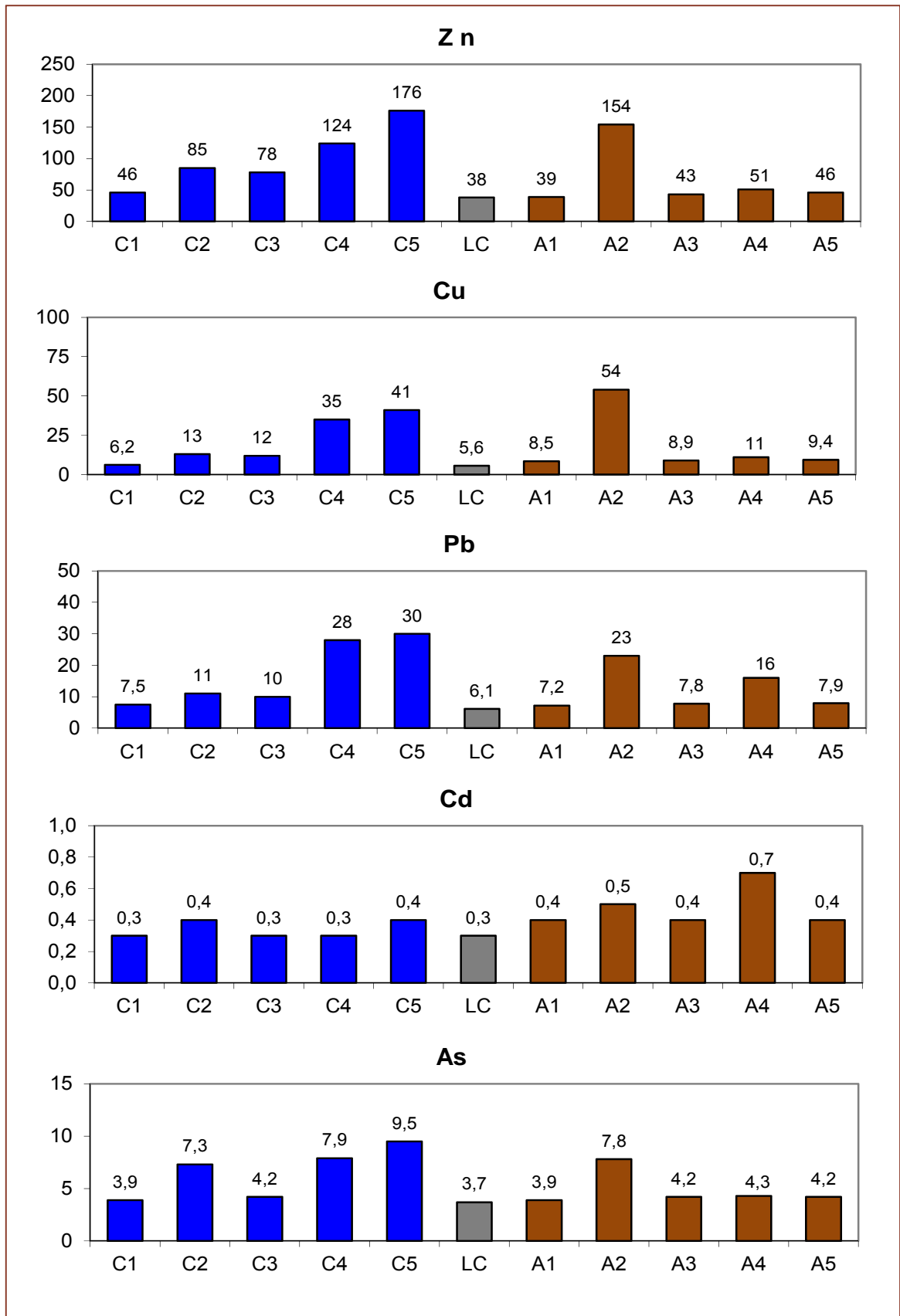


Figura 28. Evolución de las concentraciones totales de metales (mg/kg sedimento seco).

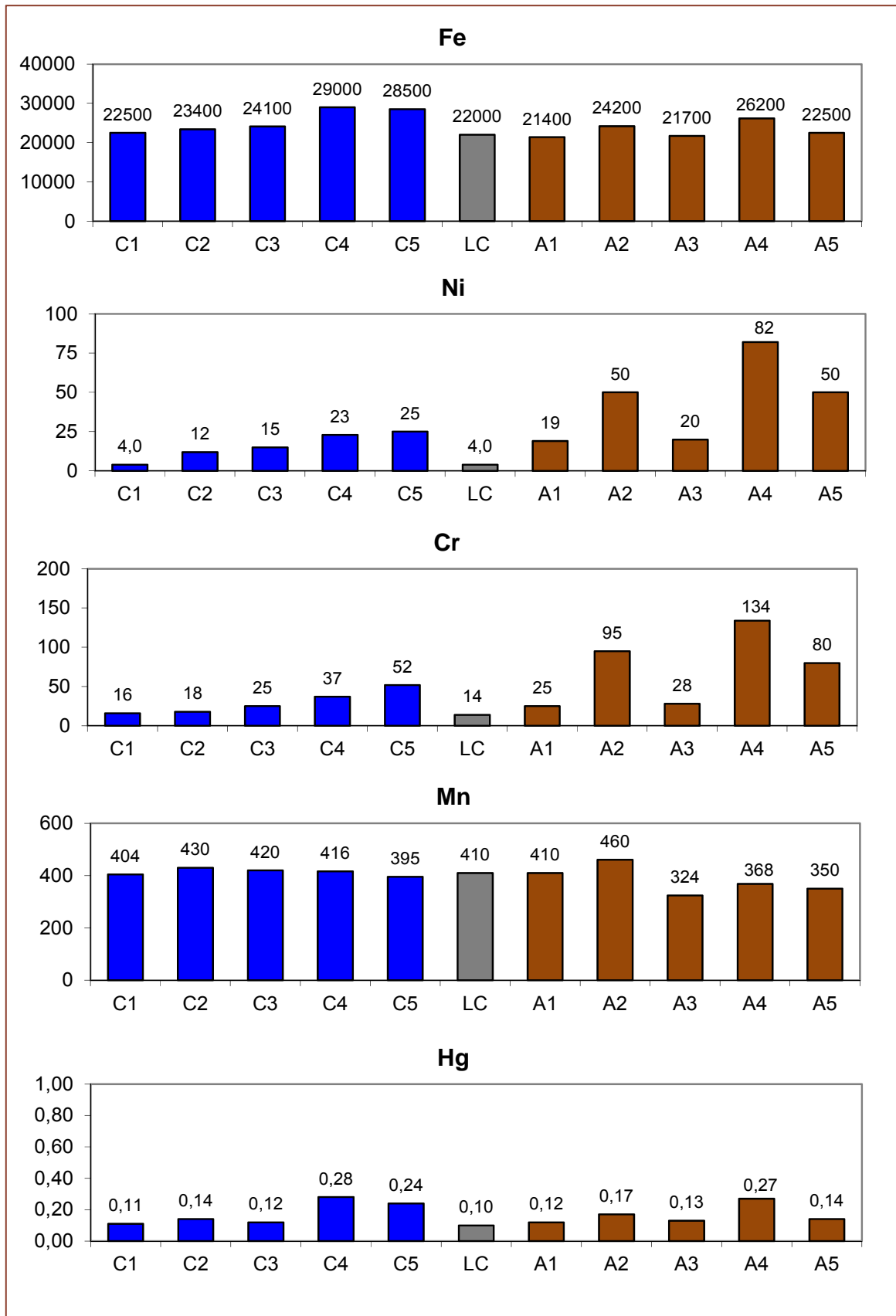


Figura 28. Continuación.

A efectos comparativos, en la tabla 4 se incluyen los criterios de calidad para los sedimentos propuestos por Long et al. [229], basado en el potencial de inducir efectos tóxicos en los organismos marinos, para lo que han definido dos valores: ERB (Efectos de Rango Bajo) y ERM (Efectos de Rango Medio). Los Valores de ERB indican concentraciones por debajo de las cuales rara vez se producen efectos adversos, y los valores de ERM representan concentraciones por encima de las que con frecuencia se producen efectos adversos.

Tabla 4. Criterios de calidad de concentración de metales en sedimentos.

METAL	Long]		ESPAÑA (CEDEX)]	
	ERB ¹	ERM ²	NIVEL 1 ³	NIVEL 2 ⁴
Zn	150	410	500	3.000
Cu	34	270	100	400
Cd	1,2	9,6	1,0	5,0
Pb	46,7	218	120	600
Fe	-	-	-	-
As	8,2	70	80	200
Se	-	-	-	-
Hg	0,15	0,71	0,6	3,0
Mn	-	-	-	-
Ni	20,9	51,6	100	400
Cr	81	370	200	1.000

¹ ERB: Efecto de Rango Bajo. ² ERM: Efecto de Rango Medio.
³ Nivel 1: Nivel de acción 1. ⁴ Nivel 2: Nivel de acción.

En la zona más interna de la bahía de Cádiz (puntos C4 y C5) se superan los valores ERB para Ni, Cu y Hg, y en el punto C5 (el más interno de la bahía) también se sobrepasan los valores de ERB para Zn y As. Por el contrario, en esta bahía no se superan los valores de ERM por ninguno de los metales analizados.

En la bahía de Algeciras destaca el punto A2 (próximo a la población de Algeciras) por superar los ERB para Zn, Ni, Cr, Cu y Hg. También destaca el punto A4 (situado en la zona con mayor actividad industrial) por sobrepasar el ERB para Cr y sobre todo por superar el ERM (concentración por encima de la que con frecuencia se producen efectos adversos sobre los organismos marinos) para Ni. Es de señalar que en este punto (A4) se alcanzan las máximas concentraciones de todas las zonas estudiadas de Ni, Cr y Cd.

En el punto LC (tomado como referencia por estar situado fuera de las bahías y lejos de las fuentes de contaminación) no se supera ninguno de los valores ERB. En este punto se obtienen las menores concentraciones de Zn, Cu, Pb, As, Cr y Hg de todas las zonas estudiadas.

En la tabla 4 también se incluyen las recomendaciones del Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX) para la gestión de material dragado en los puertos españoles [230], muy utilizadas por los investigadores españoles en los trabajos sobre sedimentos. En ninguna de las muestras analizadas (en las dos bahías y LC) se superan los valores recomendados por el CEDEX para el nivel de acción 1, lo que indica que estos sedimentos podrían ser vertidos en el mar sin tener que tomar precauciones especiales.

2.3. BIODISPONIBILIDAD

El Mn es el elemento que se extrae en un mayor porcentaje en la fracción soluble en ácido (figura 29), con valores en torno al 30% para las tres zonas estudiadas (bahías de Cádiz y Algeciras y litoral de Cádiz), lo que indica que es el metal que tiene la mayor movilidad (es el que está más débilmente unido a los sedimentos), por lo que previsiblemente será el más biodisponible. Estos altos porcentajes de Mn en la fracción soluble en ácido probablemente sean debido a la estrecha asociación de este metal con los carbonatos de los sedimentos [231]. En otros estudios sobre sedimentos marinos [232 a 234] también se encontraron altos porcentajes de Mn en la fracción soluble en ácido.

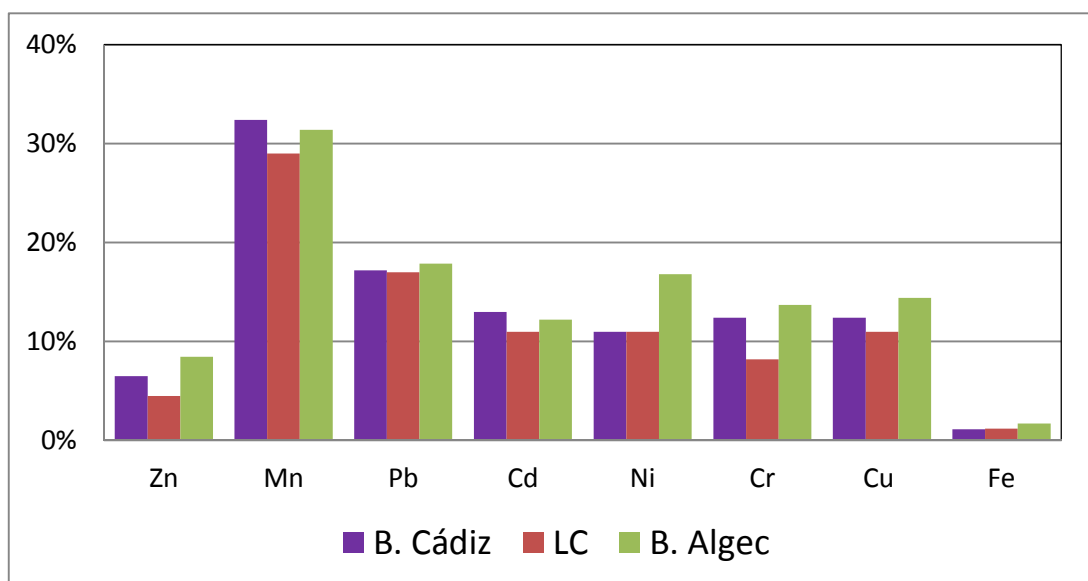


Figura 29. Porcentajes medios extraídos en la fracción soluble en ácido de BCR.

El Fe es el metal que tiene la menor movilidad (sólo se extrae en la fracción soluble en ácido en poco más del 1% en las tres zonas estudiadas), probablemente debido a que es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre y su presencia en los sedimentos tiene fundamentalmente un origen natural. Lo que coincide con lo publicado por Morillo et al. [235] y Rosado [236] quienes encontraron que la mayoría del Fe en los sedimentos está en forma de óxidos cristalinos (goetita, limonita, magnetita, etc.) fuertemente unidos a los sedimentos.

El Zn es el segundo metal que menos se extrae en la fracción soluble en ácido (con porcentajes inferiores al 9%). Lo que está de acuerdo con lo obtenido en otros estudios [237 a 239] en los que se encontró que la mayor parte del Zn está presente en los sedimentos en la fracción reducible (segunda fase del BCR).

En la muestra tomada en LC se obtiene, para la mayoría de los metales estudiados, las menores movilidades, posiblemente debido a que es la muestra con los más bajos niveles de contaminación, por lo que los metales presente en los sedimento son fundamentalmente de origen natural, que generalmente están más fuertemente unidos a los sedimentos que los de origen antropogénico [236]. Por el contrario, en la bahía de Algeciras se alcanzan los mayores porcentajes medios en la fracción soluble en ácido para Ni, Cr, Cu y Zn.

Los metales estudiados se pueden ordenar según su biodisponibilidad de la siguiente manera:

Mn>Pb>Cd>Cu=Cr>Ni>Zn>Fe (bahía de Cádiz)

Mn>Pb>Cd>Cu=Ni>Cr>Zn>Fe (litoral de Cádiz)

Mn>Pb=Ni>Cr=Cu>Cd>Zn>Fe (bahía de Algeciras)

2.4. CARBONO ORGÁNICO TOTAL

Las mayores concentraciones de COT en la bahía de Cádiz (ver figura 30) se alcanzan en los puntos C4 y C5, ambos situados en el saco interior de la bahía, que es una zona de poco calado y con una baja renovación de las aguas, lo que favorece la acumulación de contaminantes vertidos desde los núcleos de población cercanos a la bahía (San Fernando, Puerto Real, Puerto de Santa María y Cádiz). Los valores de COT alcanzados en estos puntos (6,5% en C5 y 5,3% en C4) son los más elevados de todas las zonas estudiadas y son notablemente superiores a los publicados por Seiter et al. [240], quienes obtuvieron el valor de 1,5% para la mediana de COT en los sedimentos de las costas de todo el mundo.

El siguiente punto de la bahía de Cádiz con el mayor valor de COT es el C2 (3,9%), que está situado en las proximidades de la desembocadura del río Guadalete y de la población del Puerto de Santa María.

En la bahía de Algeciras se obtienen los mayores valores de COT en los puntos A2 (situado en las proximidades de Algeciras, que es el mayor núcleo de población de la zona), seguido del A4 (localizado en un área donde se concentra la mayor actividad industrial de la bahía).

Por el contrario, los menores concentraciones de COT en los sedimentos se alcanzan en el punto LC (tomado como referencia por estar localizado fuera de las dos bahías y lejos de vertidos contaminantes), en los puntos situados en las zonas más externas de las bahías (C1 en la de Cádiz y A1 en la de Algeciras) y en los puntos más alejados de los vertidos (C3 en bahía de Cádiz y A3 en la de Algeciras) En estos puntos se obtienen niveles de COT similares al valor de 1,5%, anteriormente citado, encontrado por Seiter et al. [240] para la mediana de COT en los sedimentos de las costas de todo el mundo.

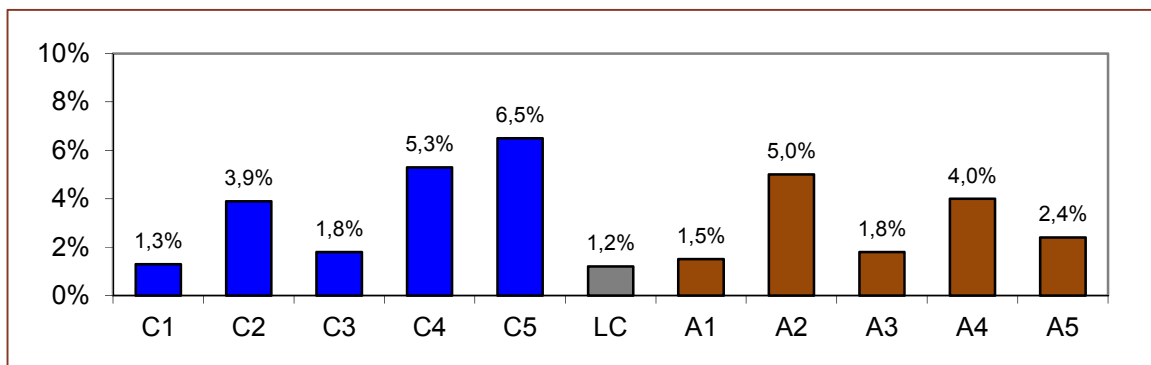


Figura 30. Porcentajes de carbono orgánico total.

2.5. BIOENSAYO DE TOXICIDAD CON *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

Los valores más bajos de toxicidad (ver figura 31) se encuentra en el punto LC (39 UT/g), y en los situados en las zonas más externas de las bahías C1 (42 UT/g) y A1 (43 UT/g). Estos valores son similares a los obtenidos en el litoral de Huelva (valor medio 35 UT/g) [163].

Las muestras de sedimentos con los mayores niveles de toxicidad en la bahía de Cádiz, son las tomadas en el saco interno C5 (240 UT/g) y C4 (120 UT/g) y la localizada en el entorno de la desembocadura del río Guadalete C2 (90 UT/g). En la bahía de Algeciras

se alcanzan los mayores niveles de toxicidad en los puntos A2 (210 UT/g), situado en las proximidades de la población de Algeciras, y A4 (170 UT/g), localizado en la zona con la mayor actividad industrial de la bahía. Estos valores son semejantes a los encontrados por Martínez-Llado [242] en los sedimentos del Puerto de Barcelona (valor medio 240 UT/g).

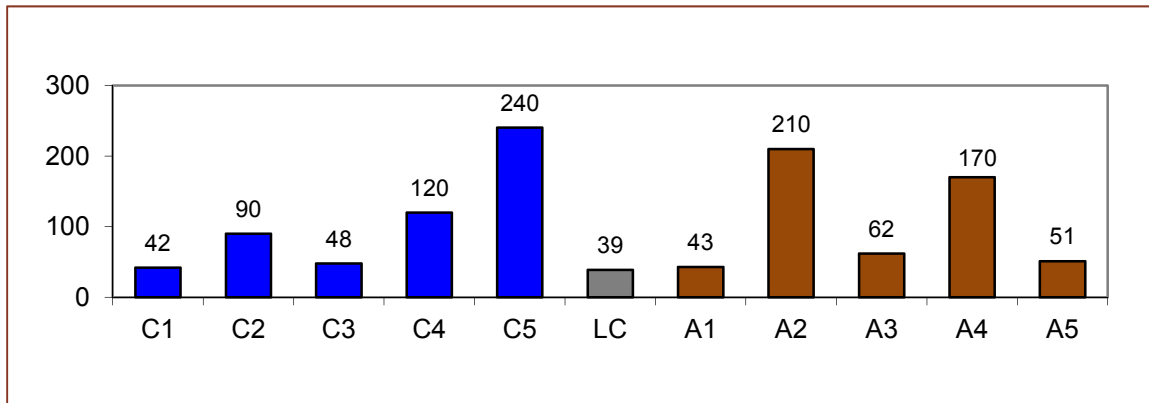


Figura 31. Toxicidad de las muestras (UT/g).

Al comparar los resultados obtenidos con los criterios de calidad de toxicidad en sedimentos establecidos por el Ministerio de Medio Ambiente de Canadá [243] (que define un sedimento como tóxicos cuando su toxicidad es mayor de 100 UT/g), o con los propuestos por diversos investigadores españoles [243 a 245] (quienes aumentan el umbral de toxicidad a 133 UT/g), se obtiene que las muestras C5, A2 y A4 son tóxicas y el resto no tóxicas, excepto la muestra C4, que es tóxica de acuerdo con el criterio del Ministerio de Medio Ambiente de Canadá y no tóxica según el criterio de los investigadores españoles.

3. ANÁLISIS DE ORGANISMOS VIVOS (MACROBENTOS)

En el análisis de organismos vivos (macrobenetos) en los sedimentos se han identificado un total de 11 grupos taxonómicos (o "filos"), de los cuales tres están ampliamente representados: crustáceos (32 familias), moluscos (28 familias) y anélidos (25 familias). En menor medida están presentes los equinodermos (3 familias) y los cnidarios (2 familias) y otros 6 filos con solo una familia cada uno (nemertinos, foronídeos, acránidos, sipunculidos, tunicados y turbellarios).

En la Figura 32 se representa el porcentaje de individuos pertenecientes a cada filo. Con objeto de simplificar la gráfica, sólo se han representado cuatro grupos: anélidos, crustáceos, moluscos, y "otros", que congrega a los filos minoritarios.

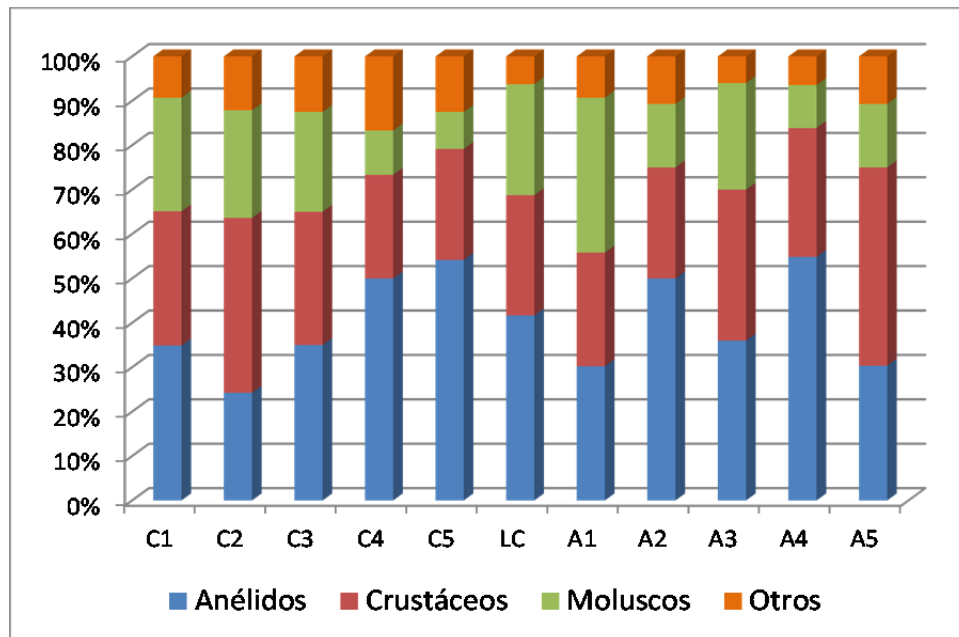


Figura 32. Distribución del porcentaje de familias pertenecientes a los principales filos.

El filo dominante corresponde a los anélidos, que alcanza los mayores porcentajes de familias en todas las muestras, a excepción de las tomadas en los puntos C2 (situado en bahía de Cádiz) y A5 (localizado en la bahía de Algeciras) donde el filo más abundante es el de los crustáceos. El grupo de los anélidos está únicamente representado por la clase poliquetos. En esta clase las familias que están presentes con un mayor número de individuos son: Spionidae, Capitellidae y Syllidae. Estas familias están formadas por especies oportunistas o colonizadores primarios, que aprovechan cualquier alteración del medio para ocupar un nicho ecológico extenso.

Tras los anélidos, el filo más numeroso es el de los crustáceos (con porcentajes de familias entre el 23% y el 45%). Entre los crustáceos la clase de los anfípodos es la más ampliamente representada (con 15 familias) y las familias con un mayor número de individuos son: Apseudidae, Corophiidae y Haustoridae.

El siguiente filo mayoritario es el de los moluscos, que alcanza entre el 8% y el 35% del total de familias. Es de destacar que en la muestra tomada en el punto A1 (situado en la zona más externa de la bahía de Algeciras) se alcanza un mayor porcentaje de moluscos (35%) que de ningún otro filo.

El último grupo es el denominado "otros" constituido por ocho filos y que representan entre el 6% y el 17% de todas las familias encontradas en este Trabajo Fin de Grado.

En relación con los parámetros que indican la posible alteración de la comunidad, en este trabajo se han empleado la riqueza específica, la abundancia y los índices de diversidad y equitatividad (ver apartado 4 del capítulo IV).

La evolución espacial de la **riqueza específica** (número de familias) se representa en la figura 33. En general, se observa que en los puntos situados en las zonas con los mayores niveles de contaminación se encuentran los menores números de familias, como ocurre, por ejemplo, en los puntos A2, A4, C4 y C5. En este último punto se alcanza un valor especialmente bajo, sin duda debido a que en él se obtienen los mayores niveles de Zn, Pb, As y toxicidad de todas las zonas estudiadas y a que los sedimentos de este punto tienen una granulometría muy fina (limo) y, como es sabido, los sedimentos muy finos dejan pocos huecos para que se desarrollen y vivan los macroinvertebrados, por lo que, en general, en este tipo de sedimentos hay una escasa riqueza específica [236]. Este fenómeno de bajo número de familias en muestras con sedimentos finos también se presenta en los puntos C2 y C4 (arena muy fina en ambos casos), aunque no es tan acusado como es C5 (limo).

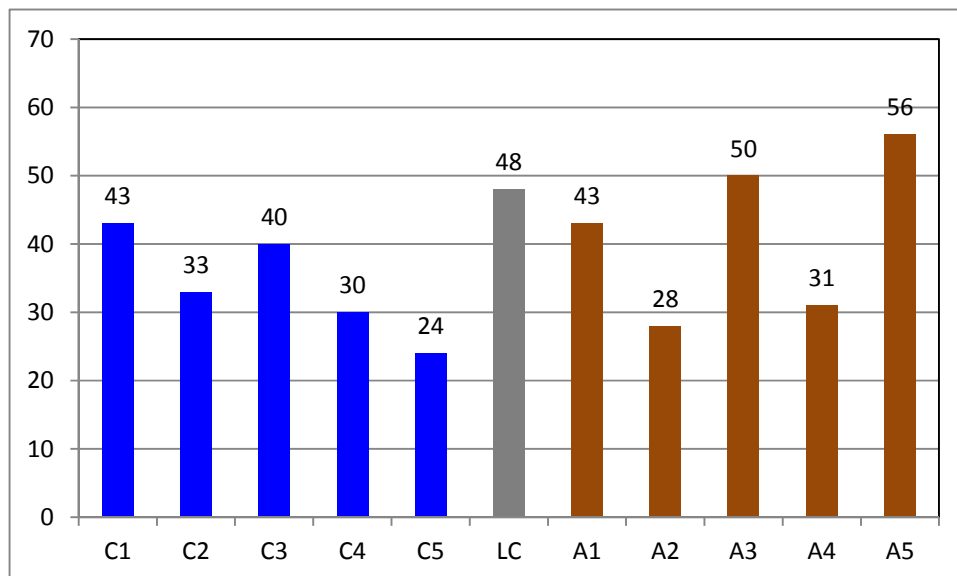


Figura 33. Distribución del número de familias en cada punto de muestreo.

Los mayores números de familias se alcanzan en las muestras tomadas los puntos situados en las zonas más externas de las bahías (LC, C1 y A1). Como excepción se puede citar a la muestra A5 (en la que se obtiene el mayor número de familias de todas las zonas estudiadas). Este hecho se puede explicar si se tiene en cuenta que en A5 se

han obtenido unos niveles de contaminación relativamente bajos y, sobre todo, porque los sedimentos de esta muestra son los que tienen el mayor tamaño de grano (tipo arena muy gruesa) de todas las zonas estudiadas y un tamaño de grano grande favorece el desarrollo de una variada fauna macrobentónica. Por estos motivos también se alcanzan elevados números de familias en las muestras C3 y A3, que son las que siguen a la A5 con los mayores tamaños de grano (arenas medias en ambos casos).

En la figura 34 se representa la **abundancia**, número de individuos por m^2 , en los distintos puntos de muestreo. Se observa que tiene una evolución similar a la del número de familias antes comentada e igualmente ocurre con los índices de diversidad de Shannon-Wiener y de equitatividad de Pielou (ver anexo 3).

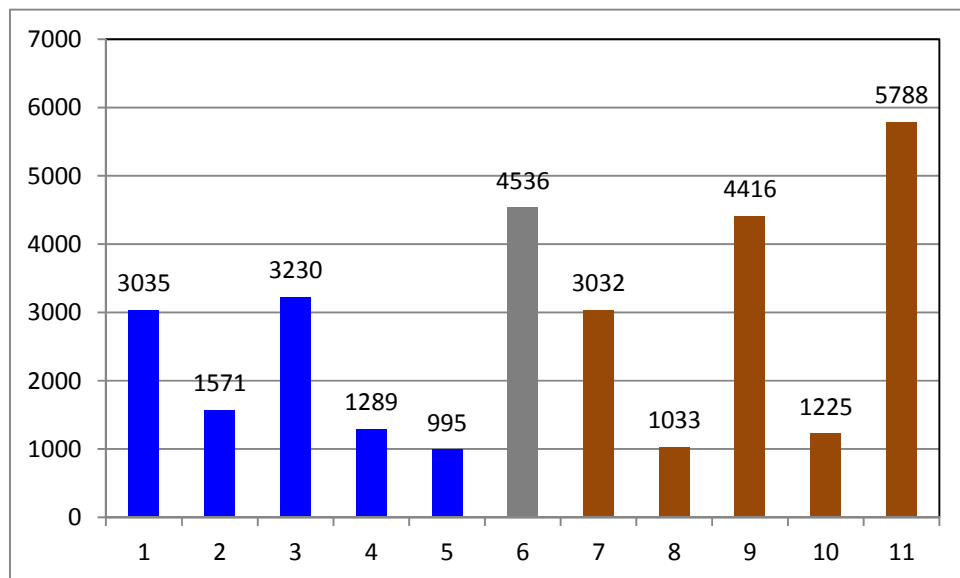


Figura 34. Evolución de la abundancia (número de individuos/ m^2).

4. MÉTODO INTEGRADO

En la figura 35 se muestran los valores obtenidos para los índices de contaminación inorgánica (ICI), biodisponibilidad (IB), contaminación orgánica (ICO), toxicidad (IT) y alteración del macrobentos (IAM). Todos ellos se han calculado según el método descrito en el apartado 5.1 del Capítulo IV.

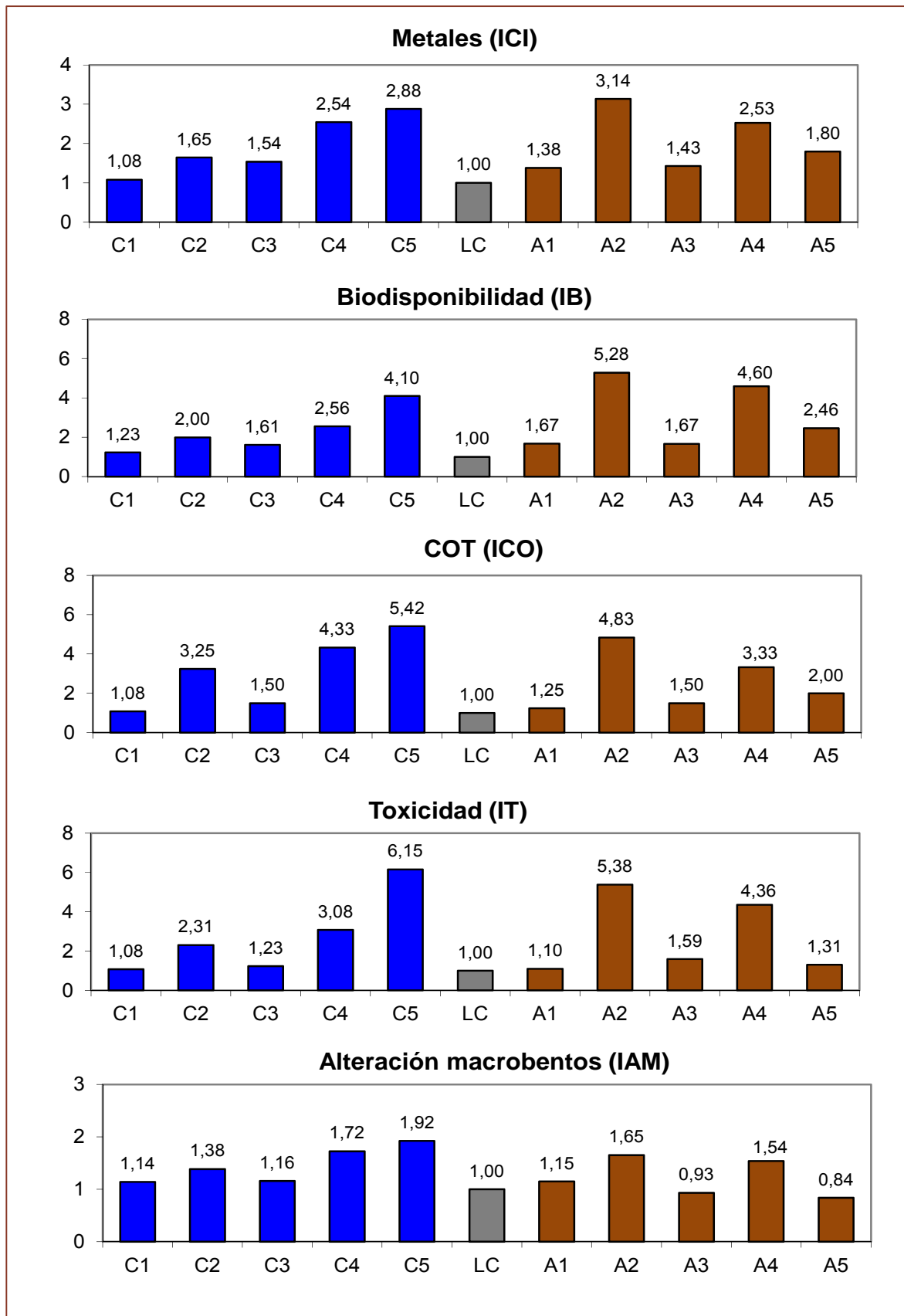


Figura 35. Representación de los índices de contaminación.

En la figura 35 se observa que los cuatro primeros índices (ICI, IB, ICO e IT) tienen un comportamiento similar, caracterizado por lo siguiente:

- Los máximos valores de estos índices en la bahía de Cádiz generalmente se alcanzan en los puntos de muestreo localizados en la zona más interna de la bahía (C4 y C5), seguidos del punto C2 (situado en las proximidades de la desembocadura del río Guadiana).
- En la bahía de Algeciras se obtienen los mayores índices en la muestra A2, localizada en el entorno de la ciudad de Algeciras (el más importante núcleo de población de todas las zonas estudiadas).
- Los menores valores de los índices se presentan en los puntos de muestreos situados en las zonas más externas de las bahías (C1, A1 y LC). Es de destacar que en este último punto se han obtenido los menores valores para los cuatro índices (lo que indica que la elección de este punto como de referencia ha sido correcta).

El índice de alteración del macrobentos (IAM) tiene un comportamiento algo diferente, ya que ya que los menores valores no se alcanzan en el punto LC (1,00), sino en A5 (0,84). Este hecho se puede explicar si se tiene en cuenta que en A5 se han obtenido unos niveles de contaminación bajos y, sobre todo, porque los sedimentos de esta muestra son los que tienen el mayor tamaño de grano (arena muy gruesa) de todas las zonas estudiadas y, como ya se ha indicado, un tamaño de grano grande favorece el desarrollo de una fauna macrobentónica variada. En la muestra A3, que también tiene un tamaño de grano relativamente grande, aunque menor (arena media), se alcanza, igualmente, un IAM (0,93) inferior al del punto LC.

Los gráficos de las figuras 36 y 37 se representan conjuntamente los cinco índices, lo que permiten tener una visión global de la calidad ambiental de los sedimentos en los diferentes puntos de muestreo.

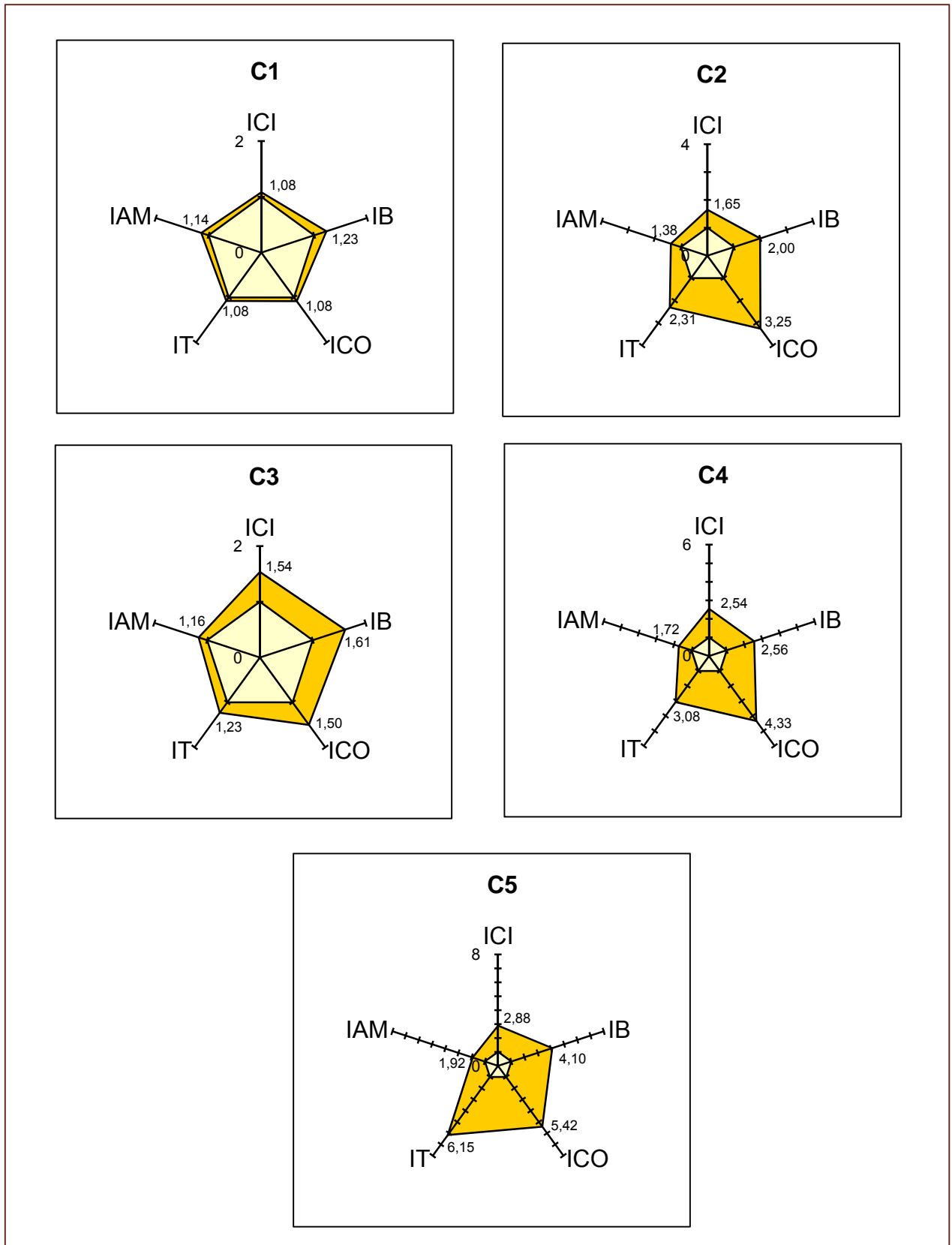


Figura 36. Representación conjunta de los 5 índices de las muestras de bahía de Cádiz.

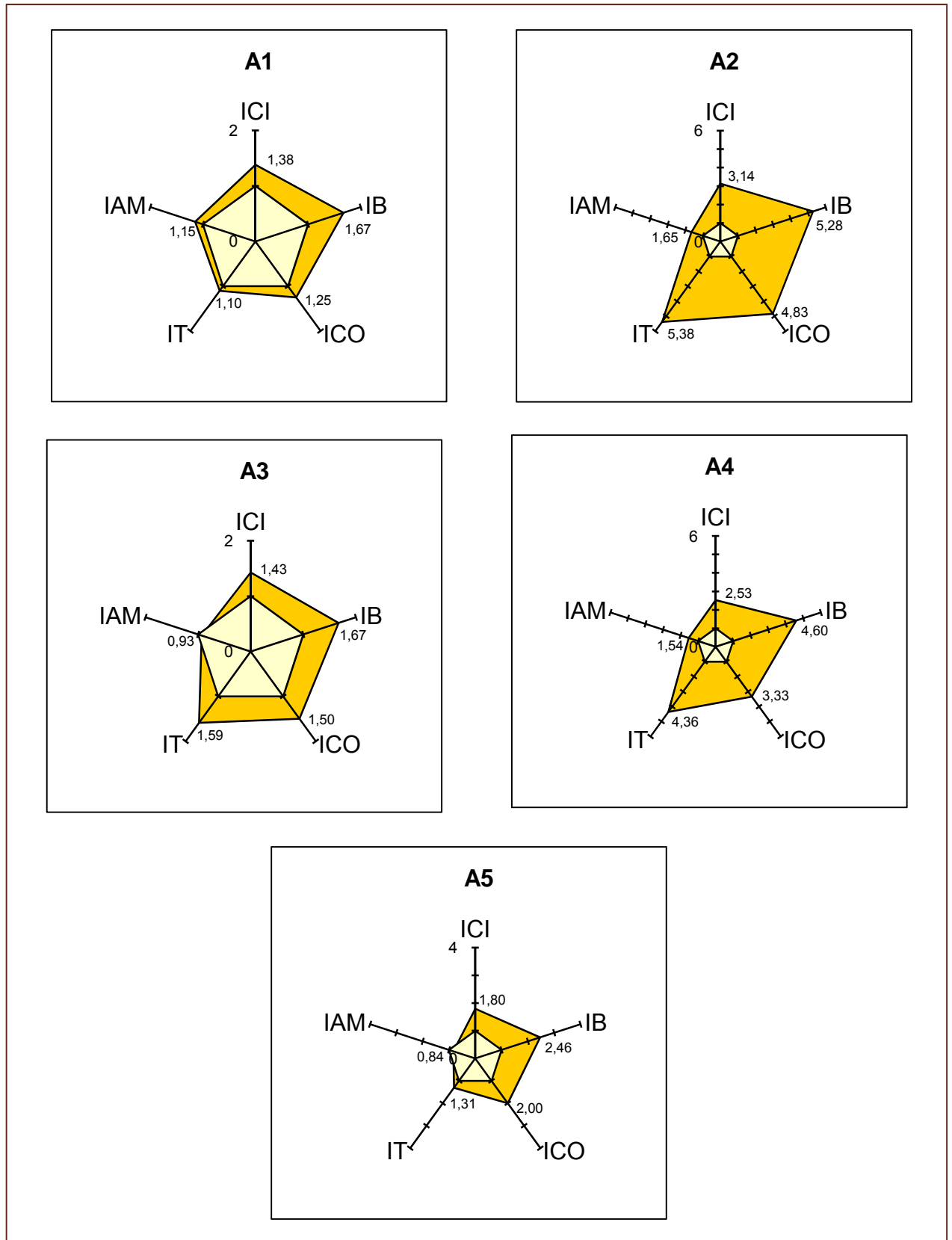


Figura 37. Representación conjunta de los 5 índices de las muestras de bahía de Algeciras.

Los puntos de muestreo C1 y A1 están situados en las zonas más externas de las bahías y alejados de las principales fuentes de contaminación, por lo que tienen unos gráficos característicos de zonas con una escasa degradación ambiental y presentan valores bajos para todos los índices, obsérvese que los polígonos que unen los índices son sólo ligeramente mayores que los correspondientes a la estación de referencia (dibujada en el gráfico de color amarillo).

Las muestras tomadas en los puntos C3 y A3 tienen unos gráficos similares, caracterizados por presentar unos índices relativamente bajos, especialmente el índice de alteración del macrobentos (IAM). Estas muestras de sedimentos se caracterizan por tener un tamaño de grano relativamente grande (arena media), lo que deja huecos que facilitan que se desarrollen y vivan en ellos los macroinvertebrados bentónicos. El gráfico correspondiente a la muestra tomada en el punto A5 también presenta un IAM bajo (el menor de todas las muestras), sin duda debido a que está formada por sedimentos con un tamaño grande de grano (arena muy gruesa), que es el mayor tamaño encontrado en todas las muestras.

Los mayores índices de contaminación (especialmente ICO e IT) se presentan en los puntos C4 y C5 (situados en el saco más interno de la bahía de Cádiz), en A2 (localizado en las proximidades de Algeciras, que es mayor núcleo de población de todas las zonas estudiadas) y en A4 (ubicado en la zona con mayor actividad industrial de la bahía de Algeciras).

En este Trabajo Fin de Grado también se ha obtenido un índice global, el de degradación ambiental o IDA (en el apartado 5.2 del capítulo IV se define este índice), que permite resumir en un solo número las principales características de la calidad ambiental en los distintos puntos de toma de muestra, de manera que este índice facilita la comparación de la calidad ambiental entre dos o más de estos puntos, o entre diferentes muestreos, así por ejemplo, en la figura 38 se observa que los puntos con la mayor degradación ambiental son, por este orden:

C5>A2>A4>C4>C2>A5>C3=A3>A1>C1>LC

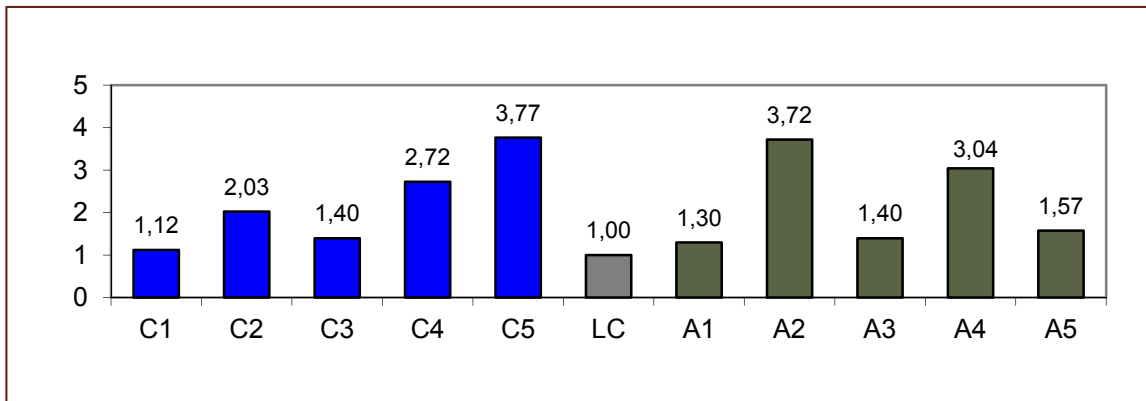


Figura 38. Evolución del índice de degradación ambiental (IDA).

En función de los índices de degradación ambiental se pueden clasificar a los puntos de muestreo en los grupos siguientes:

- Con baja degradación ($IDA < 2,5$): este grupo está formado los puntos situados en las zonas más externas de las bahías (C1, C2, C3, LC, A1, A3 y A5)
- Con degradación moderada ($IDA \geq 2,5$): este grupo está integrado por los puntos situados en el saco más interno de la bahía de Cádiz (C4 y C5), en las proximidades de la ciudad de Algeciras (A2) y en la zona con mayor actividad industrial de la bahía de Algeciras.

Los intervalos del IDA propuestos para clasificar el grado de degradación podrán irse modificando a medida que vaya aumentando el número de estudios en los que se aplique este índice y se disponga de una mayor variedad de datos.

De lo anteriormente comentado se deduce que los gráficos con cinco ejes, donde se representan conjuntamente los índices de contaminación, toxicidad y alteración del macrobento, suministran una información muy completa sobre la calidad ambiental y que, además, el índice de degradación ambiental (IDA) facilita la comparación de esta calidad entre dos o más puntos de toma de muestra o entre muestreos, de manera que se puede afirmar que el IDA complementa la información de los gráficos anteriores. Por todo ello se propone incluir en estos gráficos a los valores de los IDA, con lo que se tendrá una información aún más completa y de fácil visualización. En la figura 39 se muestra, a título de ejemplo, como serían este tipo de gráficas para los puntos C1 y C5.

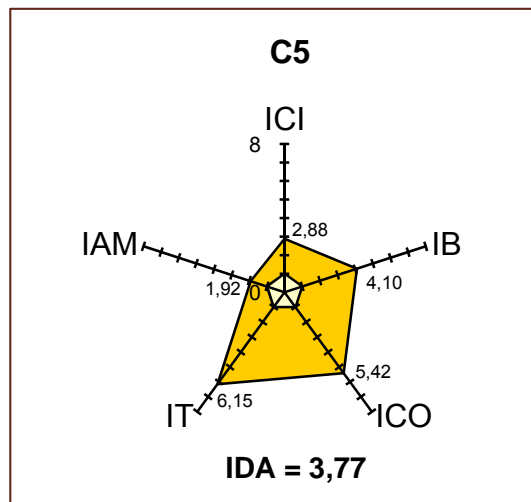
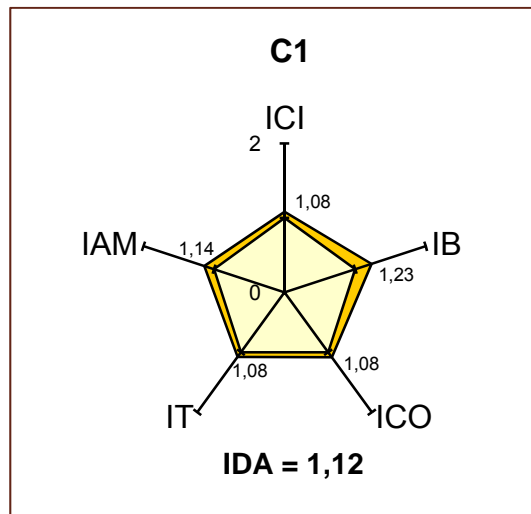


Figura 39. Ejemplo de gráficas propuestas para evaluación de la calidad ambiental.

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas EN ESTE Trabajo Fin de Grado, son las siguientes:

1. Granulometría:

- En los sedimentos de las bahías de Cádiz y Algeciras predominan las arenas finas, ya que están presentes en los sedimentos de 5 de los 11 puntos de muestreo. Los siguientes tipos más abundantes son los de arena muy fina y arena media, que aparecen en 2 puntos cada uno.

2. Contenido total de metales:

- En la bahía de Cádiz las concentraciones más elevadas para la mayoría de los metales estudiados, se obtienen en los puntos C4 y C5. Estos puntos están situados en el saco interior de la bahía, que es un área de poco calado y con una baja renovación de las aguas, lo que favorece la acumulación de contaminantes. En estas estaciones se superan los valores de ERB (Efectos de Rango Bajo) para Ni, Cu y Hg.

- En la bahía de Algeciras se alcanzan los mayores niveles de Cu, Zn, Pb, As y Mn en el punto A2, localizado cerca de la ciudad de Algeciras, que es el mayor núcleo de población de la zona. En este punto se superan los ERB para Zn, Ni, Cr, Cu y Hg. Las máximas concentraciones de Ni, Cr, Fe, Cd y Hg en esta bahía se obtienen en el punto A4, situado en la zona donde se concentra la mayor parte de la actividad industrial. En A4 se sobrepasa el ERB para Cr y el ERM (concentración por encima de la que con frecuencia se producen efectos adversos sobre los organismos marinos) para Ni.

- La muestra LC (tomada como referencia por estar situada fuera de las bahías y lejos de las fuentes de contaminación) no supera ninguno de los valores ERB ni ERM. En esta muestra se obtienen las menores concentraciones de todas las zonas estudiadas de Zn, Cu, Pb, As, Cr y Hg.

- En ninguna de las muestras analizadas (en las dos bahías y LC) se superan los valores recomendados por el CEDEX para el nivel de acción 1, lo que indica que estos sedimentos podrían ser vertidos en el mar sin tener que tomar precauciones especiales.

3. Biodisponibilidad:

- El Mn es el elemento que se extrae en un mayor porcentaje en la fracción soluble en ácido, con valores en torno al 30% para las tres zonas estudiadas, lo que indica que es el metal que tiene la mayor biodisponibilidad.
- El Fe es el metal que tiene la menor biodisponibilidad (sólo se extrae en la fracción soluble en ácido en poco más del 1% en las tres zonas estudiadas), probablemente debido a que es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre y su presencia en los sedimentos tiene mayoritariamente un origen natural.
- Los metales estudiados se pueden ordenar, según su biodisponibilidad, de la siguiente manera:

Mn>Pb>Cd>Cu=Cr>Ni>Zn>Fe (bahía de Cádiz)

Mn>Pb>Cd>Cu=Ni>Cr>Zn>Fe (litoral de Cádiz)

Mn>Pb=Ni>Cr=Cu>Cd>Zn>Fe (bahía de Algeciras)

4. Carbono orgánico total y bioensayo de toxicidad:

- Los mayores niveles de COT y toxicidad en la bahía de Cádiz se alcanzan en los puntos C4 y C5, ambos situados en el saco interior de la bahía.
- En la bahía de Algeciras se obtienen los mayores valores de COT y de toxicidad en los puntos A2 (situado en las proximidades de la población de Algeciras) y A4 (localizado en un área con la mayor actividad industrial de la bahía).
- Las menores niveles de COT y toxicidad en los sedimentos se alcanzan en el punto LC (tomado como referencia por estar localizado fuera de las dos bahías y lejos de vertidos contaminantes), en los puntos situados en las zonas más externas de las bahías (C1 en la de Cádiz y A1 en la de Algeciras) y en los puntos más alejados de los vertidos (C3 en bahía de Cádiz y A3 en la bahía de Algeciras).

5. Organismos vivos (macrobentos):

- Se han identificado un total de 11 grupos taxonómicos, de los cuales tres están ampliamente representados: crustáceos (32 familias), moluscos (28 familias) y anélidos (25 familias).

- El grupo taxonómico dominante corresponde a los anélidos, que alcanza los mayores porcentajes de familias en casi todas las muestras, le siguen los crustáceos (con porcentajes de familias entre el 23% y el 45%) y los moluscos, que alcanza entre el 8% y el 35% del total de familias.
- En los puntos situados en las zonas con los mayores niveles de contaminación se encuentran los menores números de familias. Este bajo número de familias es especialmente acusado en el punto C5, sin duda debido a que en los sedimentos de este punto se alcanzan las mayores concentraciones de Zn, Pb, As y toxicidad de todas las zonas estudiadas y a que tienen una granulometría muy fina (limo), por lo que dejan pocos huecos para que se desarrollen y vivan los macroinvertebrados. Por el contrario, en la muestra A5 es donde se obtiene el mayor número de familias, sin duda por tener unos niveles de contaminación relativamente bajos y, sobre todo, porque los sedimentos de esta muestra son los que tienen el mayor tamaño de grano (tipo arena muy gruesa) de todas las zonas estudiadas.

6. Método integrado:

- Se ha desarrollado un nuevo método integrado basado en 5 índices de contaminación y en gráficos, donde se representan conjuntamente estos índices, que suministran una información completa y de fácil visualización, sobre la calidad ambiental de los sedimentos. Además se ha desarrollado un índice global, el de degradación ambiental (IDA) que facilita la comparación de esta calidad entre dos o más puntos de toma de muestra o entre diferentes muestreos.
- En función de los índices de degradación ambiental se pueden clasificar a los puntos de toma de muestra en los grupos siguientes: 1) Con baja degradación ($IDA < 2,5$): este grupo está formado los puntos situados en las zonas más externas de las bahías (C1, C2, C3, LC, A1, A3 y A5) y 2) con degradación moderada ($IDA \geq 2,5$): este grupo está integrado por los puntos situados en el saco más interno de la bahía de Cádiz (C4 y C5), en las proximidades de la ciudad de Algeciras (A2) y en la zona con mayor actividad industrial de la bahía de Algeciras (A4).

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Soto-Jiménez, M.F., Páez-Osuna, F. "Distribution and normalization of heavy metal concentrations in Mangrove and Lagoonal Sediments from Mazatlán Harbor (SE Gulf of California)". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 53, 259-274, 2001.
2. Douben, P.E.T., Koeman, J.H. "Effect of sediment on cadmium and lead in the stone loach (*Noemacheilus barbatulus* L.)". *Aquatic Toxicology*, 15, 253-268, 1989.
3. Ashokkumar, S., Mayavu, P., Sampathkumar, P., Manivasagam, P., Rajaram, G. "Seasonal Distribution of Heavy Metals in the Mullipallam Creek of Muthupettai Mangroves (Southeast Coast of India)". *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4, 308-312, 2009.
4. Sainz, A., Ruiz, F. "Influence of the very polluted inputs of the Tinto –Odiel system on the adjacent littoral sediments of southwestern Spain: a statistical approach". *Chemosphere*, 62, 1612-1622, 2006.
5. Förstner, U. "Contaminated sediments". Springer-Verlag, New York, 1989.
6. Chapman, P.M., Wang, F. "Assessing sediment contamination in estuaries". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 3-22, 2001.
7. Ruiz, F., Borrego, J., González-Regalado, M.L, López González, N., Carro, B., Abad, M. "Impact of millennial mining activities on sediments and microfauna of the Tinto River estuary (SW Spain)". *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1258-1264, 2008.
8. Ghirardini, A.V., Birkemeyer, T., Novelli, A.A., Delaney, E., Pavoni, B., Ghetti, P.F. "An integrated approach to sediment quality assessment: the Venetian lagoon as a case study". *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2, 435-447, 1999.
9. Chapman, P.M. "Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology". *Marine Pollution Bulletin*, 44, 7-15, 2002.
10. Cherry, D.S., Currie, R.J., Soucek, D.J., Latimer, H.A., Trent, G.C. "An integrative assessment of a watershed impacted by abandoned mined land discharges". *Environmental Pollution*, 111, 377-388, 2001.
11. Rizzoni, M., Gustavino, B., Ferrari, C., Gatti, C.G., Fano, E.A. "An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: A mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure". *The Science of The Total Environment*, 162, 127-137, 1995.
12. DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. "An integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz (SW Spain)". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1073-1084, 1998.
13. Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Nicely, P.A., de Vlaming, V., Connor, V., Richard, N., Tjeerdema, R.S. "Integrated assessment of impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA)". *Environmental Pollution*, 124, 523-532, 2003.
14. Chapman, P.M. "Sediment quality assessment: status and outlook". *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4, 183-194, 1995.

-
- 15 Olías, M., Cánovas, C.R., Nieto, J.M., Sarmiento, A.M. "Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel rivers (South West Spain)". *Applied Geochemistry*, 21, 1733-1749, 2006.
 - 16 Achterberg, E.P., Herzl, V.M.C., Braungardt, C.B, Millward, G.E. "Metal behaviour in an estuary polluted by acid mine drainage: the role of particulate matter". *Environmental Pollution*, 121, 283-292, 2003.
 - 17 Barba-Brioso, C., Fernandez-Caliani, J.C., Miras, A., Cornejo, J., Galán, E. "Multi-source water pollution in a highly anthropized wetland system associated with the estuary of Huelva (SW Spain)". *Marine Pollution Bulletin*, 60, 1259-1269, 2010.
 - 18 Committee on Assessing and Valuing the Services of Aquatic and Related Terrestrial Ecosystems, Water Science and Technology Board, Division on Earth and Life Studies, National Research Council. "Aquatic and Related Terrestrial Ecosystems". En: Committee on Assessing and Valuing the Services of Aquatic and Related Terrestrial Ecosystems, Water Science and Technology Board, Division on Earth and Life Studies, National Research Council (Ed). "Valuing ecosystems services. Towards better environmental decision-making" (pp. 59-95). Washington, D.C: National Academies Press. 2005.
 - 19 Alexander, D.E., Fairbridge, R.W. "Encyclopedia of Environmental Science". Springer. 1999.
 - 20 Wolanski, E. "Introduction". En: Wolanski, E. (Ed). "Estuarine Ecohydrology" (pp. 1-15). Elsevier. 2007.
 - 21 Pritchard, D.W. "What is an estuary: physical viewpoint". En: Lauff, G.H. (Ed). "Estuaries" (pp. 1-29). AAAS. 1967.
 - 22 Dalrymple, R.W., Zaitlin, B.A., Boyd, R. "A conceptual model of estuarine sedimentation". *Journal of Sedimentary Petrology*, 62, 1130-1146, 1992.
 - 23 Perillo, G.M.E. "Definitions and geomorphologic classifications of estuaries". En: Perillo, G.M.E. (Ed). "Geomorphology and Sedimentology of Estuaries. Developments in Sedimentology" (pp. 17-47). Elsevier Science. 1995.
 - 24 Kjerfve, B., Magill, K.E. "Geographic and hydrodynamic characteristics of shallow coastal lagoons". *Marine Geology*, 88, 187-199, 1989.
 - 25 Dionne, J.C. "Towards a more adequate definition of the St. Lawrence estuary". *Journal of Zeitschrift für Geomorphologie*, 7, 36-44, 1963.
 - 26 Salomons, W., Brils, J. "Contaminated Sediment in European River Basins". European Sediment Research Network, SedNet. Den Helder: TNO. 2004.
 - 27 Wentworth, C.K. "A scale of grade and class terms for clastic sediments". *Journal of Geology*, 30, 377-392, 1922.
 - 28 Owens, P.N. "Sediment Behaviour, Functions and Management in River Basins". En: Owens, P.N. (Ed). "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Management at the River Basin Scale" (pp. 1-29). Elsevier. 2008.
-

-
- 29 Shand, C.A, Smith, S., Edwards, A.C., Fraser, A.R. "Distribution of phosphorus in particulate, colloidal and molecular-sized fractions of soil solution". *Water Research*, vol. 34, 4, 1.278–1.284, 2000.
- 30 Allan, I.J., Stegemann, J.A. "Modelling of Pollutant Fate and Behaviour in Bed Sediments". En: Barceló, D., Petrovic, M. (Eds). "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants" (pp. 263-294). Elsevier B. V., 2007.
- 31 Morillo, J. "Caracterización metálica de los sedimentos de las cuencas de los ríos Tinto y Odiel". (Tesis Doctoral), Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad de Sevilla, 1999.
- 32 Garzanti, E., Andò, S., Vezzoli, G. "Settling equivalence of detrital minerals and grain-size dependence of sediment composition". *Earth and Planetary Science Letters*, 273, 138–151, 2008.
- 33 Droppo, I.G., Stone, M. "In-channel surficial fine-grained sediment laminae (Part 1): physical characteristics and formation processes". *Hydrological Processes*, 8, 101-111, 1994.
- 34 Macrory, R. "The Legal Control of Pollution". En: Harrison, R.M., Chester, R., Slater, D. (Ed). "Pollution, Causes, Effects and Control" (pp. 524-547). Cambridge.Royal Society of Chemistry. 2001.
- 35 Página web de la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (EPA), EEUU. (<http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/contaminants.cfm>). Consultado el 13/7/2013.
- 36 Usero, J., Morillo, J., Gracia, I. "Contaminación por metales en sedimentos acuáticos. I. Metales en los ecosistemas acuáticos". *Tecnología del agua*, 166, 44-50, 1997.
- 37 Bjerregaard, P., Andersen, O. "Ecotoxicology of Metals - Sources, Transport, and Effects in the Ecosystem". En: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Ed). "Handbook on the Toxicology of Metals" (pp. 251-280). Academic Press. 2007.
- 38 Van der Poel, P., Brooke, D.N., Van Leeuwen, C.J. "Emissions of Chemicals to the Environment". En: Van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G. (Ed). "Risk Assessment of Chemicals: An Introduction" (pp. 37-71). Springer. 2007.
- 39 Bradl, H., Kim, C., Kramar, U., Stüben, D. En: Bradl, H.B. (Ed). "Heavy Metals in the Environment" (pp. 28-164). Elsevier. 2005.
- 40 1 Rand, G.M. "Fundamentals of Aquatic Toxicology". Washington D.C.: Taylor & Francis.1995.
- 41 Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T. "Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 63–77, 2003.
- 42 Sijm, D.T.H.M., Rikken, M.G.J., Rorije, E., Traas, T.P., McLachlan, M.S.,
-

- Peijnenburg, W.J.G.M. "Transport, accumulation and transformation processes". En: Van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G. (Ed). "Risk Assessment of Chemicals: An Introduction" (pp. 73-158). Springer. 2007.
- 43 Chen, M.H. "Baseline metal concentrations in sediments and fish, and the determination of bioindicators in the subtropical Chi-ku Lagoon, S.W. Taiwan". *Marine Pollution Bulletin*, 44, 703-714, 2002.
- 44 Marrugo, A.J., Fernández, R., Gaitan, R. "Total hydrocarbons in waters, superficial sediments and bioindicator bivalves in the Pacific Colombian Coast". *Marine Pollution Bulletin*, 38, 819-823, 1999.
- 45 Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I. "Trace metals in the bivalve molluscs *ruditapes decussatus* and *ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of southern Spain". *Environment International*, 23, 291-298, 1997.
- 46 Cowan, C.E., Jenne, E.A., Kinnison, R.R. "A methodology for determining the toxic chemicals species of copper in toxicity experiments and natural waters". En: Hemphill, D.D. (Ed). "Trace substances in environmental health-XVIII" (pp. 78-91). University of Missouri, Columbia. 1984.
- 47 Van Engelen, J.G.M., Hakkinen, P. J., Money, C., Rikken, M.G.J., Vermeire, D T.G. "Human exposure assesement". En: Van Leeuwen, C.J., Vermeire, T.G. (Eds.). "Risk Assessment of Chemicals: An Introduction" (pp. 195-226). Springer. 2007.
- 48 Harrison, R. M. "Pollution, Causes, Effects and Control". The Royal Society of Chemistry, 2001.
- 49 Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A. Schwager, S.J. "Global assessment of organic contaminants in farmed salmon". *Science*, 303, 226-229, 2004.
- 50 Admiraal, W., Barranguet, C., Van Beusekom, S.A.M., Bleeker, E.A.J., Van den Ende, F.P., Van der Geest, H.G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M.H.S., Stuijffzand, S.C. "Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation". *Chemosphere*, 41, 289-295, 2000.
- 51 DelValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. "Seasonality of contamination, toxicity, and quality values in sediments from littoral ecosystems in the Gulf of Cádiz (SW Spain)". *Chemosphere*, 46, 1033-1043, 2002.
- 52 Chapman, P.M. "Pollution status of North Sea sediments: an international integrative study". *Marine Ecology Progress Series*, 91, 313-322, 1992.
- 53 Scrimshaw, M.D., DelValls, T.A., Blasco, J., Chapman, P.M. "Sediment Quality Guidelines and Weight of Evidence Assessments". En: Barceló, D., Petrovic, M. (Eds). "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants" (pp. 295-309). Elsevier B. V., 2007.
- 54 El Bilali, L., Rasmussen, P.E., Hall, G.E.M., Fortin, D. "Role of sediment composition in trace metal distribution in lake sediments". *Applied Geochemistry*, 17, 1171-1181, 2002.

-
- 55 Bellucci, L.G., Frignani, M., Paolucci, D., Ravanelli, M. "Distribution of heavy metals in sediments of the Venice Lagoon: the role of the industrial area". *The Science of The Total Environment*, 295, 35-49, 2002.
- 56 Mai, B.X., Fu, J.M., Sheng, G.Y. Kang, Y.H., Lin, Z., Zhang, G., Min, E.Y., Zeng, E.I. "Chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine and estuarine sediments from Pearl River Delta, China". *Environmental Pollution*, 117, 457-474, 2002.
- 57 Lee, K.T., Tanabe, S., Koh, C.H. "Distribution of organochlorine pesticides in sediments from Kyeonggi Bay and nearby areas, Korea". *Environmental Pollution*, 114, 207-213, 2001.
- 58 Viguri, J., Verde, J., Irabien, A. "Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain". *Chemosphere*, 48, 157-165, 2002.
- 59 Cuypers, M.P., Grotenhuis, J.T.C., Rulkens, W.H. "Characterisation of PAH-contaminated sediments in a remediation perspective". *Water Science and Technology*, 37, 157-164, 1998.
- 60 Fernández, M.A., Alonso, C., González, M.J. Hernández, L.M. "Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro river (Spain)". *Chemosphere*, 38, 33-43, 1999.
- 61 Lee, K.T., Tanabe, S., Koh, C.H. "Contamination of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from Kyeonggi Bay and Nearby areas, Korea". *Marine Pollution Bulletin*, 42, 273-279, 2001.
- 62 Borg, H., Jonsson, P. "Large-scale metal distribution in Baltic Sea Sediments". *Marine Pollution Bulletin*, 32, 8-21, 1996.
- 63 Al-Abdali, F., Massoud, M.S., A-Ghadband, A.N.A. "Bottom sediments of the arabian gulf-III. Trace metal contents as indicators of pollution and implications for the effect and fate of the Kuwait oil slick". *Environmental Pollution*, 96, 285-301, 1996.
- 64 Loska, K., Wiechula, D., Pelczar, J., Kwapulinski, J. "Occurrence of heavy metals in bottom sediments of a heated reservoir (the Rybnik Reservoir, southern Poland)". *Acta Hydrobiologica*, 36, 281-295, 1994.
- 65 Kingston, H.M., Jassie, L.B. "Introduction to microwave sample preparation". Washington, DC, USA: American Chemical Society. 1988.
- 66 Skoog, D.A., Leary, J.J. "Análisis instrumental". McGraw-Hill. 1994.
- 67 McLaren, J., Beauchemin, D., Berman, S.A. "Application of isotope dilution ICP-MS to the analysis of marine sediments". *Analytical Chemistry*, 59, 610-613, 1987.
- 68 Crane, M. "Proposed development of Sediment Quality Guidelines under the European Water Framework Directive: a critique". *Toxicology Letters*, 142, 195-206, 2003.
-

-
- 69 Petrovic, M., Eljarrat, E., Diez, S., Kowalewska, G., Barcelo, D. "Chemical Analysis of Contaminants in Sediments". En: Barcelo, D., Petrovic, M. (Eds.) "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants" (pp. 61-129). Elsevier. 2007.
- 70 Comisión Europea, Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DO L 327 de 22.12.2000.
- 71 Australian and New Zealand Environment and Conservation Council/Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand. "Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality". Canberra, 2000.
- 72 Murdoch, A., Azcue, J.M., Murdoch, P. "Manual of aquatic sediment sampling". Boca Raton, FL:CRC Press. 1997.
- 73 Turner, A., Olsen, Y.S. "Chemical versus enzymatic digestion of contaminated estuarine sediment: relative importance of iron and manganese oxides in controlling trace metal bioavailability". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51, 717-728, 2000.
- 74 Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carlson, A.R., Ankley, G.T. "Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1971-1982, 2000.
- 75 Berry, W.J., Hansen, D.J., Mahony, J.D., Robson, D.L., Di Toro, D.M., Shipley, B.P., Rogers, B., Corbin, J.M., Boothman, W.S. "Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 2067-2079, 1996.
- 76 Simpson, S.L., Apte, S.C., Batley, G.E. "Effect of short term resuspension events on trace metal speciation in polluted anoxic sediments". *Environmental Science and Technology*, 32, 620-625, 1998.
- 77 Lee, B.G., Griscom, S.B., Lee, J.S., Choi, H.J., Koh, C.H., Luoma, S.N., Fisher, N.S. . "Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments". *Science*, 287, 282-284, 2000a.
- 78 Lee, J.S., Lee, B.G., Luoma, S.N., Choi, H.J., Koh, C.H., Brown, C.L. "Influence of acid volatile sulfides and metal concentrations on metal partitioning in contaminated sediments". *Environmental Science and Technology*, 34, 4511-4516, 2000b.
- 79 Lee, J.S., Lee, B.G., Yoo, H., Koh, C.H., Luoma, S.N. "Influence of reactive sulfide (AVS) and supplementary food on Ag, Cd, and Zn bioaccumulation in the marine polychaete *Neanthes arenaceodentata*". *Marine Ecology Progress Series*, 216, 129-140, 2001.
- 80 Simpson, S.L., Apte, S.C., Batley, G.E. "Effect of short-term resuspension event s on the oxidation of cadmium, lead, and zinc sulfide phases in anoxic estuarine sediments". *Environmental Science and Technology*, 34, 4533-4537, 2000.
- 81 O'Day, P.A., Carroll, S.A., Randall, S., Martinelli, R.E., Anderson, S.L., Jelinski, J.,
-

- Knezovich, J.P. "Metal speciation and bioavailability in contaminated estuarine sediments Alameda Naval Air Station, California". *Environmental Science and Technology*, 34, 3666-3673, 2000.
- 82 Simpson, S.L., Batley, G.E., Chariton, A.A., Stauber, J.L., King, C.K., Chapman, J.C., Hyne, R.V.; Gale, S.A., Roach, A.C., Maher, W.A. "Handbook for Sediment Quality Assessment". Washington, D.C: Centre for Environmental Contaminants Research. 2005.
- 83 Allen, H.E., Fu, G., Deng, B. "Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1441-1453, 1993.
- 84 Calmano, W., Ahlf, W., Förstner, U. "Exchange of heavy metals between sediment components and water". En: Proekaert, J.A.C., Gücer, S., Adams, F. (Eds.) "Metal speciation in the environment" (pp. 503-522). Springer-Verlag. 1990.
- 85 Kersten, M., Förstner, U. "Speciation of trace metal in sediments". En: Batley, E.G. (Eds.) "Trace element speciation: analytical methods and problems" (pp. 245-317). Florida: CRC Press. 1991.
- 86 Förstner, U. "Metal speciation-general concepts and applications". En: Rauret, G., Quevauviller, P. (Eds.) "Proceedings of the workshop on the sequential extraction of trace metals in soils and sediments". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51, 5-23, 1993.
- 87 Salomons, W. "Adoption of common schemes for single and sequential extractions of trace metal and soils and sediments". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51, 3-4, 1993.
- 88 López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Rauret, G. "Comparison of two sequential extraction procedures for trace metal partitioning in sediments". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51, 113-121, 1993.
- 89 Norrish, K., Rosser, H., Warren, L.J. "A geochemical study of the forms of metal present in sediments from Spencer Gulf, South Australia". *Applied Geochemistry*, 1, 117-130, 1986.
- 90 Gleyzes, C., Tellier, S., Astruc, M. "Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures". *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 451-467, 2002.
- 91 DelValls, A., Nieto, J.M., Sarmiento, A.M. & Olías, M. "Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary". *Environment International*, 33 (4): 445-55, 2000.
- 92 Izquierdo, C., Usero, J., Gracia, I. "Speciation of heavy metals in sediments from salt marshes on the southern atlantic coast of Spain". *Marine Pollution Bulletin*, 34, 123-128, 1997.
- 93 Kheboian, C., Bauer, C.F. "Accuracy of selective extraction procedures for metal

- speciation in model aquatic sediments". *Analytical Chemistry*, 59, 1417-1423, 1987.
- 94 Beeftink, W.G., Nieuwenhuize, J. "Heavy metal accumulation in salt marshes from the western and eastern Scheldt". *Science of the Total Environment*, 25, 199-223, 1982.
- 95 Martin, J.M., Niril, P., Thomas, A.J. "Sequential extraction techniques: Promises and problems". *Marine Chemistry*, 22, 313-342, 1987.
- 96 Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Lück, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, Ph. "The certification of the extractable contents (mass fractions) of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in freshwater sediment following a sequential extraction procedure". Comisión Europea. 2001.
- 97 Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. "Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals". *Analytical Chemistry*, 51, 844-851, 1979.
- 98 Krishnamurti, G. S. R., Naidu, R. "Speciation and phytoavailability of cadmium in selected surface soils of South Australia". *Australian Journal of Soil Research*, 38, 991-1004, 2000.
- 99 3 Yu-Yang Long, Li-Fang Hu, Cheng-Ran Fang, Yu-Yong Wu, Dong-Sheng Shen. "An evaluation of the modified BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility of copper and zinc in MSW". *Microchemical Journal*, 91, 1-5, 2009.
- 100 Xiujuan Yu, Yan Yan, Wen-Xiong Wang. "The distribution and speciation of trace metals in surface sediments from the Pearl River Estuary and the Daya Bay, Southern China". *Marine Pollution Bulletin*, 60, 1364-1371, 2010.
- 101 Rao, C.R.M., Sahuquillo, A., Sanchez, J.F.L. "A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials". *Water Air and Soil Pollution*, 189, 291-333, 2008.
- 102 Sutherland, R.A. "BCR®-701: A review of 10-years of sequential extraction analyses". *Analytica Chimica Acta*, 680, 10-20, 2010.
- 103 Sterritt, R.M., Lester, J.N. "The value of sewage sludge to agriculture and effects of the agricultural use of sludges contaminated with toxic elements: a review". *Science of the Total Environment*, 16, 55-90, 1980.
- 104 Buffle, J. "Natural organic matter and metal-organic interactions in aquatic system". En: Sigel, H. (Eds.) "Metal ions in biological systems". New York: CRC Press. 1984.
- 105 Rashid, M.A. *Geochemistry of marine humic substances*. New York: Springer-Verlag. 1985.
- 106 Scouller, R.C., Snape, I., Stark, J.S., Gore, D.B. "Evaluation of geochemical methods for discrimination of metal contamination in Antarctic marine sediments: a case study from Casey Station". *Chemosphere*, 65, 294-309, 2006.

-
- 107 Snape, I., Scouller, R.C., Stark, S.C., Stark, J.S., Riddle, M.J., Gore, D.B. "Characterisation of the dilute HCl extraction method for the identification of metal contamination in Antarctic marine sediments". *Chemosphere*, 57, 491–504, 2004.
- 108 Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T. "Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—a perspective on mechanisms, consequences and assessment". *Environmental Pollution*, 108, 103–112, 2000.
- 109 Ianni, C., Magi, E., Soggia, F., Rivaro, P., Frache, R. "Trace metal speciation in coastal and off-shore sediments from Ross Sea (Antarctica)". *Microchemical Journal*, 96, 203–212, 2010.
- 110 Ianni, C., Ruggieri, N., Rivaro, P., Frache, R. "Evaluation and comparison of two selective extraction procedures for heavy metal speciation in sediments". *Analytical Sciences*, 17, 1273–1278, 2001.
- 112 Shu-Heng Peng, Wen-Xiong Wang, Xiangdong Li, Yu-Fong Yen. "Metal partitioning in river sediments measured by sequential extraction and biomimetic approaches". *Chemosphere*, 57, 839–851, 2004.
- 113 Mayer, L.M., Schick, L.L., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Findlay, R.H., Chen, Z., Sampson, S. "Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: enzymes, surfactants and dissolved organic matter". *Journal of Marine Research*, 55, 785–812, 1997.
- 113 Mayer, L.M., Schick, L.L., Sawyer, T., Plante, C.J. "Bioavailable amino acids in sediments: a biomimetic, kinetics-based approach". *Limnology and Oceanography*, 40, 511–520, 1995.
- 114 Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M. "Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test". *Environmental Science and Technology*, 30, 422–430, 1996.
- 115 Wrobel, K., Marquez, G.R.V., Almanza, M.D.R. "Studies on bioavailability of some bulk and trace elements in mexican tortilla using an in vitro model". *Biological Trace Element Research*, 68, 97–106, 1999.
- 116 Henon, D.N., Dale, J.L.L. "Pepsin-digestibility of contaminated estuarine sediments". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 53, 671–681, 2001.
- 117 Wonk, H.J., Western, G.R.H. "Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion". London: Academic. 1984.
- 118 Turner, A. "Enzymatic mobilisation of trace metals from estuarine sediment". *Marine Chemistry*, 98, 140–147, 2006.
- 119 Ianni, C., Bignasca, A., Magi, E., Rivaro, P. "Metal bioavailability in marine sediments measured by chemical extraction and enzymatic mobilization". *Microchemical Journal*, 96, 308–316, 2010.
- 120 4 Ellis, J.I., Schneider, D.C. "Evaluation of a gradient sampling design for environmental impact assessment". *Environmental Monitoring and Assessment*, 48, 157-172, 1997.
-

-
- 121 De Luca-Abbott, S. "Biomarkers of Sublethal Stress in the Soft-sediment Bivalve *Austrovenus stutchburyi* Exposed in-situ to Contaminated Sediment in an Urban New Zealand Harbour". *Marine Pollution Bulletin*, 42, 817-825, 2001.
- 122 Viganò, L., Arillo, A., Falugi, C., Melodia, F., Polesello, S. "Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea". *Marine Pollution Bulletin*, 42, 887-894, 2001.
- 123 Chen, J., Summons, R.E. "Complex patterns of steroidal biomarkers in Tertiary lacustrine sediments of the Biyang Basin, China". *Organic Geochemistry*, 32, 115-126, 2001.
- 124 Kammenga, J. "Potential and limitations of soil invertebrate biomarkers: final report of the EU BIOPRINT field project". En: "SETAC Europe 11th Annual Meeting" (pp. 47). Madrid, 2000.
- 125 Peakall, D. "Animal Biomarkers and Pollution Indicators". London, UK: Chapman and Hall. 1992.
- 126 Snape, J. R., Maund, S. J., Pickford, D. B., Hutchinson, T. H. "Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology". *Aquatic Toxicology*, 67, 143-154, 2004.
- 127 Bustin, S. A. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays". *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193, 2000.
- 128 Spurgeon, D.J., Morgan, A.J., Kille, P. "Current research in soil invertebrate ecotoxicogenomics". *Advances in Experimental Biology*, 2, 133-163, 2008.
- 129 Sanchiz, C., García-Carrascosa, A.M., Pastor, A. "Relationships between sediment physico-chemical characteristics and heavy metal bioaccumulation in Mediterranean soft-bottom macrophytes". *Aquatic Botany*, 69, 63-73, 2001.
- 130 Pempkowiak, J., Sikora, A., Biernacka, E. "Speciation of heavy metals in marine sediments vs their bioaccumulation by mussels". *Chemosphere*, 39, 313-321, 1999.
- 131 Chen, M.H., Chen, C.Y. "Bioaccumulation of Sediment-Bound Heavy Metals in Grey Mullet, *Liza macrolepis*". *Marine Pollution Bulletin*, 39, 239-244, 1999.
- 132 Mayer, L., Chen, Z., Findlay, R., Fang, J., Simpson, S., Self, L., Jumars, P., Quetel, C., Donard, O. "Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion". *Environmental Science and Technology*, 30, 2641-2645, 1996.
- 133 Mayer, L.M., Chen, Z. "Assessment of sedimentary Cu availability: a comparison of biomimetic and AVS approach". *Environmental Science and Technology*, 33, 650-652, 1999.
- 134 Borja, A., Franco, J., Pérez, V. "A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments". *Marine Pollution Bulletin*, 40, 1100-1114, 2000.
-

-
- 135 American Society for Testing and Materials (ASTM). "Standard guide for conducting bioconcentration tests with fishes and saltwater bivalve mollusks". ASTM Publication, E1022-94, 2003. ASTM International, West Conshohocken, PA, United States. 2003.
- 136 US Environmental Protection Agency (EPA). "Ecological Effects Test Guidelines". OPPTS 850.1710 Oyster BCF. Public Draft. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC, 1996.
- 137 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Proposal for a new guideline for the testing of chemicals - Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes. Revised Draft. OECD, Paris, France. 2005.
- 138 American Society for Testing and Materials (ASTM). "Standard guide for determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates". ASTM 139Publication, E1688-00a. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2000.
- 139 Anonymous. Fish, dietary bioaccumulation study – Basic Protocol. Document submitted to the European Union Technical Committee for New and Existing Substances subgroup on determining of Persistent, Bioaccumulative and Toxic substances. European Chemicals Bureau, Ispra, Italy, 2004.
- 140 Meador, J.P., Ross, B.D., Dinnel, P.A., Picquelle, S.J. "An analysis of the relationship between a Sand-Dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington". *Marine Environmental Research*, 30, 251-272, 1990.
- 141 McGee, B.L., Schiekat, Ch.E., Reinharz, E. "Assesing sublethal levels of sediment contamination using the estuarine amphipod *Leptocheirits plumulosus*". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 577-587, 1993.
- 142 ASTM. "Standard Guide For Collection, Storage, Characterization and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing." ASTM Publication. E 1391-90, 1991.
- 143 Ribó, J.M. "Evaluación de la contaminación química del medio acuático: El ensayo de bacterias luminiscentes". *Tecnología del agua*, 96, 36-48, 1992.
- 144 Environment Canada. "Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediment spiked with a reference toxicant". Environment Canada Environmental Protection Series Report EPS/1/RM/30, Ottawa, ON, Canada. 1995.
- 145 Carr, R.S. "Marine and estuarine porewater toxicity testing". En: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C. (Eds). "Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice" (pp. 523-538). Boca Raton, FL: CRC Press. 1998.
- 146 Environment Canada. Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology. Environment Canada Environmental Protection Series, EPS/1/RM/34, Ottawa, ON, Canada. 1999.
- 147 Chapman, B., Wang, F.Y., Germano, J.D., Batley, G.E. "Pore water testing and
-

- analysis: the good, the bad, and the ugly". *Marine Pollution Bulletin*, 44, 359-366, 2002.
- 148 Simpson, S.L., Batley, G.E. "Disturbances to metal partitioning during toxicity testing Fe(II)-rich estuarine porewaters and whole-sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 422-432, 2003.
- 149 Chapman, P.M., Swartz, R.C., Roddle, B., Phelps, H.L., Van den Hurk, P., Butler, R. "An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea Mar". *Marine Ecology Progress Series*, 91, 253-264, 1992.
- 150 Giesy, J.P., Hoke, R.A. "Freshwater sediment quality criteria: toxicity bioassessment". In: Bando, R., Giesy, J., Muntau, H. (Eds.). "Sediments: Chemistry and toxicity of in-place pollutants". Lewis Publishers, Boca Ratón, 265-348, 1990.
- 151 Dickman, M.D. "Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong". *Environment International*, 24, 749-759, 1998.
- 152 McGeer, E.R. "Sublethal effects of heavy metal contaminated sediments on the bivalve *Macoma Balthica*". *Marine Pollution Bulletin*, 10, 259-262, 1979.
- 153 Álvarez, J.F., Borrell, I., Suñé, R. "Ensayo multitox como indicador biológico de toxicidad ambiental". *Tecnología del Agua*, 154, 46-51, 1996.
- 154 Erlacher, E., Loibner, A.P., Kendler, R., Scherr, K.E. "Distillation fraction-specific ecotoxicological evaluation of a paraffin-rich crude oil". *Environmental Pollution*, 174, 236-243, 2013.
- 155 Scholz, B., Liebezeit, G. "Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats". *Harmful Algae*, 20, 58-70, 2012.
- 156 Godinho-Castro, A.P., Testolin, R.C., Janke, L., Corrêa, A.X.R., Radetski, C.M. "Incorporation of gypsum waste in ceramic block production: Proposal for a minimal battery of tests to evaluate technical and environmental viability of this recycling process". *Waste Management*, 32, 153-157, 2012.
- 157 Giesy, J.P., Hoke, R.A. "Fresh water sediment toxicity bioassessment: Rationale for species selection and test design". *Journal of Great Lakes Research*, 15, 539-569, 1989.
- 158 Kaiser, K.L.E., Palobrica, V.S. "Photobacterium phosphoreum toxicity data index". *Water Pollution Research Journal of Canada*, 26, 361-431, 1991.
- 159 Dom, Ph.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., Wisniewski, H.L. "Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, *Microtox*, and plants". *Chemosphere*, 37, 845-860, 1998.
- 160 Garay, V., Román, G., Isnard, P. "Evaluation of PNEC values: extrapolation from *Microtox*, algae, daphnid, and fish data to HC2". *Chemosphere*, 40, 267-273, 2000.
- 161 Ross, P. "The use of bacterial luminescence systems in aquatic toxicity testing".

- En: Richadrson, M. (Ed). "Ecotoxicology Monitoring" (pp. 185-195). Weinheim, Germany:VCH. 1993.
- 162 Azur Environmental. "Microtox acute toxicity solid phase test". Microtox[®] Manual, Azur Environmental, Carlsbad, California.
- 163 Usero, J., Morillo, J., El Bakouri, H. "A general integrated ecotoxicological method for marine sediment quality assessment: Application to sediments from littoral ecosystems on Southern Spain's Atlantic coast". Marine Pollution Bulletin, 56, 2027–2036, 2008.
- 164 Volpi Ghirardinia, A.M., Girardinia, M., Marchetto, D., Pantani, C. "Microtox solid phase test: Effect of diluent used in toxicity test". Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 851–861, 2009.
- 165 Viganò, L., Arillo, A., Buffagnia, A., Camusso, M., Ciannarellac, R., Crosad, G., Falugie, C., Galassif, S., Guzzellaa, L., Lopez, A., Mingazzinia, M., Pagnottag, R., Patroleccog, L., Tartaria, G., Valsecchia, S. "Quality assessment of bed sediments of the Po River (Italy)". Water Research, 37, 501–518, 2003.
- 166 Brouwer, H., Murphy, T., McArdle, L.A. "A sediment-contact bioassay with photobacterium phosphoreum". Environmental Toxicology and Chemistry, 9, 1353-1358, 1990.
- 167 Svenson, A., Cardoso, A., Thurén, A., Dave, G. "Microtox toxicity in sediments. Direct contact test with luminiscent bacteria". Report B 1140. Swedish Environmental Research Institute, Stockholm. 1994.
- 168 Svenson, A., Edsholt, E., Ricking, M., Remberger, M., Röttorp, J. "Sediment contaminants and Microtox toxicity tested in a direct contact exposure test". Environmental Toxicology and Chemistry, 9, 1353-1358, 1990.
- 169 Svenson, A. "Microtox toxicity in soil evaluation of the direct contact test luminiscent bacteria". Report B 1249. Swedish Environmental Research Institute. 1996b.
- 170 Cook, N.H., Wells, P.G. "Toxicity of Halifax Harbour sediments: an evaluation of the Microtox[®] solid-phase test". Water Quality Research Journal of Canada, 31, 673-708, 1998.
- 171 Côte, C., Blaise, C., Michaud, J., Ménard, L., Trottier, S., Gagné, F., Lifshitz, R. "Comparisons between microscale and whole-sediment assays for freshwater sediment toxicity assessment". Environmental Toxicology and Water Quality, 13, 93-110, 1998.
- 172 Day, K.E., Dutka, B.J., Kwan, K.K., Batista, N., Reynoldson, T.B., Metcalfe-Smith, J.L. "Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole sediment toxicity tests with macroinvertebrates and in situ benthic community structure". Journal of Great Lakes Research, 21, 192-206, 1995.
- 173 Moreno-Garrido, I., Hampel, M., Lubian, L.M., Blasco, J. "Sediment toxicity tests using benthic marine microalgae *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Lewin and

- Reimann (Bacillariophyceae)". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 290-295, 2003.
- 174 Munawar, M., Munawar, I.F. "Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of in situ sediment contaminants". *Hydrobiologia*, 149, 87-105, 1987.
- 175 Blaise, C., Ménard, L. "A micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments". *Water Quality Research Journal of Canada*, 33, 133-155, 1998.
- 176 Hall, N.E., Fairchild, J.F., La Point, T.W., Heine, P.R., Ruessler, D.S., Ingersoll, C.G. "Problems and recommendations in using algal toxicity testing to evaluate contaminated sediments". *Journal of Great Lakes Research*, 22, 545-556, 1996.
- 177 Dorsey, J., Yentsch, C.M., Mayo, S., McKenna, C. "Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae". *Cytometry*, 10, 622-628, 1989.
- 178 Steward, N., Martin, R., Engasser, J.M., Goergen, J.L. "A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity". *Plant Cell Reports*, 19, 171-179, 1999.
- 179 St-Lauren, D., Blaise, C.R. "Validation of a microplate-based algal lethally test developed with the help of flow cytometry". En: Richadrson, M. (Ed). "Environmental Toxicology Assessment" (pp. 137-155). London, UK:Taylor and Francis. 1995.
- 180 Adams, M.S., Stauber, J.L. "Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1957-1968, 2004.
- 181 Nendza, M. "Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments". *Chemosphere*, 48, 865-883, 2002.
- 182 Van den Heuvel-Greve, M.J., Dubbeldam, M., Hannewijk, A., Postma, J.F., Vethaak, A.D. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Hamburg, 2003.
- 183 Peters, C., Becker, S., Noack, U., Pfitzner, S., Biilow, W., Barz, K., Ahlf, W., Berghahn, R. "A Marine Bioassay Test Set to Assess Marine Water and Sediment Quality—its Need, the Approach and First Results". *Ecotoxicology*, 11, 379-383, 2002.
- 184 Stronkhorst, J., Schipper, C., Brils, J., Dubbeldam, M., Postma, J., van der Hoeven, N. "Using marine bioassays to classify the toxicity of dutch harbor sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1535-1545, 2003.
- 185 Bat, L., Raffaelli, D. "Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226, 217-239, 1998.
- 186 Hansen, P.-D., Blasco, J., DelValls, T.A., Poulsen, V., van den Heuvel-Greve, M. "Biological analysis (Bioassays, Biomarkers, Biosensors)". En: Barceló, D.,

- Petrovic, M. (Ed). "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants" (pp. 131-161). Elsevier. 2007.
- 187 Stronkhorst, J., Ciarelli, S., Schipper, C.A., Postma, J.F., Dubbeldam, M., Vangheluwe, M., Brils, J.M., Hooffman, R.N. "Inter-laboratory comparison of five marine bioassays for evaluating the toxicity of dredged material". *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 7, 147-159, 2004.
- 188 Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L., Scholten, M.C.T. "Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2242-2251, 2002.
- 189 Honkoop, P.J.C., Luttkhuizen, P.C., Piersma, T. "Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as synergistic triggers". *Marine Ecology Progress Series*, 180, 297-300, 1999.
- 190 Drent J. "Temperature responses in larvae of *Macoma balthica* from a northerly and southerly population of the European distribution range". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 275, 117-, 2002.
- 191 Ringwood, A.M., Keppler, C.J. "Comparative in situ and laboratory sediment bioassays with juvenile *Mercenaria mercenaria*". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1651-1657, 2002.
- 192 U.S.E.P.A. Bioassays for toxic and hazardous materials. Training manual. Principles and procedures of aquatic toxicology. EPA report 430/1-81-026 ; 1981.
- 193 Antrill, M.J., Depledge, M.H. "Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organisation". *Aquatic Toxicology*, 38, 183-197, 1997.
- 194 Flegger, J.W., Carman, K.R. "Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems". *Science of the Total Environment*, 317, 207-233, 2003.
- 195 Fletcher, R., Reynoldson, T.B., Taylor, W.D. "The use of benthic mesocosms for the assessment of sediment contamination". *Environmental Pollution*, 115, 173-182, 2001.
- 196 Roach, A.C., Jones, A.R., Murray, A. "Using benthic recruitment to assess the significance of contaminated sediments: the influence of taxonomic resolution". *Environmental Pollution*, 112, 131-143, 2001.
- 197 Rowe, G.T. "Benthic biomass and surface productivity". En: Costlow, J.D. (Ed). "Fertility of the Sea" (pp. 441-454). New York:Gordon and Breach. 1971.
- 198 Gaston, G.R., Rakocinski, C.F., Brown, S.S., Cleveland, C.M. "Trophic function in estuaries: response of macrobenthos to natural and contaminants gradients". *Marine & Freshwater Research*, 49, 833-846, 1998.
- 199 DelValls, T.A., Chapman, P.M., Drake, P., Dulce Subida, M., Vale, C., de la Reguera, D. F., Blasco, J. "Benthos Sediment Quality Assessments". En: Danià,

- B., Petrovic, M. (Ed). "Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants" (pp. 215-261). Elsevier B. V., 2007.
- 200 Hauer, F.R., Resh, V.H. "Macroinvertebrates. Methods in stream ecology" (pp. 435-464). Nueva York, USA: Academic Press. 2006.
- 201 White, D.S. "Persistent toxic substances and zoobenthos in Great Lakes". En: Evans, M.S. (Ed). "Toxic contaminants and Ecosystem Health: A Great Lakes Focus" (pp. 537-548). New York:John Wiley and Sons. 1988.
- 202 Dauer, D.M. "Biological criteria, environmental health and estuarine macrobenthic community structure". *Marine Pollution Bulletin*, 26, 249-257, 1993.
- 203 Warwick, R.M. "Environmental studies on marine communities: pragmatcal considerations". *Australian Journal of Ecology*, 18, 63-80, 1993.
- 204 Sánchez-Moyano, J. E., García Adiego, E.M., García-Asencio, I., García-Gómez, J.C. "Influencia del gradiente ambiental sobre la distribución de las comunidades macrobentónicas del estuario del río Guadiana". *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 2003.
- 205 Alba-Tercedor, J., Pardo, I., Pujante, A. "Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco de Aguas: Protocolos de muestreo y análisis para invertebrados bentónicos". Ministerio de Medio Ambiente, Confederación Hidrográfica del Ebro, 59 págs, 2005.
- 206 Rueda, J., Camacho, A., Mezquita, F., Hernández, R., Roca, J.R. "Effect of episodic and regular sewage discharges on the water chemistry and macroinvertebrate fauna of a Mediterranean stream". *Water, Air and Soil Pollution*, 140, 425-444, 2002.
- 207 McPherson, C., Chapman, P.M., deBruyn, A.M.H., Cooper, L. "The importance of benthos in weight of evidence sediment assessments- A case study". *Science of the Total Environment*, 394, 252-264, 2008.
- 208 Chapman, P.M. "Don't disregard the benthos in sediment quality assessments!". *Marine Pollution Bulletin*, 54, 633- 635, 2007.
- 209 Torres Gavilá, F.J. "Estudio faunístico, ecológico y ambiental de la fauna de anélidos poliquetos de sustratos sueltos de las islas Chafarinas (Mar de Alborán, S.W. Mediterráneo)". (Tesis Doctoral), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, 2008.
- 210 Ferraro, S.P., Swartz, R.C., Colé, F.A., Schults, D.W. "Temporal changes in the benthos along a pollution gradient: discriminating the effects of natural phenomena from sewage-industrial wastewater effects". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 33, 383-407, 1991.
- 211 Página web (<http://countrymeters.info/es/Gibraltar>). Consultado el 22/5/2015.
- 212 Memoria anual de la Asociación de Grandes Industrias. Disponible en internet en <http://agicg.es/memoria2012/memoria2013.pdf>.

-
- 213 Ouyang, Y., Higman, J., Thompson, J., O'Toole, T., Campbell, D. "Characterization and spatial distribution of heavy metals in sediment from Cedar and Ortega rivers subbasin". *Journal of Contaminant Hydrology*, 54, 19-35, 2002.
- 214 Jones, B., Turki, A. "Distribution and speciation of heavy metals in superficial sediments from the Tees estuary, north-east England)". *Marine Pollution Bulletin*, 34, 768-779, 1997.
- 215 Vives De Andrés, J.B. "Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros físicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos)". Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), 148 págs, 2003.
- 216 Estacio, F.J. "Distribución y variación espacio-temporal de las comunidades macrobentónicas del sedimento en las bahía de Algeciras. Implicaciones en la evolución de la calidad ambiental del medio marino". (Tesis Doctoral), Universidad de Sevilla, 1996.
- 217 Pearson, W.H., Woodruff, D.L., Sugarman, P.C., Olla, B.L. "Effects of oiled sediment on predation on the littleneck clam, *Protohaca staminea*, by the dungeness crab, *Cancer Magister Estuarine*". *Coastal Self Science*, 13, 445-454, 1981.
- 218 Collie, J.S. "Life history and production of three amphipod species on Georges Bank". *Marine Ecology Progress Series*, 22, 229-238, 1985.
- 219 Rosenberg, R. "Benthic macrofaunal dynamics, production, and dispersion in an oxygen-deficient estuary of west Sweden". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 26, 107-133, 1977.
- 220 Gray, J.S., Pearson, T.H. "Objective Selection of Sensitive Species Indicative of Pollution-Induced Change in Benthic Communities. I. Comparative Methodology". *Marine Ecology Progress Series*, 9, 111-119, 1982.
- 221 Young, D.K, Buzas, M.A., Young, M.W. "Species densities of macrobenthos associated with seagrass: a field experimental study of predation". *Journal of Marine Research*, 34, 577-592, 1976.
- 222 Rees, H.L. "A note on mesh selection and sampling efficiency in benthic studies". *Marine Pollution Bulletin*, 15, 225-229, 1984.
- 223 Guerra-García, J.M., Corzo, J.R., García-Gómez, J.C. "Distribución vertical de la macrofauna en sedimentos contaminados del interior del puerto de Ceuta". *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 19, 105-121, 2003.
- 224 Mucha, A.P., Teresa, M., Vasconcelos, S.D., Bordalo, A.A. "Macrobenthic community in the Douro estuary: relations with trace metals and natural sediment characteristics". *Environmental Pollution*, 121, 169-180, 2003.
- 225 Estacio, F.J., García-Adiego, E.M., Fa, D.A., García-Gómez, J.C., Daza, J.L., Hortas, F., Gómez-Ariza, J.L. "Ecological analysis in a polluted area of Algeciras Bay (Southern Spain): External "versus" internal outfalls and environmental implications". *Marine Pollution Bulletin*, 34, 780-793, 1997.
-

-
- 226 Sánchez-Montoya, M., Vidal-Abarca, M., Suárez, M. "Comparing the sensitivity of diverse macroinvertebrate metrics to a multiple stressor gradient in Mediterranean streams and its influence on the assessment of ecological status". *Ecological Indicators*, 10, 896-904, 2010.
- 227 Magurran, A.E. "Ecological diversity and its measurement". New Jersey:Princeton University Press, 1988.
- 228 Moreno, C.E. "Métodos para medir la biodiversidad". Publicaciones SEA, México, 2001.
- 229 Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D. "Incidence of Adverse Biological Effects Within Ranges of Chemical Concentrations in Marine and Estuarine Sediments". *Environmental Management*, 19(1), 81-97, 1995.
- 230 Centro de Estudios y Experimentación de Obras Publicas. "Recomendaciones para la gestion del material dragado en los puertos españoles". Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, Madrid, 1994.
- 231 Dassenakis, M., Adrianos, H., Depiazi, G., Konstantas, A., Karabela, M., Sakallari, A., Skoullou, M. "The use of various methods for the study of metal pollution in marine sediments, the case of Euvoikos Gulf, Greece". *Applied Geochemistry*, 18, 781-794, 2003.
- 232 Marín, B., Giresse, P. "Particulate manganese and iron in recent sediments of the Gulf of Lions continental margin (north-western Mediterranean Sea): deposition and diagenetic process". *Marine Geology*, 172, 147-165, 2001.
- 233 Kiratli, N., Ergin, M. "Partitioning of heavy metals in surface Black Sea sediments". *Applied Chemistry*, 11, 775-788, 1996.
- 234 Morillo, J., Usero, J., Gracia, I. "Partitioning of metals in sediments from the Odiel River (Spain)". *Environmental International*, 28, 263-271, 2002
- 235 Morillo, J., Usero, J., Gracia, I. "Potential Mobility of Metals in Polluted Coastal Sediments in Two Bays of Southern Spain". *Journal of Coastal Research*, 23, 352-361, 2007.
- 236 Rosado, D. "Estudio de la Calidad Ambiental de los Sedimento de la Ría de Huelva Mediante un Método Integrado (Tesis Doctoral), Departamento de Ingeniería Química y ambiental, Universidad de Sevilla, 2015.
- 237 Hudson-Edwards, K.A., Macklin, M.G., Curtis, C.D., Vaughan, D. "Mineralogical forms, processes of formation and distribution of Pb, Zn, Cd and Cu in the Tyne catchment basin, Northern Pennines, North East England". *Environmental Science and Technology*, 30, 72-80, 1996.
- 238 Dawson, E.J., Macklin, M.G. "Speciation of heavy metals in floodplain and flood sediments: a reconnaissance survey of the Aire Valley, West Yorkshire, Great Britain". *Environmental Geochemistry and Health*, 20, 67-76, 1998.
- 239 Moalla, S.M.N., Awadallah, R.M., Rashed, M.N., Soltaqn, M.E. "Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser".
-

-
- Hidrobiología, 364, 31-40, 1998.
- 240 Seiter, K., Hensen, C., Schröter, J., Zabela, M. "Organic carbon content in surface sediments—defining regional provinces". *Deep-Sea Research I* 51, 2001–2026, 2004.
- 241 C. Morales-Caselles, J. Kalman, C. Micaelo, A.M. Ferreira, C. Vale, I. Riba, et al., Sediment contamination, bioavailability and toxicity of sediments affected by an acute oil spill: Four years after the sinking of the tanker Prestige (2002)., *Chemosphere*. 71 (2008) 1207–13.
- 242 Biological Test Method: Reference Method for Determining the Toxicity of Sediment Using Luminescent Bacteria in a Solid-Phase Test - Science and Technology - Environment Canada, (2014).
- 243 C. Morales-Caselles, J. Kalman, C. Micaelo, A.M. Ferreira, C. Vale, I. Riba, et al., Sediment contamination, bioavailability and toxicity of sediments affected by an acute oil spill: Four years after the sinking of the tanker Prestige (2002)., *Chemosphere*. 71 (2008) 1207–13.
- 244 T.A. DelValls, A. Andres, M.J. Belzunce, J.L. Buceta, M.C. Casado-Martinez, R. Castro, et al., Chemical and ecotoxicological guidelines for managing disposal of dredged material, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 819–828.
- 245 M.C. Casado-Martínez, T. Campisi, A. Díaz, R. Obispo, J.F. Postma, I. Riba, et al., Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment, (2006).

VIII. ÍNDICES DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. Fracciones de contaminantes de los métodos de Tessier y BCR.....	22
2. Escala geométrica de Wentworth	55
3. Composición granulométrica de las muestras según la escala Wentworth	68
4. Criterios de calidad de concentración de metales en sedimentos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Composición mineralógica media de arenas y arcillas marinas (%).....	8
2. Compartimentos de contaminantes y sus interacciones en ecosistemas acuáticos	11
3. Bioacumulación de los contaminantes en la cadena trófica	13
4. Respuesta típica de los organismos a la concentración de contaminantes.....	13
5. Respuesta de los organismos a la concentración de metales esenciales	14
6. Mapa del Estrecho de Gibraltar	36
7. Núcleos urbanos de la bahía de Algeciras.....	37
8. Zona industrial en la bahía de Algeciras	39
9. Instalaciones del Puerto de Algeciras	41
10. Núcleos urbanos de la bahía de Cádiz	42
11. Astilleros de Navantia	45
12. Puerto de Cádiz	46
13. Vista global de las zonas objeto de estudio	48
14. Puntos de toma de muestra en la bahía de Algeciras	49
15. Puntos de toma de muestra en la bahía de Cádiz.....	50
16. Punto de toma de muestra en el litoral de Cádiz	50
17. Dragas de impacto de tipo Van Veen	51
18. Tratamientos previos de las muestras de sedimentos.....	52
19. Torre de tamices	54
20. Equipo de EAA con llama	56
21. Equipo de EAA con horno de grafito.....	56
22. Esquema de la extracción de la fracción soluble en ácido	57
23. Equipo de análisis de carbono orgánico total	58
24. Esquema del preensayo de toxicidad	59
25. Esquema de los cambios de luminosidad en función del tiempo.....	61
26. Esquema general del ensayo de toxicidad	62

27. Ejemplo de representación conjunta de los cinco índices	62
28. Evolución de las concentraciones totales de metales (mg/kg sedimento seco)	70
29. Porcentajes medios extraídos en la fracción soluble en ácido de BCR.....	73
30. Porcentajes de carbono orgánico total.....	75
31. Toxicidad de las muestras (UT/g)	76
32. Distribución del porcentaje de familias pertenecientes a los principales filos.....	77
33. Distribución del número de familias en cada punto de muestreo	78
34. Evolución de la abundancia (número de individuos/m ²)	79
35. Representación de los índices de contaminación.....	80
36. Representación conjunta de los 5 índices de las muestras de bahía de Cádiz.....	82
37. Representación conjunta de los 5 índices de las muestras de bahía de Algeciras	83
38. Evolución del índice de degradación ambiental (IDA)	85
39. Ejemplo de gráficas propuestas para evaluación de la calidad ambiental.....	86

IX. ANEXOS

Anexo1. Coordenadas y situación de los puntos de toma de muestra.

ZONA	PUNTO	CORDENADAS UTM	SITUACIÓN
Bahía de Cádiz	C1	X 206201'9	Playa de Santa Catalina
		Y 4056030'2	
	C2	X 210858'0	Playa de Valdelagrana
		Y 4052721'8	
	C3	X 209940'2	Playa de Levante
		Y 4049066'4	
	C4	X 209346'4	Puente Ramón de Carranza
		Y 4044870'7	
	C5	X 211345'7	San Fernando
		Y 4043246'3	
Litoral de Cádiz	LC	X 222330'4	Conil de la Frontera
		Y 4018351'7	
Bahía de Algeciras	A1	X 280508'1	Ensenada de Getares
		Y 4997685'3	
	A2	X 280173'5	Algeciras
		Y 4002567'5	
	A3	X 280922'1	Playa del Rinconcillo
		Y 4005027'3	
	A4	X 285235'4	Pantalán de Cepsa
		Y 4006716'1	
	A5	X 287206'8	La Línea de la Concepción
		Y 4004566'1	

Anexo 2. Abundancia de los organismos macrobentónico (individuos/m²).

FILO	GRUPO	FAMILIA	C1	C2	C3	C4	C5	LC	A1	A2	A3	A4	A5	
Acrania	Acrania	Acrania				45	56							
Annelida	Polychaeta	Ampharetidae	32					20	4		36			
		Capitellidae	340	116	80	45	36	112	4	116	280	24	128	
		Cirratulidae	35	40	120	105	84	40	4	32	260	32	76	
		Dorvilleidae				10								12
		Glyceridae	5		8	65	32	24	4	44	84	116	84	
		Hesionidae			96			4			32	68	100	
		Lumbrineridae	5	32	4	10	5	64	4	16	64	8		
		Magelonidae	5					4			76			
		Maldanidae	280		140	5	5	116	20	5	36	5	12	
		Nephtyidae	40	24	112	15	8	4	24	16	132	32	16	
		Nereidae				10								
		Onuphidae	30		20		8	4	12		120	16	252	
		Orbiniidae			8	20	32	36	52	32	8	24	128	
		Oweniidae						4						
		Paraonidae	10			20	4	148	44	32		8	208	
		Phyllodocidae	5	10	8	10				12	32	4	72	
		Pilargididae						4						
		Pisionidae			10									
		Poecilochaetidae			4	5		4		64	20	24		
		Sabellidae	20		8		20	20		5	84	16	236	
Serpulidae	20	24		5	5	4			4	16	24			
Sigalionidae	5					4	40	5	8	8	40			
Spionidae	305	184	80	180	132	220	44	116	280	116	132			
Syllidae		8		555	404	240	8	205	72	180	348			
Terebellidae												72		
Cnidaria	Hexacorallaria	Anémonas				5							24	
	Octocoralario	Pennatulaceo		4	4									
Crustacea	Amphidoda	Ampeliscidae	95	84	188			268	20		72	4	4	
		Aoridae				10	8	28		36	84	32	252	
		Caprellidae							8		16		342	
		Corophiidae	30	16	280			216	124		80	140	354	
		Dexaminidae		5									68	
		Gammaridae	4		40	5		4	4	8	32	4	142	
		Haustoridae	15	32				850	284					
		Isaeidae			84			16			104	164	320	
		Leucothoidae	5	15	164	5	4	32	16	16	20	8	100	
		Lysianassidae							40				80	
		Oedicerotidae	5		20		16	84	20		20	20	32	
		Philantidae											32	
		Phoxocephalidae									244		280	
		Podoceridae	5	64	28	5	4			5				
		Stenothoidae	5	5										
	Cumacea	Bodotriidae	95	95	56		4	64			28		16	
		Nannastacidae											68	
		Crangonidae		8				4						
	Decapoda	Diogenidae	225	104	20			104			12		40	
		Paguridae											16	
		Porcellanidae									44		20	
		Portunidae				5								
		Processidae									16		16	
	Isopoda	Anthuridae	5	5					68				16	
		Hyssuridae			44	5				5	24			
		Janiridae											36	
		Munnidae	20	60										
	Sphaeromatidae											36		
	Leptostraca	Leptostraca									148	4	4	
	Mysidacea	Mysidacea						60	4	5			4	
Tanaidacea	Apseudidae	240	64	240	5	8	670	540	8	140	16	342		
	Leptocheliidae			28						36		128		

Anexo 2. Continuación.

FILO	GRUPO	FAMILIA	C1	C2	C3	C4	C5	LC	A1	A2	A3	A4	A5	
Echinodermata	Echinoidea	Lovenidae							4					
	Ophiuræ	Amphiuridae	55	68	12			120	224		4		148	
		Ophiuridae			4									
Mollusca	Bivalvia	Anomiidae	10		4						56		52	
		Cardiidae	10	12	16	20	16		68	16	12	64	72	
		Corbulidae	45	60	112	35			4	32			4	
		Donacidae							156					
		Erycinidae							20					
		Kelliidae	5	16	32									
		Mactridae	30		8			140	432		336	8	8	
		Montacutidae							240		148			
		Nuculanidae						28			28			
		Nuculidae									24		60	
		Pandoridae	80	80	12			4						
		Pharidae		4	84									
		Semelidae	370	208	932				108		396			
		Tellinidae							156		248			
	Thracidae	280						16	16	32				
	Thyasiridae							4		68				
	Venereidae	100	68	16	15	8	180	108	98	180	16	48		
	Opisthobranchia	Pyramidellidae						4						
		Retusidae							32					
	Prosobranchia	Calyptraeidae		24				68	24		112		216	
		Cerithiidae						276						
		Marginellidae							20					
		Nassaridae	120					4						
Naticidae		4					4	4						
Rissoidae							4							
Trochidae												64		
Turridae							4							
Turritellidae						32								
Nemertini	Nemertini	Nemertinos	30	24	16	24	64	140	16	48	20	32	140	
Phoronidea	Phoronidea	Phoronidea						52	4				28	
Sipunculida	Sipunculida	Aspidosiphonidae	5	8									228	
Tunicata	Ascidia sp	Ascidia sp			88	5			8					
Turbellaria	Turbellaria	Turbellaria	5			40	32			32	4	16	8	

Anexo 3. Índices de diversidad de Shanon-Wiener y de equitatividad de Pielou.

ZONA	PUNTO	SHANON-WIENER	PIELOU
Bahía de Cádiz	C1	2,93	0,78
	C2	3,03	0,87
	C3	2,81	0,76
	C4	2,23	0,66
	C5	2,21	0,69
Litoral de Cádiz	LC	2,98	0,77
Bahía de Algeciras	A1	2,88	0,77
	A2	2,78	0,83
	A3	3,43	0,88
	A4	2,84	0,83
	A5	3,56	0,88