

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugarte z/g

E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 602 94 00 - Fax: +34 94 687 00 06

Parque Tecnológico de Bizkaia

Astondo Bidea - Edificio 609

E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaia. Portualdea, z/g

E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)

Tel.: +34 94 300 48 00 - Fax: +34 94 300 48 01

www.azti.es

info@azti.es

APLICACIÓN DE DISPOSITIVOS DE MUESTREO PASIVO COMO HERRAMIENTAS DE MEJORA FRENTE A LAS UTILIZADAS TRADICIONALMENTE PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTADO QUÍMICO DE LAS AGUAS SOMETIDAS AL IMPACTO DE VERTIDOS CONTINENTALES

INFORME FINAL

ACTIVIDADES 2011 Y 2012

para:

Agencia Vasca del Agua - Uraren Euskal Agentzia



Pasaia, 14 de diciembre de 2012

Tipo documento Informe final

Título documento Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas sometidas al impacto de vertidos continentales

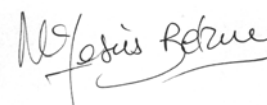
Fecha 19/12/2012

Proyecto Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas

Código IM11UraDGTs

Cliente Agencia Vasca del Agua- Uraren Euskal Agentzia

Equipo de proyecto: Dra. María Jesús Belzunce Segarra
Dña. Natalia Montero Ruíz
Dr. Joxe Mikel Garmendia Etxandi
Dra. Iratxe Menchaca Cortazar

A handwritten signature in black ink, appearing to read "María Jesús Belzunce Segarra".

Responsable proyecto Dra. María Jesús Belzunce Segarra

Si procede, este documento deberá ser citado del siguiente modo:

Belzunce Segarra MJ, N Montero, JM Garmendia, I Menchaca. 2012. Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas sometidas al impacto de vertidos continentales. Informe final elaborado por AZTI-Tecnalia para la Agencia Vasca del Agua- Uraren Euskal Agentzia. 27 pp.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
2.	OBJETIVOS	7
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1	ESTRATEGIA DE MUESTREO	8
3.2	DISPOSITIVOS DE MUESTREO PASIVO – DGTs. ANÁLISIS DE METALES	9
3.3	TÉCNICAS TIE	11
3.4	BIOENSAYOS IN SITU.....	12
3.5	ESTUDIOS DE DGTs PARA ANÁLISIS DE MERCURIO.....	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1	MUESTREADORES PASIVOS: DGTs	14
4.1.1	Cadmio.....	14
4.1.2	Níquel.....	15
4.1.3	Cobre.....	16
4.1.4	Plomo	17
4.1.5	Zinc.....	18
4.2	MUESTRAS DE AGUA COMPUESTA: TÉCNICAS TIE	19
4.3	BIOENSAYO IN SITU DE ERIZOS	21
4.4	MERCURIO MEDIDO MEDIANTE DIFERENTES TIPOS DE DGTs	22
5.	CONCLUSIONES	24
6.	BIBLIOGRAFÍA	25
7.	ANEXO	27
	Conferencias y Grupos de Trabajo	27
	Publicaciones	27

1. INTRODUCCIÓN

El proyecto titulado *“Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas sometidas al impacto de vertidos continentales”* (Ref. interna de AZTI IM11UraDGTs) sobre el cual se redacta este informe final, se integra en la segunda prórroga del Convenio de Colaboración entre la Agencia Vasca del Agua y la Fundación AZTI Fundazioa suscrito con fecha 7 de octubre de 2008.

El proyecto que aquí se presenta se plantea como la segunda parte del proyecto denominado *“Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras”* que se integró en la primera prórroga del Convenio de Colaboración entre la Agencia Vasca del Agua y la Fundación AZTI Fundazioa suscrito con fecha 7 de octubre de 2008. Este estudio previo surgió por la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitieran evaluar la presencia de contaminantes en el agua y la calidad de la misma, de acuerdo con las demandas de las nuevas directivas europeas. Por otra parte, conocemos las limitaciones a la hora de determinar la contaminación en medios caracterizados por una gran variabilidad, como son los medios estuáricos o costeros (cambios de salinidad, de pH, cambios redox, flujos de contaminantes,...). El grado de influencia de un vertido en estos medios también es muy variable y no es fácil, ni rentable de medir, por los métodos tradicionales.

Los muestreadores pasivos se constituyen en herramientas que mejoran las posibilidades analíticas y que permiten integrar en el tiempo la variabilidad de los contaminantes en el medio natural. Son científicamente reconocidas algunas de las ventajas que los muestreadores pasivos presentan frente al muestreo convencional del agua, como la posibilidad de analizar metales traza que se encuentran en bajas concentraciones, o la cuantificación de la fracción lábil de los contaminantes que es la fracción potencialmente biodisponible y de gran importancia ecotoxicológica, en la que centran su interés las nuevas directivas europeas.

En este sentido, se estudió la aplicabilidad de los muestreadores pasivos, en concreto de los Diffusive Gradient in Thin-Films, o DGTs, como herramientas de monitoreo para la evaluación del estado químico en las aguas de transición y costeras. Para ello se dispusieron DGTs en la zona externa e interna de los 12 estuarios principales de la Comunidad Autónoma del País Vasco y en un estuario de la costa vasco-francesa (estuario del Adour). De esta manera, se estudió el funcionamiento de los DGTs bajo un amplio rango de condiciones de salinidad y temperatura. Los resultados de este estudio, recogidos en el Informe 2009-2010 (Belzunce Segarra et al., 2011) mostraron las ventajas de estas nuevas técnicas frente a las tradicionales.

El objetivo del proyecto que aquí se presenta es estudiar la aplicabilidad de los muestreadores pasivos como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico en las aguas de transición y costeras; y validar los dispositivos de muestreo pasivo para la evaluación de la contaminación por metales traza provenientes de vertidos en el medio marino. Además, se pretende estudiar el funcionamiento de los DGTs frente a otros factores de variabilidad, como los cambios estacionales (época de lluvias frente a época seca) o la influencia de las mareas, y su aplicabilidad para evaluar la extensión de una pluma de vertido en las aguas de transición y costeras.

Por otro lado, es conocida la limitada aplicabilidad de los DGTs para el análisis de mercurio en el agua. Algunos estudios han mostrado que el gel (o membrana) de difusión que se utiliza normalmente en los DGTs (gel de poliacrilamida) puede fijar una parte más o menos importante del mercurio presente en el agua en forma Hg II (Bicak y Sherrington, 1995; Docekalova y Divis, 2005), por lo que los resultados obtenidos estarían subestimando la contaminación real en el medio. Hay pocos trabajos que hagan referencia a la utilización de los DGTs para medir mercurio

y son poco comparables entre ellos (DGTs constituidos de diferentes tipos de geles y de resinas, diferentes métodos de elución y de análisis). Además, todavía no existe un consenso sobre la metodología más adecuada para la medición de mercurio mediante DGTs.

Sin embargo, el mercurio es uno de los metales que, junto al cadmio, níquel y plomo, conforma las sustancias prioritarias que deben medirse dentro de los requerimientos de la Directiva Marco del Agua (DMA). Se hace, por tanto, necesario realizar estudios que permitan optimizar nuevas técnicas para las medidas de mercurio. Como la mayor parte de los metales presentes en el medio marino, el mercurio se encuentra en concentraciones muy bajas (traza). Medir la concentración del mercurio en la columna de agua requiere que las técnicas de muestreo sean 'ultra limpias', un proceso de filtrado y un análisis complejo, todo lo cual implica un verdadero reto.

Por todo lo mencionado anteriormente, en el estudio que aquí se presenta se propusieron dos objetivos principales:

- Estudiar la utilidad de los muestreadores pasivos para la evaluación del impacto producido por vertidos en el medio marino y
- Optimizar los muestreadores pasivos para el análisis de mercurio en el medio marino.

En este informe se describen las tareas realizadas y se muestran los resultados obtenidos durante los dos años de desarrollo del proyecto, 2011 y 2012.

La coordinación de este trabajo ha sido llevada a cabo por María Jesús Belzunce Segarra. En el desarrollo del mismo han colaborado Natalia Montero Ruíz, Iratxe Menchaca y Joxe Mikel Garmendia, de la Unidad de Investigación Marina de AZTI-TECNALIA, en Pasaia.

Nuestro agradecimiento se extiende a todos aquellos que han participado en las labores de muestreo y de análisis, sin los cuales no hubiera sido posible llevar a su término este trabajo: Carlos Erauskin, Miguel Ángel Santesteban, Ekaitz Erauskin, Iker Urtizberea, Inmaculada Martín, Joana Larreta, Mariví Lucero, Deniz Kukul y Naiara Serrano.

Expresamos también nuestra gratitud al apoyo técnico y humano de los laboratorios SGIKER_Geocronología (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, FEDER y FSE), donde se han llevado a cabo los análisis de metales en las resinas, con especial mención a José Ignacio Ibarguchi y Sonia García.

2. OBJETIVOS

Tal y como se ha indicado en el apartado introductorio en este estudio se propusieron dos objetivos generales:

- (1) Validar los dispositivos de muestreo pasivo para la evaluación de la contaminación por metales traza en las aguas afectadas por un vertido y sometidas a variabilidad estacional y marina.
- (2) Puesta a punto de la técnica DGTs para las medidas de contaminación por mercurio.

Para el cumplimiento del primero se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del funcionamiento de los DGTs en aguas afectadas por vertidos de aguas residuales durante la época seca y durante la época de lluvias.
- Determinar la dilución y especiación de los metales traza a distancias crecientes del punto de vertido.
- Establecer correlaciones entre la concentración lábil de metales traza determinada en los dispositivos de muestreo pasivo y los efectos tóxicos observados, con la finalidad de evaluar el riesgo ambiental asociado a los vertidos.

Para el cumplimiento del objetivo 1, a lo largo de 2011 se realizaron las siguientes tareas:

- Instalación de dispositivos de muestreo pasivo en el estuario del Oiartzun, en la época estival (junio 2011), en la zona de influencia del vertido y en una zona de no influencia.
- Análisis de las concentraciones de metales retenidos en las resinas de los DGTs.
- Toma de muestras de agua compuesta (recogidas durante un ciclo mareal) y desarrollo de bioensayos de erizo y aplicación de técnicas TIEs en el laboratorio.
- Realización de bioensayos in situ con erizos de mar.
- Estudio de las relaciones entre la contaminación detectada por DGTs y los efectos tóxicos observados en erizos de mar.

A lo largo de 2012 las tareas realizadas han sido las siguientes:

- Instalación de dispositivos de muestreo pasivo en el estuario del Oiartzun, en época de lluvias en la zona de no influencia y en la zona de influencia del vertido. Este muestreo se llevó a cabo en febrero y, posteriormente, en noviembre de 2012. Los resultados obtenidos del muestreo de noviembre no se presentan en este informe sino que se recogerán como anexo para presentar en 2013.
- Análisis de las concentraciones de metales retenidos en las resinas de los DGTs.
- Toma de muestras de agua compuesta (recogidas durante un ciclo mareal) y desarrollo de bioensayos de erizo y aplicación de técnicas TIEs en el laboratorio.
- Realización de bioensayos in situ con erizos de mar.
- Estudio de las relaciones entre la contaminación detectada por DGTs y los efectos tóxicos observados en erizos de mar.
- Puesta a punto de la técnica DGTs para las medidas de contaminación por mercurio (uno de los elementos prioritarios en la Directiva Marco y no contemplados en el proyecto anterior).

Para el cumplimiento del objetivo 2, se realizó una estancia de investigación en el laboratorio de Biogeoquímica y Ecotoxicología, del centro francés IFREMER, situado en La Seyne.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se describe la estrategia de muestreo y la metodología aplicada para el cumplimiento de los objetivos planteados.

3.1 ESTRATEGIA DE MUESTREO

Para este estudio se eligió como zona taller el estuario del Oiartzun, por ser éste un medio altamente alterado debido a la alta actividad industrial y urbana en la zona. En la actualidad los vertidos en el estuario están canalizados, por lo que se decidió tratar el río Oiartzun como un vertido *per se*, ya que en estudios previos se ha observado la gran carga metálica que presenta.

Se diseñó un plan de muestreo basado en una malla de puntos en la zona de influencia del vertido y aguas arriba de la misma (Figura 1).



Figura 1. Mapa del estuario del Oiartzun donde se han señalado las estaciones de muestreo, comenzando por la más interior (1) hasta la más exterior del estuario (12).

Las primeras campañas de muestreo se llevaron a cabo en verano de 2011. La intención era repetir este mismo muestreo en otoño/invierno de 2011 para coincidir con la época de lluvias y con el objetivo de estudiar la influencia de los parámetros ambientales en la disponibilidad de los metales traza. Sin embargo, las condiciones meteorológicas de 2011 obligaron a retrasar el muestreo a febrero de 2012. Posteriormente, en noviembre de 2012, se realizó un tercer muestreo con el ánimo de encontrar condiciones ambientales más óptimas que las dadas en febrero (mayor pluviosidad, mayor temperatura en la columna de agua) para el cumplimiento de los objetivos inicialmente planteados en el estudio. En todos los muestreos se tuvieron en cuenta las variaciones mareales.

En las estaciones seleccionadas (12 estaciones), según se muestra en la Figura 1, se instalaron los muestreadores pasivos y se realizaron de manera rutinaria mediciones *in situ* de los parámetros oceanográficos: temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto. También se utilizó la profundidad de visión del disco de Secchi como medida indicativa de la transparencia de las aguas e, indirectamente, de la turbidez.

Al cabo de aproximadamente 10 días se retiraron los dispositivos de muestreo pasivo para proceder al análisis de la concentración de metales en el laboratorio. Se analizaron cinco de los metales de mayor relevancia ecotoxicológica; cobre, cadmio, níquel, plomo y zinc.

Paralelamente, en 5 estaciones situadas dentro del puerto de Pasaia (estaciones 8 a 12, Figura 1), donde la salinidad registrada es la adecuada para llevar a cabo los bioensayos de erizo, se tomaron muestras de agua compuesta (esto es, mezclando agua recogida cada 3 horas, en la misma estación, durante un ciclo mareal). Estas muestras se utilizaron para la realización de bioensayos en el laboratorio y técnicas TIE (ver apartado 3.3), con el fin de correlacionar la fracción lábil de los metales con los efectos tóxicos observados. Para los bioensayos se utilizaron larvas de erizo de mar de la especie *Paracentrotus lividus*.

En las 5 estaciones situadas dentro del puerto de Pasaia (estaciones 8 a 12), se realizaron pruebas de bioensayos in situ con larvas de erizo de mar. En este caso la fecundación se realizó en el laboratorio y los huevos fecundados se introdujeron en botes que se sumergieron en las estaciones (Figura 2). Se dejaron en el medio durante 48 horas y posteriormente se recogieron y se fijaron con formol.

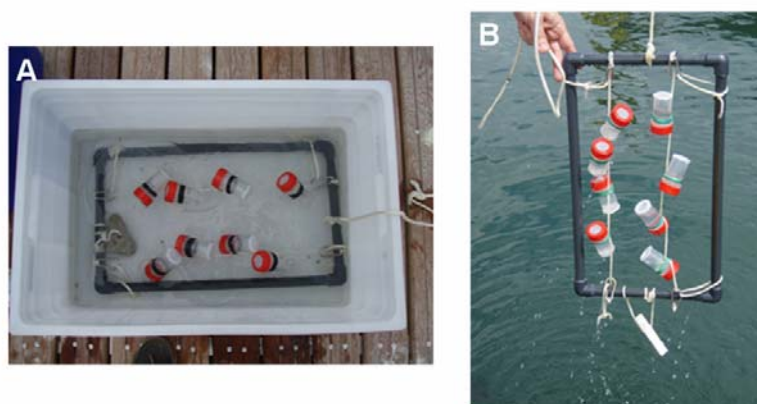


Figura 2. Bioensayo in situ de erizos. A) Recipiente donde se trasladan los vasos con huevos fecundados de erizo para que se mantengan hidratados de forma continua. B) Estructura que se sumerge en el agua durante 48 horas para llevar a cabo el bioensayo in situ.

3.2 DISPOSITIVOS DE MUESTREO PASIVO – DGTs. ANÁLISIS DE METALES

Los DGTs, del inglés *Diffusive Gradient in Thin-Film*, son pequeños dispositivos de teflón que tienen una ventana de contacto con la solución de 2 cm de diámetro (Figura 3A) y constan de tres membranas (Figura 3B): la membrana exterior es un filtro de diámetro de poro de 0,45 μm que evita la abrasión de las partículas; la membrana de difusión es de poliacrilamida (0,8 mm de grosor) y su función es limitar la difusión de los metales dependiendo de su capacidad de disociación de los complejos orgánicos e inorgánicos; la membrana inferior está compuesta de poliacrilamida y en ella se encuentra inmersa la resina Chelex-100 en la que se retienen los metales.

Una vez que el dispositivo se sumerge en el agua, los metales difunden a través de la membrana de difusión. Los metales libres se acumularán en la resina Chelex directamente, mientras que aquellos metales asociados a complejos orgánicos e inorgánicos solo se acumularán si son capaces de disociarse del complejo durante su difusión. Es decir, solo se acumularán aquellos metales que sean fácilmente dissociables y que, por tanto, serían más accesibles para los organismos.

Debido a la gran afinidad del Chelex-100 por los metales, se consigue una concentración del metal cercana a cero entre la membrana de difusión y la resina Chelex, lo que favorece que los metales se acumulen constantemente en el dispositivo, aun cuando las concentraciones en el agua sean traza. Por lo tanto, el dispositivo acumula de una manera constante y permite integrar la concentración de metales a lo largo del tiempo de estancia en el medio (Figura 4).

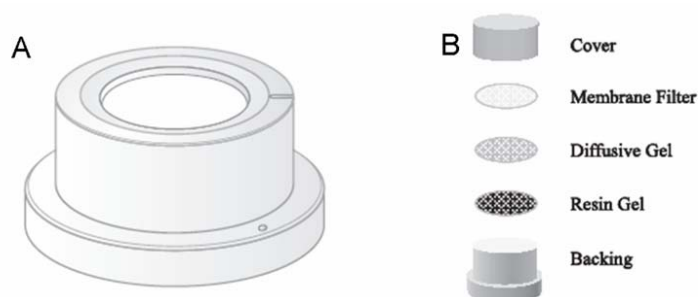


Figura 3. A) Muestreador pasivo (Diffusive Gradient in Thin-Film; DGT), B) estructura interna del DGT con sus tres membranas: filtro, membrana de difusión y resina de Chelex-100.

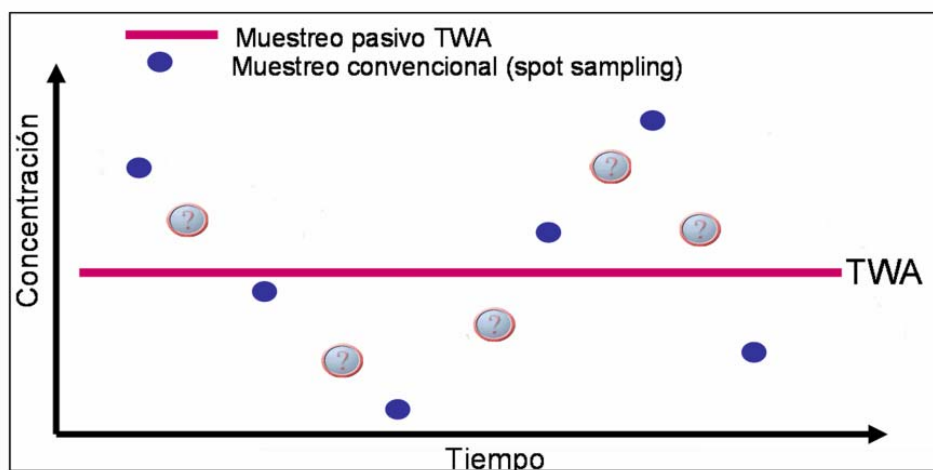


Figura 4. Diferencias del tipo de información logrado mediante el muestreo convencional (datos puntuales) y los muestreadores pasivos (TWA: promedio de la concentración durante el tiempo de estancia en el medio).

Tras la exposición en el agua, los DGTs se recogen y se conservan a 4°C hasta procesarse para su análisis. Previamente al análisis, se retira la membrana Chelex y se sumerge en 1M HNO₃ durante al menos 24 horas para garantizar la correcta extracción de los metales acumulados en la resina. Posteriormente se analiza la concentración de metales en la solución ácida mediante ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

Una vez que se ha medido la concentración de metales en la solución ácida (C_e), se calcula la masa de metal acumulada (M) en la resina Chelex-100 (Eq. 1).

$$M = C_e (V_g + V_{\text{HNO}_3}) / f_e$$

Donde C_e es la concentración de metal medido en la disolución de ácido nítrico, V_g y V_{HNO_3} son el volumen del gel y del ácido nítrico, respectivamente, y f_e es el factor de elución (el ratio de metal que es extraído de la resina).

Posteriormente, mediante una sencilla ecuación (Eq. 2), se puede calcular la concentración de metal lábil (C_b) en la columna de agua durante el tiempo de exposición de los DGTs.

$$C_b = (M \Delta g / D t A)$$

Donde M es la masa de metal acumulada en la resina, Δg es el grosor de la membrana de difusión, D es el coeficiente de difusión del metal, t el tiempo de estancia del dispositivo DGT en el medio y A es el área de exposición del dispositivo.

Como ya se ha dicho anteriormente, se analizaron cinco de los metales de mayor relevancia ecotoxicológica; cobre, cadmio, níquel, plomo y zinc. El análisis de metales se llevó a cabo mediante ICP-MS. La calibración del mismo se realizó a partir de soluciones monoelementales de 1000 ppm diluidas al entorno esperado para la muestra. Para el control de la calidad de los resultados se emplearon soluciones multielementales (QC), preparadas de manera análoga a las de la calibración.

3.3 TÉCNICAS TIE

Las técnicas TIE, del inglés *Toxicity Identification Evaluation*, son una serie de métodos de fraccionamiento diseñados para caracterizar, de una manera precisa, los compuesto(s) químicos responsable(s) de la toxicidad de una muestra. Para ello, se reduce o se elimina la biodisponibilidad de los contaminantes mediante manipulaciones físicas y químicas (USEPA 1991).

Los tres grupos de contaminantes más característicos son los compuestos orgánicos, los metales y el amonio, por lo que se utilizaron manipulaciones dirigidas a reducir estos compuestos en las muestras de agua.

Los tratamientos que se han aplicado a las muestras están descritos en USEPA (2007). Por lo tanto, para cada muestra partimos inicialmente de dos submuestras, la muestra original (sin manipular) y la muestra tratada para los diferentes contaminantes (Figura 5).

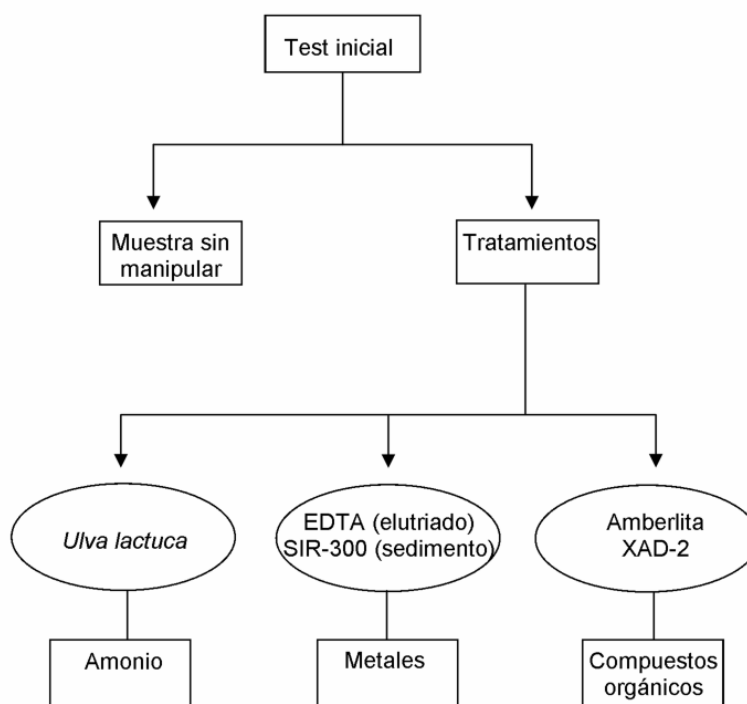


Figura 5. Esquema de las técnicas TIE, describiendo los diferentes tratamientos aplicados para cada grupo de contaminantes.

Finalmente, cada muestra es testada mediante el correspondiente bioensayo (en este caso, mediante el desarrollo larvario del erizo), con el fin de observar la reducción en la toxicidad. La comparación con la muestra original permite determinar que tratamiento ha sido efectivo (si se ha reducido de manera significativa la toxicidad), y por tanto identifica el grupo de contaminantes responsable de la toxicidad.

3.4 BIOENSAYOS *IN SITU*

En 5 estaciones seleccionadas, con la salinidad adecuada para el desarrollo de larvas de erizo de mar, se llevaron a cabo test de toxicidad en condiciones naturales (estaciones 8 a 12, véase Figura 1).

Se utilizó la especie *Paracentrotus lividus*. Se realizó la fecundación *in vitro* en el laboratorio e inmediatamente los huevos recién fecundados se traspasaron a pequeños viales en los que uno de los extremos se cierra con un tamiz de tamaño 0,22 μm que permite el paso del agua pero no de los huevos (Figura 2). A los pocos minutos los viales conteniendo los huevos fecundados se sumergieron en las estaciones de estudio y se dejaron en el medio durante 48 horas. Pasadas las 48 horas se recogieron y se fijaron con formol. Posteriormente, se contaron las larvas bien desarrolladas mediante un microscopio invertido y se calculó el porcentaje de éxito embrionario.

3.5 ESTUDIOS DE DGTs PARA ANÁLISIS DE MERCURIO

Debido a que existen pocos trabajos que hayan probado los DGT para mercurio en el campo y que no hay un consenso sobre el tipo de DGT (diferentes tipos de gel y resina), ni sobre las técnicas de elución y su posterior análisis, se llevó a cabo este estudio con el fin de responder a estas cuestiones fundamentales para el uso operacional de la técnica.

Por lo tanto, el objetivo principal fue testar y validar los DGTs específicos para mercurio, con el fin de incluir el mercurio en la lista de metales que pueden medirse mediante la técnica DGT.

Se realizó un esfuerzo especial en la elección del método de análisis del mercurio (medida directa por vía 'seca' o por vía 'húmeda' tras una fase de extracción) (Clarisse y Hintelmann, 2006; Best et al, 2009; Clarisse et al, 2009; 2011; 2012; Fernández-Gómez et al, 2011; Gao et al, 2011).

Se fabricaron DGTs con 3 diferentes combinaciones de geles de difusión y resinas quelantes (Agarosa-Spheron-thiol; Agarosa-Chelex y Poliácridamida-Spheron-thiol) (Tabla 1), que se testaron en agua de mar con concentraciones previamente conocidas de mercurio. Así mismo, se testaron diferentes técnicas de extracción por vía 'húmeda' (agua regia y tiourea) y diferentes técnicas analíticas, por vía 'húmeda' (ICP-MS) y por vía 'seca' (CV-AAS).

Tabla 1. Relación de los tipos de DGTs fabricados según la composición de gel y resinas utilizadas.

	Gel	Resina	Acrónimo
DGT Hg "normal"	Agarosa	Spheron-thiol	AS
DGT combinación 1	Poliácridamida	Spheron-thiol	PS
DGT combinación 2	Agarosa	Chelex 100	AC

El funcionamiento de los 3 tipos de DGTs obtenidos se estudió en un experimento piloto en el laboratorio según se describe a continuación:

Se utilizó agua de mar que se recogió frente a las instalaciones de Ifremer y, sin filtrar, se vertió en tres reactores de plástico (previamente lavados con ácido para evitar cualquier tipo de contaminación adicional). Cada una de las cubetas se rellenó con 10 litros de agua de mar y se agitó en continuo (agitador orbital) (Figura 6).

En dos de las cubetas se añadió un patrón de mercurio para obtener concentraciones en el orden de 1 y 2 $\mu\text{g/L}$. Tras un tiempo de equilibrio (24 h), los tres tipos de DGTs (9 dispositivos por cada tipo de DGT) se sumergieron en las cubetas. Se cogió una muestra de agua en cada cubeta al inicio y al final de la experimentación para medir la evolución en la concentración del mercurio mediante CV-AFS (*Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectroscopy*) (Cossa et al. 2003).

En cada lote de DGT utilizado se realizaron “blancos de laboratorio”. Estos blancos (en triplicado) correspondieron a DGTs de cada tipo utilizado y que siguieron el mismo tratamiento (recuperación de la resina, elución, análisis) que los DGTs sumergidos. En la Figura 7 se ha representado de manera esquemática el protocolo de experimentación seguido, donde los botes azules representan los reactores con los DGTs, y en el cuadro inferior se resume los tipos de extracción utilizados (filas) y la técnica de análisis empleada (columnas).



Figura 6. Diseño experimental de los reactores y los agitadores orbitales (izquierda). DGTs sumergidos en uno de los reactores (derecha).

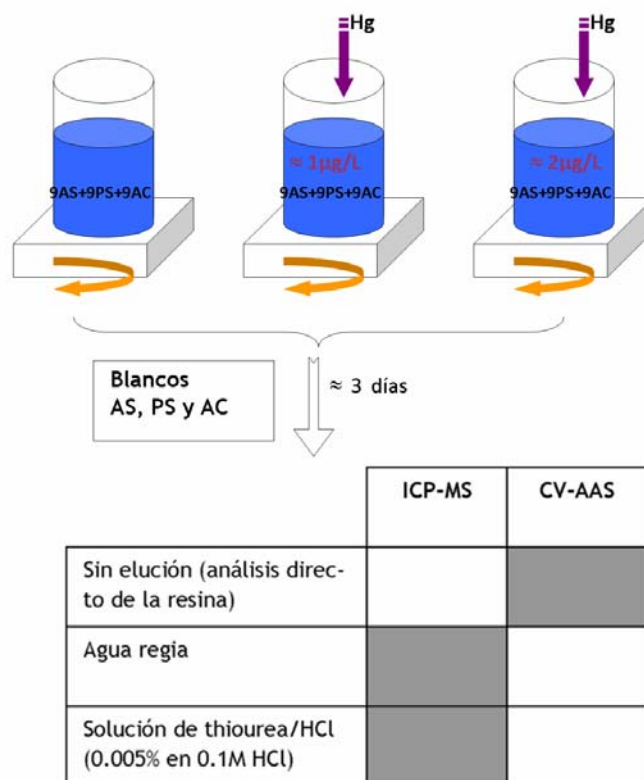


Figura 7. Protocolo experimental representando los reactores con los DGTs (AS: DGT gel agarosa-resina Sphéron-thiol; PS: DGT gel poliacrilamida-resina Sphéron-thiol; AC: DGT gel agarosa-resina Chelex 100) y esquema que resume los tipos de extracción aplicados y las técnicas de análisis utilizadas. ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, CV-AAS: *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se discuten conjuntamente los resultados obtenidos en las campañas de verano 2011 y de febrero 2012.

4.1 MUESTREADORES PASIVOS: DGTs

4.1.1 CADMIO

Los resultados de cadmio medidos en el estuario del Oiartzun en condiciones secas se han representado en la Figura 8. Aunque también se realizó el muestreo en condiciones de lluvia, debido a problemas analíticos en la medición de las muestras, esos resultados no se han representado gráficamente.

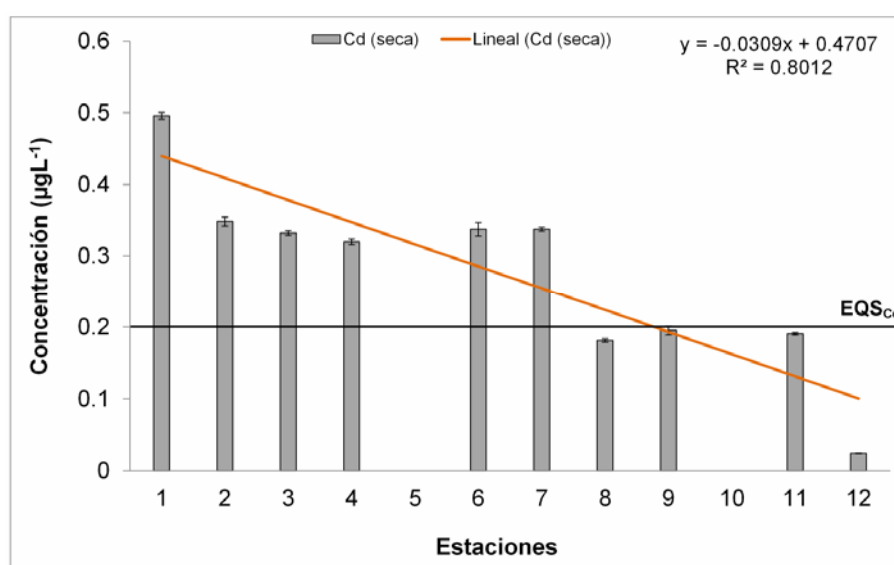


Figura 8. Concentración de la fracción lábil de cadmio en la columna de agua, medida mediante los DGTs. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. La línea negra representa el estándar de calidad (EQS). También (en color naranja) se muestra la tendencia lineal en la concentración de cadmio con respecto a las estaciones (1 representa el río y 12 la zona de mayor influencia marina).

En el caso del cadmio, la mayor parte del metal que está disuelto se encuentra en forma lábil (Munksgaard y Parry, 2003), por lo que las concentraciones medidas mediante DGTs podrían ser similares a las que se medirían mediante las técnicas convencionales (i.e. filtrado por 0,45 μm , preconcentrado).

La concentración de cadmio medida en las estaciones más interiores y de influencia fluvial (estaciones 1 a 7, rango de las concentraciones 0,32-0,50 $\mu\text{g/L}$) fue superior al estándar de calidad (EQS; acrónimo en inglés de *Environmental Quality Standards*) establecido por las directivas europeas para dicho metal (EQS Cd, 0,2 $\mu\text{g/L}$). Algunas estaciones del estuario presentaron concentraciones ligeramente por debajo del estándar de calidad: estaciones 8 (0,18 $\mu\text{g/L}$), 9 (0,19 $\mu\text{g/L}$) y 11 (0,19 $\mu\text{g/L}$) (Figura 8).

Además, gracias a la capacidad de preconcentración de los DGTs, fue posible medir este metal incluso a concentraciones muy bajas, que se encuentran por debajo del límite de detección de las técnicas analíticas convencionales (estación 12; 0,03 $\mu\text{g/L}$). Esto supone una ventaja adicional, ya que los metales, incluso en concentraciones muy bajas, tienen una gran importancia

ecotoxicológica debido a la interacción con los diferentes contaminantes presentes en el medio (sinergismos, adición, antagonismo).

En términos generales, el cadmio (Cd) presentó una dilución en su concentración desde las estaciones interiores hacia la bocana del estuario en las condiciones meteorológicas secas (Figura 8, obsérvese la línea de tendencia). Sin embargo, en la zona intermedia (estaciones 6 y 7) se observó un ligero aumento en la concentración. Diferentes autores se han referido a este comportamiento como típico del cadmio en medios en los que se produce un aumento en la salinidad, causando la desorción del Cd de las partículas para formar complejos de cloro que se encuentran en forma disuelta y lábil (Turner, 1996; González et al., 2006). Es en estas estaciones, 6 y 7, en donde se produce un incremento notable de la salinidad, pasando de valores de salinidad media de 1,6 ups en las estaciones anteriores (1 a 5) a salinidades de 24,7 usp en la estación 7. Por tanto, en estas estaciones se sitúa la zona de mezcla, caracterizada por cambios bruscos en los parámetros físico-químicos que afectan a la especiación de los metales.

4.1.2 NÍQUEL

Los resultados de níquel medidos en el estuario del Oiartzun en condiciones secas y de lluvia se han representado en la Figura 9.

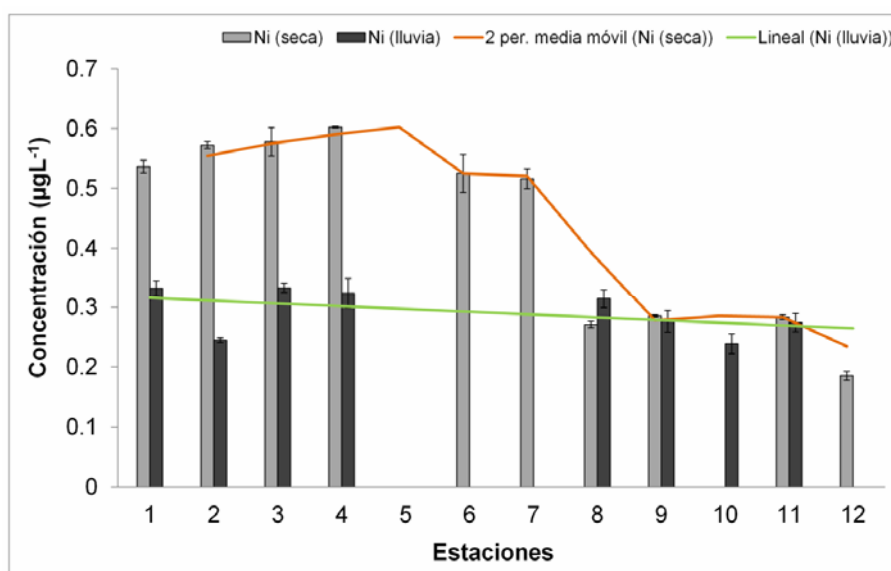


Figura 9. Concentración de la fracción lábil de níquel en la columna de agua, medida mediante los DGTs. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. Se han representado también las líneas de tendencia de la concentración de níquel con respecto a las estaciones (1 representa el río y 12 la zona de mayor influencia marina) en la época seca (naranja) y de lluvia (verde).

En condiciones secas (Figura 9), se observó un patrón de dilución desde las estaciones fluviales a la zona marina y se pudieron distinguir dos zonas con diferente rango de concentración de níquel: una zona que agrupa las estaciones más fluviales (estaciones 1 a 7; concentración en el rango 0,52-0,60 μgL^{-1}) y otra zona estuárica (estaciones 8 a 12; concentración en el rango 0,18-0,29 μgL^{-1}).

Tueros et al. (2009) también observó la dilución del níquel disuelto (muestras de agua filtradas por 0,45 μm), con el aumento de la salinidad.

En cambio, en la época de lluvias se observó una distribución bastante homogénea del níquel a lo largo del estuario (rango 0,24-0,33 μgL^{-1}). Esta distribución podría deberse al aumento del caudal en las condiciones de lluvia, lo que supondría una dilución del Ni presente en la zona fluvial y su arrastre a la zona estuárica y costera. Esto explicaría que en las estaciones fluviales (estaciones 1

a 4) la concentración de níquel en la época seca fuese el doble que en la época de lluvias (Figura 9).

Con respecto a la anterior afirmación, Martino et al. (2004) también observó que la concentración total de níquel en el río era inversa al caudal fluvial, sugiriendo que esto se debía a la dilución de las fuentes naturales y antrópicas presentes en la cuenca. Además un mayor caudal del río, supondría una mayor propagación del mismo en el estuario, disminuyendo así la influencia de la marea, lo que explicaría la distribución homogénea del níquel en todo el estuario.

4.1.3 COBRE

Los resultados referentes al cobre medido en condiciones secas y de lluvia se muestran en la Figura 10.

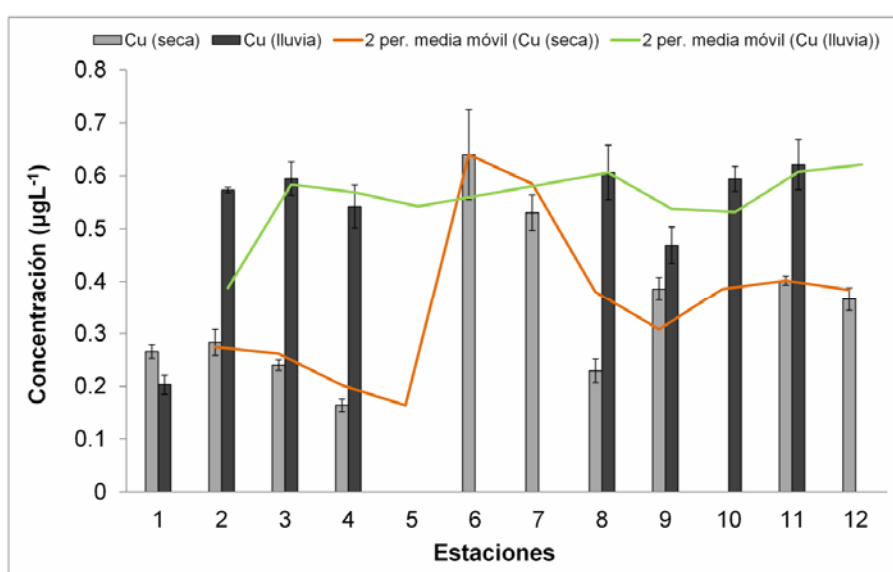


Figura 10. Concentración de la fracción lábil de cobre en la columna de agua, medida mediante los DGTs. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. Se han representado también las líneas de tendencia de la concentración de cobre con respecto a las estaciones (1 representa el río y 12 la zona de mayor influencia marina) en la época seca (naranja) y de lluvia (verde).

En condiciones secas, el cobre proveniente del río (estación 1) supuso $0,27 \mu\text{gL}^{-1}$, disminuyendo hasta $0,16 \mu\text{gL}^{-1}$ en la estación 4. Sin embargo, hubo un aporte importante de cobre en la estación 6, donde se observó una concentración de $0,64 \mu\text{gL}^{-1}$.

El cobre presenta una gran afinidad por la materia orgánica, con la que forma complejos orgánicos estables (Munksgaard y Parry, 2003). Por ello, el aumento repentino de la concentración en la estación 6 podría deberse a la disociación del cobre en esta zona de mezcla, debido a los bruscos cambios físico-químicos que tienen lugar allí. Esto supondría un cambio en la especiación del cobre, pasando de estar acomplejado a una forma más lábil y por tanto, acumulable en los DGTs. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que las estaciones 6 y 7 se encuentran cercanas a diferentes presiones, que posiblemente impliquen un aporte adicional de cobre (vías del tren, autopista, carga y descarga de vehículos en la zona portuaria, etc.).

Además, en condiciones secas la concentración de cobre en la zona estuárica (estaciones 9 a 12) fue mayor que en las estaciones fluviales (estaciones 1 a 4). Esto también se había observado en el ejercicio anterior (descrito en el informe de 2009-2010, tareas 2010), donde los estuarios que presentaban un aumento en la concentración de cobre en la zona exterior (Butrón, Oka, Artibai, Deba, Oiartzun y Adour) eran aquellos que tenían puertos comerciales o recreativos en su parte

exterior. Por lo tanto, este cobre podría provenir de las pinturas *antifouling* que se utilizan en los cascos de los barcos (Warnken et al. 2004; Dunn et al. 2007; Montero et al., 2012).

En condiciones de lluvia (Figura 10) se observó que el cobre presente en la zona fluvial no provenía del río, ya que en la estación 1 se midió la concentración más baja ($0,20 \mu\text{gL}^{-1}$). Sin embargo, se observaron dos aportes importantes de cobre, uno en el núcleo urbano de Rentería (estaciones 2 a 4; concentraciones en el rango $0,54-0,60 \mu\text{gL}^{-1}$) y otro en el núcleo urbano de San Juan (estaciones 10 y 11; en el rango $0,59-0,62 \mu\text{gL}^{-1}$).

Lo anterior está en concordancia con las observaciones de Mosley y Peake (2001), que sugirieron que las escorrentías urbanas son la fuente más importante de cobre en las cuencas. Además, la estación 10 se encuentra próxima al astillero Zamakona, lo que también podría generar un aporte adicional de cobre al sistema.

Los DGTs de las estaciones 6 y 7 desaparecieron en el experimento llevado a cabo en la época de lluvias. No obstante, observando el aumento en la concentración de cobre entre las estaciones 4 ($0,54 \mu\text{gL}^{-1}$) y 8 ($0,61 \mu\text{gL}^{-1}$), podríamos esperar un comportamiento similar en las estaciones 6 y 7 al observado en la campaña de muestreo llevada a cabo en condiciones secas (Figura 10).

La concentración de cobre fue mayor en condiciones de lluvia que durante condiciones secas (Figura 10). Como ya hemos mencionado, esto seguramente se deba a los aportes provenientes de las escorrentías urbanas y pluviales. Además, hay que matizar que la cuenca del Oiartzun es rica en cobre (Belzunce et al. 2004) y que el aumento del caudal fluvial podría suponer la resuspensión del cobre presente en los sedimentos, lo que también favorecería el aumento de la concentración de este metal en el agua.

4.1.4 PLOMO

Los resultados de plomo obtenidos mediante los DGTs en condiciones secas y de lluvia se ilustran en la Figura 11.

Se observó un comportamiento opuesto del plomo en ambas campañas. En condiciones secas se midió una concentración mayor en las estaciones fluviales (estaciones 1 a 4; en el rango $0,20-0,27 \mu\text{gL}^{-1}$) que en las estuáricas (estaciones 8 a 12; en el rango $0,02-0,13 \mu\text{gL}^{-1}$). Opuestamente, en condiciones de lluvia, se midió una concentración mayor en las estaciones estuáricas (estaciones 8 a 11; en el rango $0,20-0,25 \mu\text{gL}^{-1}$) que en las fluviales (estaciones 1 a 4; en el rango $0,08-0,13 \mu\text{gL}^{-1}$).

El plomo es un metal altamente reactivo con las partículas, lo que supone que la concentración disuelta del mismo esté controlada en gran medida por la presencia del material en suspensión (Tueros et al. 2009). En condiciones de lluvia aumenta el flujo del río, lo que supone mayor aporte de partículas y resuspensión del sedimento, que puede reaccionar con el plomo disuelto presente en la columna de agua. El plomo adsorbido en las partículas no sería medido mediante los DGTs, lo que explicaría la baja concentración de plomo obtenida en condiciones de lluvia en la zona fluvial.

Sin embargo, en las estaciones 6 y 7, donde parece que está situada la zona de mezcla, podría darse la desorción del plomo de las partículas pasando a una forma lábil y medible por los DGTs. Esto explicaría el aumento del plomo en las estaciones estuáricas.

En condiciones secas, al igual que pasó con el cobre, hay un aumento substancial de la concentración de plomo en la zona de mezcla, esto es, en las estaciones 6 ($0,28 \mu\text{gL}^{-1}$) y 7 ($0,32 \mu\text{gL}^{-1}$) pero sin embargo, decae drásticamente en la estación 8 ($0,02 \mu\text{gL}^{-1}$).

Teniendo en cuenta el menor flujo del río en verano, la disminución de la velocidad del mismo al internarse en la zona portuaria (con mayor volumen de agua de mar) podría suponer la precipitación del plomo, lo que explicaría la baja concentración medida en la estación 8.

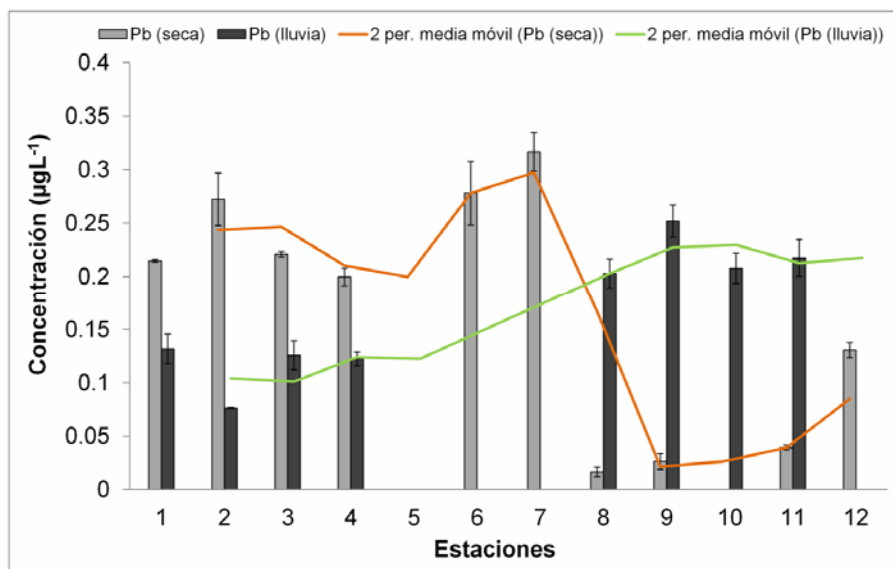


Figura 11. Concentración de la fracción lábil de plomo en la columna de agua, medida mediante los DGTs. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. Se han representado también las líneas de tendencia de la concentración de plomo con respecto a las estaciones (1 representa el río y 12 la zona de mayor influencia marina) en la época seca (naranja) y de lluvia (verde).

4.1.5 ZINC

Los resultados de zinc obtenidos mediante los DGTs en las condiciones secas y de lluvia se muestran en la Figura 12.

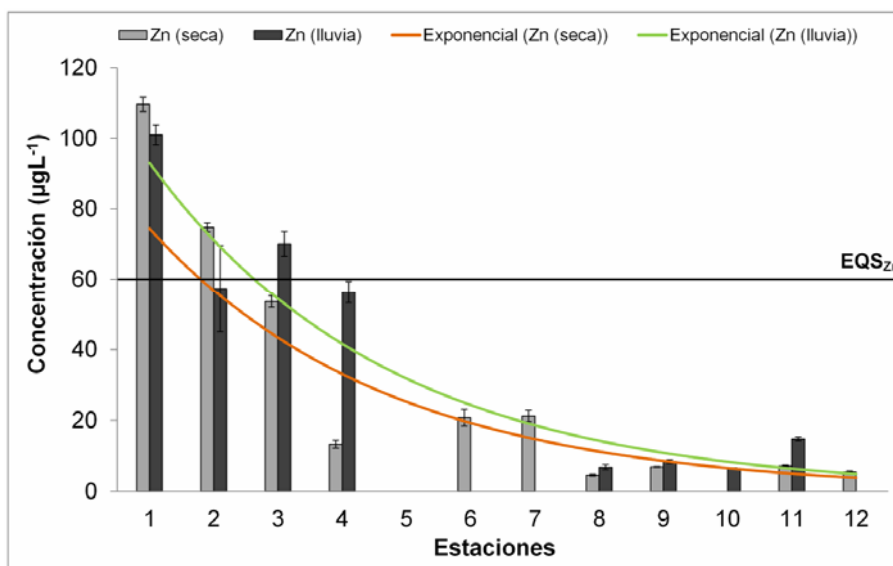


Figura 12. Concentración de la fracción lábil de zinc en la columna de agua, medida mediante los DGTs. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. La línea negra representa el estándar de calidad (EQS). Se han representado también las líneas de tendencia de la concentración de plomo con respecto a las estaciones (1 representa el río y 12 la zona de mayor influencia marina) en la época seca (naranja) y de lluvia (verde).

Se pudo observar claramente una reducción exponencial en la concentración de zinc, tanto en condiciones secas como de lluvia (líneas de tendencia en la Figura 12). En ambas condiciones

hidrológicas, el comportamiento del zinc fue muy similar, siguiendo un patrón de dilución desde el interior hacia la bocana del estuario.

Hay que destacar que el estándar de calidad (EQS) del zinc se superó en las estaciones fluviales en varias ocasiones: estaciones 1 ($110 \mu\text{gL}^{-1}$) y 2 ($75 \mu\text{gL}^{-1}$) en condiciones secas, y estaciones 1 ($101 \mu\text{gL}^{-1}$) y 3 ($70 \mu\text{gL}^{-1}$) en condiciones de lluvia (Figura 12).

4.2 MUESTRAS DE AGUA COMPUESTA: TÉCNICAS TIE

En las muestras de agua compuesta recogidas en condiciones secas (Figura 13), se observó un incremento en la supervivencia de las larvas de erizo desde la estación más interior, situada dentro del puerto (estación 8), hacia la exterior, situada en la bocana (estación 12). No obstante, en ningún caso la supervivencia llegó a los niveles del control (89% de larvas bien desarrolladas) y además, presentó diferencias superiores al 20% y estadísticamente significativas, lo cual indicó que todas ellas podían ser clasificadas como tóxicas.

Para explicar este hecho, una de las hipótesis que se baraja es el aumento, en condiciones secas, de la importancia relativa de la marea con respecto a la influencia del río y las escorrentías. En verano, con bajo caudal fluvial, la marea es la que determina la hidrodinámica del estuario. Por lo tanto, cabe esperar que la estación más exterior y más influida por la marea (y por tanto con mayor aporte de agua limpia) presente los niveles más bajos de toxicidad.

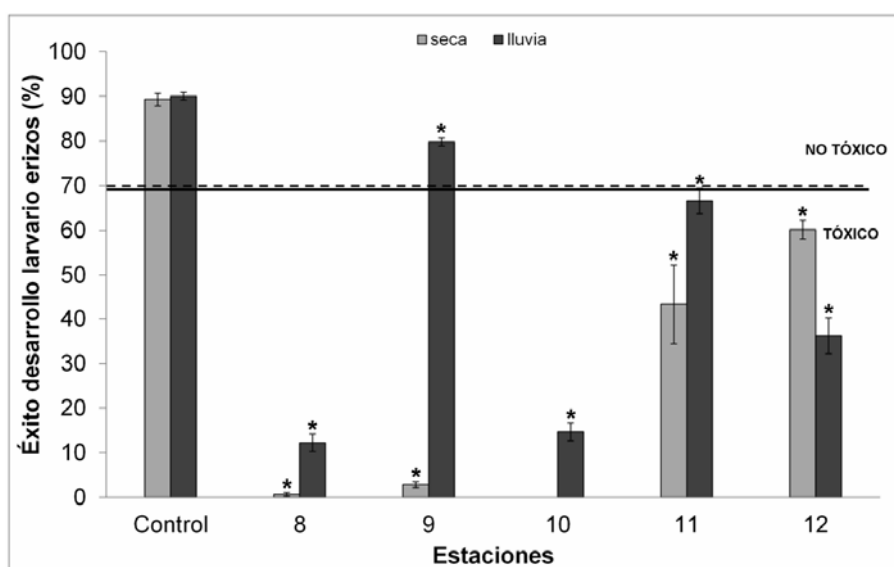


Figura 13. Porcentaje de éxito de desarrollo de las larvas de erizo expuestas a muestras de agua compuestas (en condiciones secas y de lluvia). Las columnas de color gris representan las condiciones secas y las negras las condiciones de lluvia. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control del mismo color ($p < 0,05$). Las líneas representan el 20% de diferencia con respecto al control (línea continua=condiciones secas; línea discontinua=condiciones de lluvia). Los datos están representados como promedio \pm error estándar.

En las muestras recolectadas en condiciones de lluvia se observó un patrón distinto (Figura 13). Aunque el menor desarrollo larvario también tuvo lugar en la estación más interior (estación 8), en la estación 9 se observó un fuerte incremento. La estación 9, aun presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al control, no se consideraría tóxica, porque la diferencia con éste no fue mayor del 20% (Figura 13, línea discontinua).

Hay que señalar que durante el muestreo de agua compuesta en condiciones de lluvia, se observó que la estación térmica de Lezo estaba vertiendo agua, lo que podría haber diluido la carga contaminante en la estación 9, ocasionando un aumento en el éxito embrionario. Además, en esta

ocasión, el desarrollo larvario fue mayor en la estación 11 (situada en San Juan) que en la estación 12 (situada en San Pedro).

En época de lluvias los diferentes aliviaderos situados en la zona de Herrera (que en condiciones de caudal normal presenta un tiempo de residencia de 73 días) vierten más agua proveniente de las escorrentías urbanas y pluviales, lo que arrastraría el agua de esta zona hacia la bocana del estuario (estación 12). La zona de Herrera, presenta niveles altos de metales y compuestos orgánicos, asociados con una alta toxicidad (Montero et al. 2011), lo que podría explicar el aumento en la toxicidad observada en la estación 12. Sin embargo, esta influencia no llegaría a la estación 11, que está situada en San Juan (pantalanes que se encuentran en la entrada del pueblo).

En la Figura 14 y Figura 15 están representados los diferentes tratamientos a los que se sometieron las muestras compuestas de agua en condiciones secas y de lluvia, respectivamente. Se llevaron a cabo tratamientos individuales (i.e. para eliminar el efecto del amonio, de los metales y de los compuestos orgánicos) y combinados (i.e. para eliminar el efecto del amonio y los metales, del amonio y los compuestos orgánicos, y de los metales y los compuestos orgánicos). Tras observar en la campaña de condiciones secas que no había amonio en las muestras de agua, en la campaña de las lluvias se eliminó el tratamiento del amonio y se incluyó uno combinado para metales y orgánicos.

Los únicos tratamientos que favorecieron un buen desarrollo larvario fueron aquellos que eliminaron los metales (ANOVA; $p < 0,05$). Como puede observarse en la Figura 14, el tratamiento combinado para eliminar el efecto del amonio y de los metales no incrementó el éxito embrionario en mayor medida que el tratamiento para los metales.

Igualmente, la combinación del tratamiento para metales y orgánicos no aumentó el éxito embrionario en mayor medida que el tratamiento dirigido únicamente a los metales (Figura 15). Por ello, puede concluirse que tanto en condiciones secas como de lluvia, los responsables de la toxicidad fueron los metales.

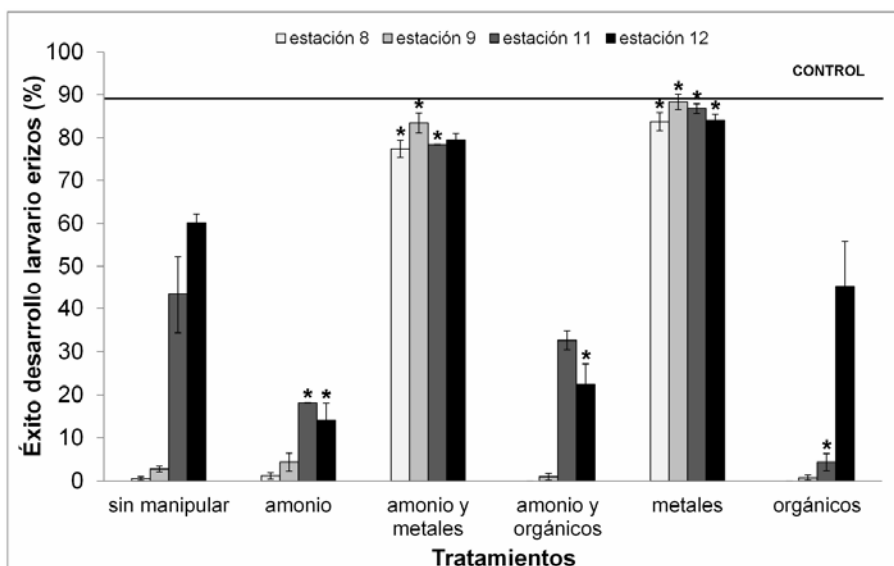


Figura 14. Porcentaje de éxito de desarrollo de las larvas de erizo expuestas a las muestras de agua compuestas (obtenidas en condiciones secas), sin manipular, y a las mismas muestras sometidas a los diferentes tratamientos TIEs. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la muestra sin manipular (representada con el mismo color) ($p < 0,05$). La línea representa el éxito de desarrollo larvario en el control. Los datos están representados como promedio \pm error estándar.

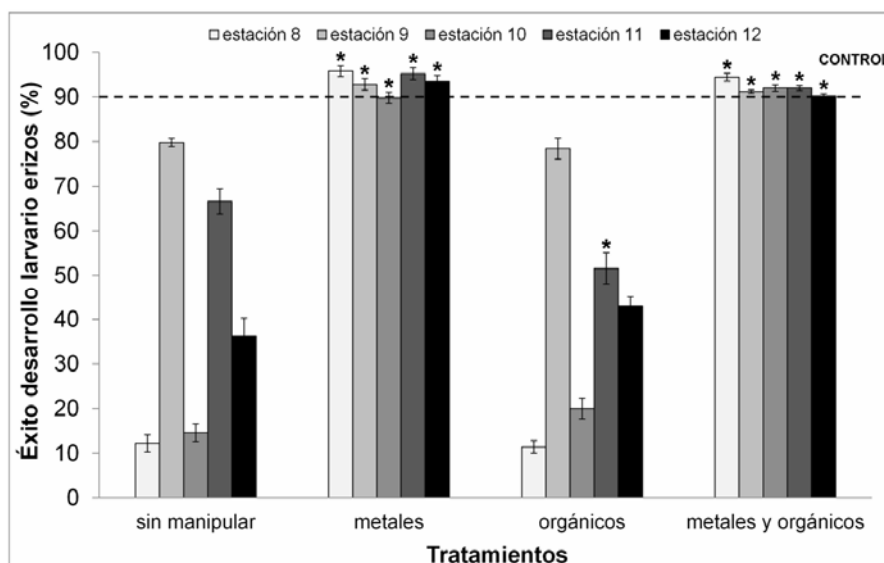


Figura 15. Porcentaje de éxito de desarrollo de las larvas de erizo expuestas a las muestras de agua compuestas (obtenidas en las condiciones de lluvia), sin manipular, y a las mismas muestras sometidas a los diferentes tratamientos TIEs. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la muestra sin manipular (representada con el mismo color) ($p < 0,05$). La línea representa el éxito de desarrollo larvario en el control. Los datos están representados como promedio \pm error estándar.

4.3 BIOENSAYO IN SITU DE ERIZOS

En la Figura 16 se representa el porcentaje de éxito del desarrollo larvario de erizos a partir de los resultados obtenidos en el test realizado *in situ* en las estaciones 8 a 12.

Los resultados son coherentes con los obtenidos en el laboratorio a partir de las muestras de agua compuestas. Al igual que en aquel caso, se obtuvo un incremento en el éxito larvario de los erizos desde la estación interior (estación 8) hacia la bocana (estación 12). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las estaciones 9, 11 y 12, con respecto a la estación 8.

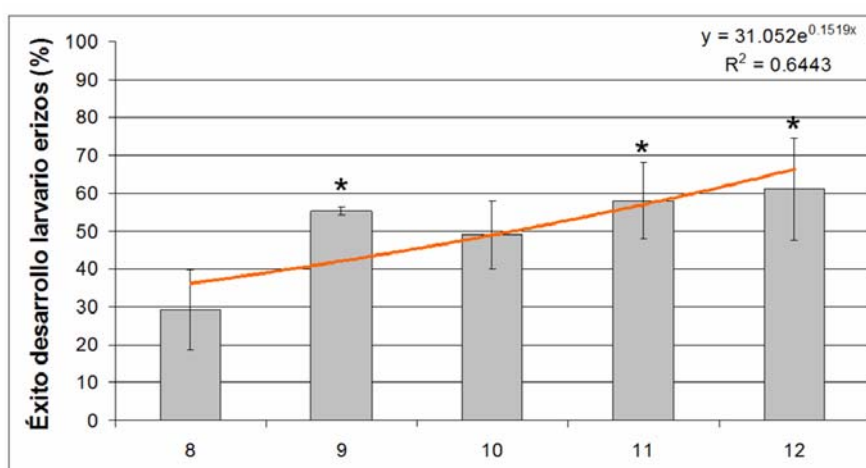


Figura 16. Bioensayo *in situ*: porcentaje de éxito de desarrollo de las larvas de erizo sumergidas en el medio durante 48 horas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la estación 8. En color naranja se muestra la tendencia exponencial del éxito embrionario con respecto a las estaciones (la influencia marina aumenta de la estación 8 a la 12).

4.4 MERCURIO MEDIDO MEDIANTE DIFERENTES TIPOS DE DGTs

Los resultados de los análisis de la concentración de mercurio en las muestras de agua de los reactores que se recogieron al inicio y al final de la experimentación, medida por CV-AFS, se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Evolución de la concentración del Hg total en las cubetas durante el tiempo de la experimentación (alrededor de tres días de inmersión), desde el inicio (T_0) hasta el final (T_{Final}).

Nombre de la cubeta	W	W1	W2
Hg añadido en las cubetas ($\mu\text{g/L}$)	-	1	2
Hg medido T_0 (ng/L)	1	340	630
Proporción de Hg "adsorbido/volatilizado" 24 h tras la adicción (%)	-	66	68
Hg medido T_{Final} (ng/L)	LD	210	240
Proporción de Hg "adsorbido/volatilizado" del inicio al fin del experimento (%)	-	79	88

En la Figura 17 se han representado (a) la masa de mercurio retenida en los 3 tipos de DGTs y medida por AMA y (b) la concentración de mercurio en el agua de las cubetas obtenida mediante los 3 tipos de DGTs.

Los resultados de la Figura 17a indican claramente un aumento de la masa de mercurio en las resinas de los DGTs de tipo AS y PS en proporción directa a la concentración de mercurio en las cubetas. En todas las cubetas, la masa de mercurio acumulada por los dos tipos de DGTs (AS y PS) es del mismo orden, salvo en el caso de la cubeta SW1, donde la concentración media de los DGTs PS es claramente más elevada (hay que señalar que la desviación estándar es mayor). Los DGTs de tipo AC se caracterizan por tener valores mucho más bajos, lo que responde a que los grupos iminodiacetato del Chelex 100 concentren, sobre todo, los compuestos de mercurio en forma iónica o en forma de complejos débiles, mientras que el Spheron-thiol permite fijar también el mercurio presente en complejos estables. La diferencia entre las masas acumuladas por estas dos resinas podría representar el mercurio en forma de MeHg o asociado a complejos orgánicos estables (Docekalova y Divis, 2005; Divis et al, 2005).

A partir de las masas de Hg medidas mediante la técnica AMA, se han calculado las concentraciones correspondientes en el agua (Figura 17b): $CDGT = M\Delta g / tADm$

Donde:

- M (ng): masa de Hg analizado tras la elución de la resina;
- Δg (cm): grosor del gel de difusión = 0.063 cm para los geles de agarosa y 0.093 cm para los geles de poliacrilamida;
- t (s): tiempo de inmersión del DGT (aproximadamente 3 meses);
- A (cm^2): superficie del gel expuesta= 3.14 cm^2 ;
- Dm (cm^2/s): coeficiente de difusión del metal en el gel, en el orden de coeficiente de difusión del Hg en el agua= $9.13 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (a 25°C) para los geles de poliacrilamida y $8.97 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (25°C) para los geles de agarosa (Divis et al. 2009).

Si comparamos estas concentraciones con las medidas en las cubetas al final de la experimentación (Tabla 2) puede constatarse una subestimación de los valores de Hg determinados mediante los DGTs. Esta diferencia puede estar explicada en gran parte por el hecho de que las medidas mediante CV-AFS se realizaron en el agua de mar sin filtrar que, además de las especies de Hg más 'lábil,' recuperadas por la técnica DGT, comprende una fracción más o menos importante constituida de complejos orgánicos estables así como de formas coloidales y parte del Hg asociado a las partículas.

Estos primeros resultados tenían como objetivo contribuir a la elección del tipo de DGT más adecuado para medir mercurio, y de los métodos más apropiados de elución y de análisis de los DGTs Hg.

Debido a que el objetivo principal es su aplicación para la medición del mercurio dentro de los requerimientos de las directivas europeas, uno de los criterios fundamentales debería ser la elección de los métodos más fácilmente transferibles, que sean operacionalmente simples y que sean económicos.

En este sentido, la técnica analítica para el análisis de las resinas de DGT mediante CV-AAS (AMA 254) es la más ventajosa, ya que evita el proceso de elución, es fácilmente transferible y es la técnica menos costosa. Esta técnica que se basa en la combustión total de la muestra, permite medir concentraciones muy bajas y no requiere calcular factores de elución, con lo que disminuye la incertidumbre del proceso.

La utilización de los DGTs de tipo Agarosa/Chelex y Agarosa/Spheron-thiol permite evaluar la especiación del mercurio, ya que los grupos iminodiacetatos de la resina Chelex 100 concentran, sobre todo, los compuestos de mercurio que se encuentran en forma iónica o en complejos lábiles, mientras que los grupos tiol de la resina Spheron-thiol permiten fijar también el mercurio que se encuentra en complejos estables. La diferencia entre las masas acumuladas por estas dos resinas podría representar el mercurio en forma de MeHg o asociado a complejos orgánicos estables (Docekalova et Divis, 2005; Divis et al, 2005).

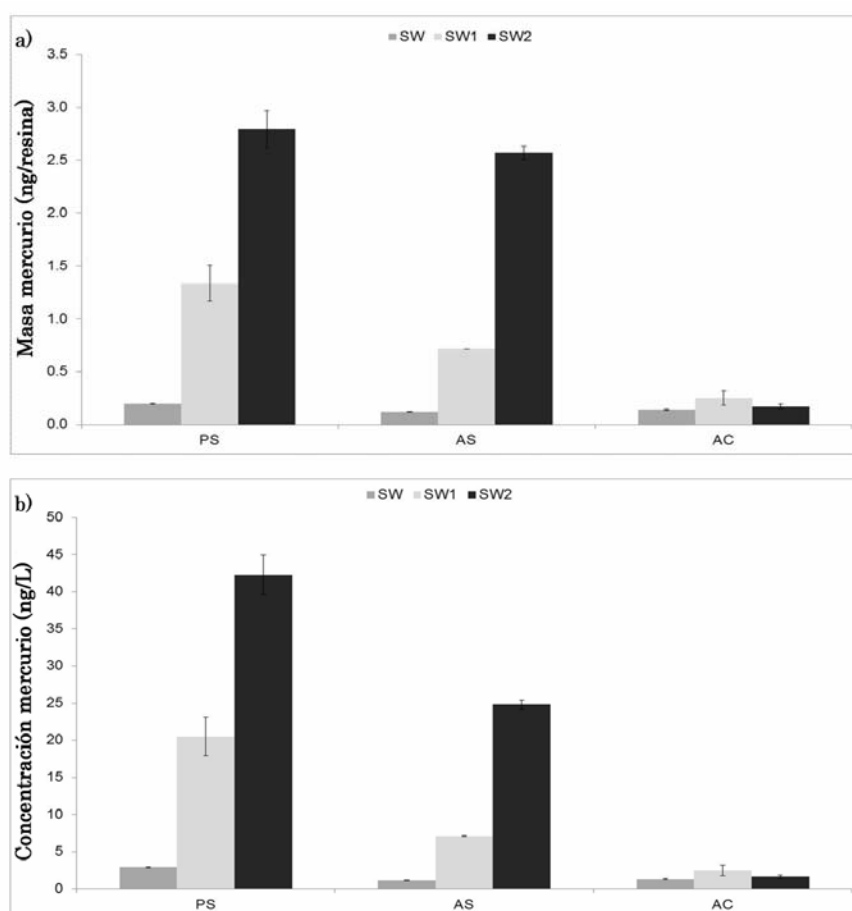


Figura 17. (a) Masa acumulada en los DGTs, medida mediante AMA. (b) Concentraciones "DGT" de Hg en el agua de las tres cubetas. [Tipo de DGT: AS= Agarosa/Sphéron-thiol; PS= Poliacrilamida/Sphéron-thiol; AC= Agarosa/Chelex 100; medio de inmersión: SW= cubeta agua de mar; SW1= cubeta agua de mar + adición Hg 1 µg/L; SW2= cubeta agua de mar + adición Hg 2 µg/L].

5. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en este proyecto ponen de manifiesto que los muestreadores pasivos de tipo DGTs ofrecen una alternativa más ventajosa para la evaluación de la contaminación por metales en aguas de transición y costeras que los métodos tradicionales basados en el muestreo puntual con botellas Niskin, posterior filtración y análisis.

El primer estudio realizado en los 13 estuarios de la costa vasco-francesa mostró la funcionalidad de los DGTs y su aplicabilidad en medios altamente variables como son los estuarios. La reproducibilidad de los resultados obtenidos, la facilidad de manejo, la capacidad de dar medidas integradas en un tiempo de exposición más o menos largo y la posibilidad de obtener concentraciones por debajo del límite de detección de las técnicas analíticas, todo ello hace considerar esta técnica como herramienta válida para el control y seguimiento de la contaminación.

Estas ventajas también se han constatado en este segundo estudio, centrado en evaluar la extensión del impacto de los vertidos en el estuario del Oiartzun. Gracias a las ventajas ofrecidas por los DGTs, como la capacidad de pre-concentración y la integración en el tiempo, se han podido analizar diferencias en el patrón de distribución de los metales en las dos épocas de estudio consideradas (época seca y de lluvia), que no podrían haberse detectado por los métodos tradicionales, dado el carácter puntual de estas medidas. Por lo mismo, a pesar de la dilución de las concentraciones de contaminantes durante episodios de lluvia, mediante los DGTs es posible analizar concentraciones muy bajas de metales que también pueden relacionarse con la toxicidad observada en algunas de las estaciones de estudio.

Otro punto de interés en el uso de los muestreadores pasivos es que estos miden la fracción más lábil del contaminante, identificada como la fracción de mayor riesgo ecotoxicológico por ser la más disponible a la biota; siendo también ésta fracción la de mayor interés en las nuevas directivas europeas.

Sin embargo, para el cumplimiento de la Directiva Marco del Agua es necesario desarrollar índices de calidad ambiental que puedan equipararse a los EQS actuales basados en la concentración de metales disueltos en el agua (fracción menor de $0,45 \mu\text{m}$).

En este proyecto se han realizado las primeras pruebas en el laboratorio para el análisis de mercurio, elemento prioritario en la Directiva Marco, mediante DGTs. Los resultados obtenidos apuestan por una composición de gel de difusión y resina quelante de tipo Agarosa/Chelex y Agarosa/Spheron-thiol, que permiten analizar los compuestos de mercurio que se encuentran en forma iónica y los compuestos estables, respectivamente. Estos resultados, sin embargo, han de validarse con estudios en el campo. En este sentido, en noviembre de 2012 se realizaron las primeras medidas de mercurio en el estuario del Oiartzun con los DGTs diseñados para ello. Los resultados obtenidos no se incluyen en este informe.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Belzunce, M.J., Solaun, O., Valencia, V., Pérez, V., 2004. Contaminants in estuarine and coastal waters. En: *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country*. Elsevier, Amsterdam, 233- 251.
- Belzunce-Segarra, M.J., Montero, N., Garmendia, J.M., Zorita, I., Menchaca, I., Larreta, J., 2011. Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras. Informe Técnico realizado por AZTI para la Agencia Vasca del Agua. 40 pp.
- Best, E.P.H., Hintelmann, H., Clarisse, O., Furey, J.S., Greenfield, B., Dimock, B., 2009. Comparison of DGT sentinels and bioassays for long-term mercury TMDL monitoring under San Francisco Bay field conditions. U.S. Army Engineer Research and Development Center. Final report ERDC/EL TR-09-22. 46 pp.
- Bicak, N., Sherrington, D.C., 1995. Mercury sorption by "non-functional" crosslinked polyacrylamides. *Reactive and Functional Polymers*, 27(3): 155-161.
- Clarisse, O., Hintelmann, H., 2006. Measurements of dissolved methylmercury in natural waters using diffusive gradient in thin films (DGT). *Journal of Environmental Monitoring*, 89: 1242-1247.
- Clarisse, O., Foucher, D., Hintelmann, H., 2009. Methylmercury speciation in the dissolved phase of a stratified lake using the diffusive gradient in thin film technique. *Environmental Pollution*, 157(3): 987-993.
- Clarisse, O., Dimock, B., Hintelmann, H., Best, E.P.H., 2011. Predicting Net Mercury Methylation in Sediments Using Diffusive Gradient in Thin Films Measurements. *Environmental Science Technology*, 45(4): 1506-1512.
- Clarisse, O., Lotufo, G.R., Hintelmann, H., Best, E.P.H., 2012. Biomonitoring and assessment of monomethylmercury exposure in aqueous systems using the DGT technique. *Science of The Total Environment*. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.077.
- Cossa, D., Averty, B., Bretaudeau, J., Sénard, A.S., 2003. Spéciation du mercure dissous dans les eaux marines. *Méthodes d'analyse en milieu marin*, 2-84433-125-4 Ifremer. 27 pp.
- Divis, P., Leermakers, M., Docekalová, H., Gao, Y., 2005. Mercury depth profiles in river and marine sediments measured by the diffusive gradients in thin films technique with two different specific resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(7): 1715-1719.
- Docekalová, H., Divis, P., 2005. Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. *Talanta*, 65(5): 1174-1178.
- Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., Warnken, J., Jordan, M.A., Arthur, J.M., 2007. Evaluation of the in situ, time-integrated DGT technique by monitoring changes in heavy metal concentrations in estuarine waters. *Environmental Pollution*, 148: 213-220.
- Fernández-Gómez, C., Dimock, B., Hintelmann, H., Díez, S., 2011. Development of the DGT technique for Hg measurement in water: comparison of three different types of samplers in laboratory assays. *Chemosphere*, 85(9): 1452-1457.
- Gao, Y., De Canck, E., Leermakers, M., Baeyens, W., Van Der Voort, P., 2011. Synthesized mercaptopropyl nanoporous resins in DGT probes for determining dissolved mercury concentrations. *Talanta*, 87: 262-7.
- González, J-L., Thouvenin, B., Dange, C., Chiffolleau, J-F., Boutier, B., 2006. Role of particle sorption properties in the behavior and speciation of trace metals in macrotidal estuaries: The

cadmium example. En: The Handbook of Environmental Chemistry series. Springer, Berlin / Heidelberg, 265-301.

- Martino, M., Turner, A., Nimmo, M., 2004. Distribution, speciation and particle-water interactions of nickel in the Mersey estuary. *Marine Chemistry*, 88: 161-177.
- Montero, N., Belzunce-Segarra, M.J., Del Campo, A., Garmendia, J.M., Ferrer, L., Larreta, J., González, M., Maidana, M.A., Espino, M., 2011. Integrative environmental assessment of the impact of Pasaia harbour activities on the Oiartzun estuary (southeastern Bay of Biscay). *Journal of Marine Systems*. doi:10.1016/j.jmarsys.2011.06.002
- Montero, N., Belzunce-Segarra, M.J., Menchaca, I., Garmendia, J.M., Franco, J., Nieto, O., Etxebarria, N., 2012. Integrative sediment assessment at Atlantic Spanish harbors by means of chemical and ecotoxicological tools. *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-012-2633-x.
- Mosley, L.M., Peake, B.M., 2001. Partitioning of metals (Fe, Pb, Cu, Zn) in urban run-off from the Kaikorai Valley, Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 35(3): 615-624.
- Munksgaard, N., Parry, D., 2003. Monitoring of labile metals in turbid coastal seawater using Diffusive Gradients in Thin-Films. *Journal of Environmental Monitoring*, 5: 145-149.
- Turner, A., 1996. Trace-metal partitioning in estuaries: importance of salinity and particle concentration. *Marine Chemistry*, 54(1-2): 27-39.
- Tueros, I., Borja, A., Larreta, J., Rodríguez, J.G., Valencia, V., Millán, E., 2009. Integrating long-term water and sediment pollution data, in assessing chemical status within the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, 58: 1389-1400.
- USEPA, 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I. Toxicity characterization procedures. Second edition. Final Report. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/6-91/003.
- USEPA, 2007. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II, and III Guidance Document. Office of Research and Development. Washington, DC. EPA/600/R-07/080.
- Warnken, J., Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., 2004. Investigation of recreational boats as a source of copper at anchorage sites using time-integrated diffusive gradients in thin film and sediment measurements. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 833-843.

7. ANEXO

En relación con este proyecto se han dado las siguientes actividades de difusión:

Conferencias y Grupos de Trabajo

Presentación oral de resultados en el *4th International Passive Sampling Workshop and Symposium*, en Cracovia (Polonia), mayo de 2011:

- Application of DGTs for labile metal fraction evaluation in 13 estuarine waters: An example from the Southeastern Bay of Biscay.
- Evaluation of DGTs suitability as a monitoring tool for the assessment of the chemical status of transitional waters within the Water Framework Directive.

Participación en el *Passive Sampling Workshop*, celebrado en el Instituto Deltares, en Utrecht (Holanda), noviembre de 2011.

Participación en el *Passive Sampling Intercalibration Workshop*, celebrado en el Instituto Ifremer, en Nantes (Francia), noviembre de 2011.

Presentación oral de resultados en la conferencia internacional del proyecto Portonovo (Interreg Espacio Atlántico), en Santander, Febrero de 2012:

- Application of passive samplers and bioassays to characterize the impact of an effluent plume: an example in the port area of the Oiartzun estuary (Southeastern Bay of Biscay).

Presentación en póster de los resultados en el *XIII International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay*, en Santander, Abril de 2012:

- Application of DGTs and bioassays to characterize the impact of an effluent plume in an estuarine system

Participación en grupos de expertos del ICES: Grupo de Trabajo en Sedimentos Contaminados:

- Marine Laboratory, Aberdeen, marzo 2011
- Instituto Hidrográfico, Lisboa, marzo 2012

Publicaciones

- Montero N., M.J. Belzunce-Segarra, A. Del Campo, J.M. Garmendia, L. Ferrer, J. Larreta, M. González, A. Maidana, M. Espino, 2011. Integrative environmental assessment of the impact of Pasaia harbour activities on the Oiartzun estuary (southeastern Bay of Biscay): application of passive samplers, bioassays and numerical modelling. *Journal of Marine Systems* (in press).
- Montero N., M.J. Belzunce-Segarra, J.L. González, J. Larreta, J. Franco, 2012. Evaluation of Diffusive Gradients in Thin-Films (DGTs) as a monitoring tool for the assessment of the chemical status of transitional waters within the Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 64, 31-39.
- Belzunce-Segarra M.J., N. Montero, J.L. González, J. Larreta, J. Franco. Application of DGTs for labile metal fraction evaluation in 13 estuarine waters: An example from the Southeastern Bay of Biscay. *Book Series Maralite Books. Risk Assessment and Environmental Management*. 373 pp. ISBN: 978-94-90970-07-9 (ebook).